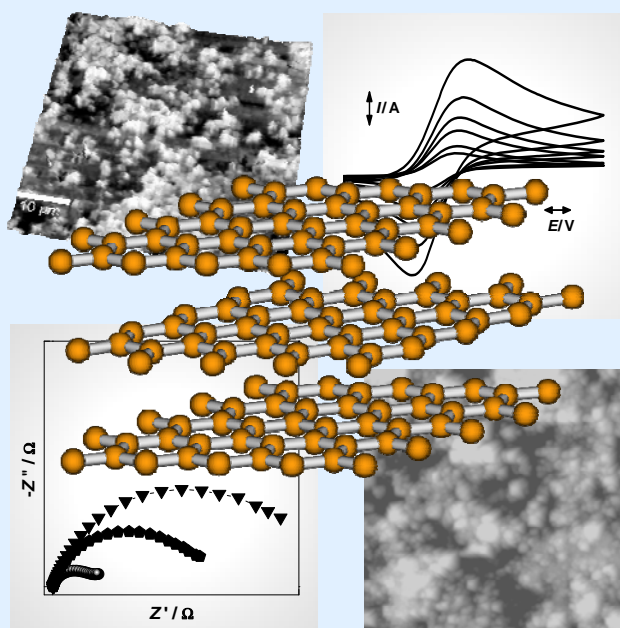


Carla Isabel Madaleno Gouveia Branco Caridade

ELÉCTRODOS DE FILME DE CARBONO

Caracterização e aplicação em sensores e biossensores electroquímicos



Universidade de Coimbra
Faculdade de Ciências e Tecnologia
Departamento de Química
2008

Carla Isabel Madaleno Gouveia Branco Caridade

ELÉCTRODOS DE FILME DE CARBONO
Caracterização e aplicação em sensores e biossensores electroquímicos

Dissertação submetida à Faculdade de Ciências
e Tecnologia da Universidade de Coimbra para
obtenção do grau de Doutor em Química,
especialidade Electroquímica

Universidade de Coimbra
Faculdade de Ciências e Tecnologia
Departamento de Química
2008

Ao meu Amor: Pedro

Ao meu Pai

AGRADECIMENTOS

Estou a chegar ao fim de mais uma etapa! É um sonho concretizado! Não foi fácil! Mas consegui! Muitas alegrias e algumas lágrimas, e muito, muito trabalho! Queria agradecer a todos os que me ajudaram de alguma maneira a tornar realidade este sonho.

Agradeço ao Professor Doutor Christopher Michael Ashton Brett a confiança que depositou em mim, fazendo-me crer sempre que conseguiria terminar o meu doutoramento. Todos os seus ensinamentos, orientação e persistência foram fundamentais para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

À Professora Doutora Ana Maria Oliveira-Brett agradeço o seu permanente apoio, disponibilidade e estímulo ao longo destes anos.

Ao Professor Doutor Hans-Dieter Liess agradeço pela forma com que me recebeu na Alemanha e no seu grupo de investigação. Danke für alle!

Quero agradecer também ao Professor Doutor David Mendez Soares pela sua amizade e carinho bem como pela oportunidade que me deu de poder visitar o seu grupo de investigação na Universidade Estadual de Campinas, Brasil, durante um mês, permitindo a realização dos ensaios de Raman confocal apresentados nesta dissertação. A todos os membros do Laboratório de Interfaces e Nanoestruturas pela maneira com que me receberam. À Professora Doutora Elizabeth de Souza pela amizade e carinho, e pelo apoio enquanto estive no Brasil.

Aos meus Professores da Universidade de Lisboa que contribuíram de uma forma decisiva na minha vontade de prosseguir a minha formação académica.

Ao Professor Doutor António Joaquim de Campos Varandas agradeço toda a atenção, amizade e disponibilidade que tem tido para comigo.

Agradeço também a todos os Professores e funcionários não docentes do Departamento de Química.

Ao Sérgio, Jorge, Paulo e Luís Pedro agradeço pela amizade, carinho, e pelo incentivo que me têm dado ao longo destes anos.

Aos meus colegas de laboratório do Departamento de Química, Rasa, Edilson, Madi, Madalina e Ricardo, pela amizade, apoio e camaradagem! Agradeço também a todos os colegas do laboratório no IPN, à Ana pela iniciação em AFM, ao Victor, Tati e a todos os que passaram por aqui ao longo destes últimos anos. Um abraço especial ao Humberto e à Oana.

A todos os meus amigos que sempre me apoiaram e souberam sempre respeitar o meu espaço e o meu horário de trabalho, especialmente à Cristina e Mané, Salvita, Mónica, Paula e Paulo, Fátima, Cathy e Gilberto, Catarina e Nuno, Arabela e Miguel, e aos meus “sobrinhos”. Aos meus amigos Pablo e Fábio pela amizade e carinho que perdura mesmo que estejam longe.

Ao Sr. Fernando Baptista e à D. Rosinda pela paciência e carinho.

À minha família e aos meus padrinhos, e em especial ao meu irmão pelo apoio incondicional e por compreender que nem sempre pude estar com ele nas horas más...

Aos meus sogros e aos meus cunhados, Paulo e Filipa, pela motivação e por tudo!

Ao Pedro por tudo o que temos lutado para conseguir levar avante os nossos objectivos e sonhos! Não tem sido fácil, mas temos conseguido! Bigado por estares sempre comigo! Estaremos juntos para todo o sempre! Amo-te muito!

Ao meu Pai: se estou aqui hoje a escrever estas linhas de agradecimento nesta tese de doutoramento é a Ti que tudo devo! O teu apoio incondicional, a tua compreensão e tudo, tudo o resto, que tens pela tua filhota que te adora serão eternamente agradecidos por mim!

Finalmente, quero agradecer aos meus Anjos que torcem por mim lá de cima, que me observam e intercedem por mim a Deus... à minha Mãe....

Agradeço o apoio financeiro da Fundação para a Ciência e a Tecnologia, bolsa de doutoramento SFRH/BD/18659/2004 e ao Departamento de Química, por me ter aceite como estudante de doutoramento e pelas condições disponibilizadas durante a realização dos trabalhos aqui apresentados.

A todos:

MUITO OBRIGADA...

RESUMO

Neste trabalho investigaram-se as propriedades electroquímicas e microestruturais de eléctrodos de filme de carbono com vista à sua utilização em sensores e foram aplicados como eléctrodo-substrato para sensores e biossensores electroquímicos.

Os eléctrodos foram preparados a partir de resistências eléctricas de filme de carbono de valores nominais 1,5, 2, 15, 140 Ω e 2 k Ω . A caracterização electroquímica foi efectuada através das técnicas de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância electroquímica (EIS) em diferentes soluções de electrólito suporte. Observou-se que os eléctrodos de 1,5 e 2,0 Ω apresentam uma larga janela de potencial e parâmetros cinéticos próximos de reversibilidade após pré-tratamento electroquímico. Os eléctrodos das resistências de 15 e 140 Ω têm uma cinética mais lenta, enquanto que os das resistências de 2 k Ω mostram perfis voltamétricos menos definidos. Da análise da morfologia dos filmes de carbono realizada através de microscopia de força atómica, verificou-se que a uniformidade destes aumenta com a diminuição do valor da resistência nominal. A maior uniformidade foi relacionada com as melhores características electroquímicas obtidas. A estrutura grafitica dos filmes de carbono foi observada por microscopia de Raman confocal e por análise de difracção de raios-X.

Os eléctrodos de filme de carbono de resistência de 2 Ω foram modificados com filmes de Nafion e de bismuto para serem usados como sensores electroquímicos de concentrações sub-micromolares de catiões de metais pesados em amostras naturais por técnicas de pré-concentração, exemplificados por cádmio e chumbo. Estudou-se através de EIS a influência do tensoactivo Triton X-100 nos resultados experimentais obtidos, utilizado para simular as condições em amostras naturais ambientais, e da modificação dos eléctrodos nas propriedades interfaciais do filme de carbono. Observou-se que os eléctrodos modificados com filmes de bismuto e protegidos com filmes de Nafion facilitam a deposição dos iões metálicos, sugerindo que estes eléctrodos modificados são melhores para a electroanálise dos iões cádmio e chumbo do que os eléctrodos de filmes de carbono modificados apenas com Nafion.

Utilizaram-se nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) funcionalizados em ácido nítrico para modificar eléctrodos de filme de carbono de 2Ω para o desenvolvimento de biossensores enzimáticos para glucose e etanol. As enzimas foram imobilizadas nos eléctrodos através do método de reticulação com glutaraldeído. Foram observados efeitos electrocatalíticos devidos à presença dos MWCNT em comparação com os biossensores desenvolvidos em eléctrodos sem MWCNT. A sensibilidade obtida com o biossensor modificado com MWCNT foi ~20 vezes superior à do biossensor sem MWCNT.

Os mediadores redox hexacianoferrato de cobre e poli(vermelho neutro) foram utilizados na modificação dos eléctrodos de filme de carbono e avaliadas as suas características electroquímicas. Os eléctrodos modificados com filmes de PNR foram utilizados, com sucesso, para o desenvolvimento de um biossensor enzimático para a glucose, onde a enzima glucose oxidase foi encapsulada numa matriz de sol-gel oxisilano, a funcionar a potenciais perto de zero onde as interferências são pequenas.

PALAVRAS-CHAVE: Eléctrodos de resistências de filme de carbono; filme de Nafion; filme de bismuto; MWCNT; sensores e biossensores electroquímicos; voltametria cíclica; EIS; AFM; Raman confocal.

ABSTRACT

The electrochemical and microstructural properties of carbon film electrodes have been investigated in order to assess the viability of their use as sensors and as substrates for electrochemical sensors and biosensors.

The electrodes were prepared from carbon film electrical resistors of 1.5, 2, 15, 140 Ω , 2 k Ω nominal resistance. Electrochemical characterization was performed by cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) in different electrolyte solutions. The results show that electrodes from 1.5 and 2.0 Ω resistors wide potential windows and close-to-reversible kinetics after pre-treatment. The resistor electrodes of 15 and 140 Ω , show slower kinetics while those of 2.0 k Ω present poor cyclic voltammetric profiles. Morphological analysis of the films by atomic force microscopy showed more uniform films for electrodes prepared from resistors of lower nominal resistance, those which have better electrochemical characteristics. Confocal Raman and X-ray diffraction showed the existence of a graphitic structure within the films.

Carbon film electrodes of 2 Ω were modified with Nafion and bismuth films with the aim of employing them as electrochemical sensors for the detection of submicromolar concentrations of heavy metal cations, exemplified by cadmium and lead, using pre-concentration techniques. EIS was used to study the influence of the model surfactant Triton-X-100 on the experimental results, used to simulate the conditions in environmental samples, as well as changes in the interfacial properties of the electrodes. It was found that Nafion-coated bismuth films facilitate heavy metal deposition, suggesting that it should be a better modified electrode for the electroanalysis of cadmium and lead ions than the Nafion-coated ones.

Multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) functionalised in nitric acid were used to modify carbon film electrodes of 2 Ω . The modified electrodes were applied in the development of enzymatic biosensors for glucose and ethanol. The enzymes glucose and alcohol oxidase were cross-linked with glutaraldehyde and electrocatalytic effects of MWCNT were observed with respect to unmodified carbon film electrodes. The sensitivity

obtained was ~20 times higher at MWCNT-modified carbon film based biosensors than the unmodified electrodes.

The redox-mediators copper hexacyanoferrate and poly(neutral red) were also used to modify carbon film electrodes and their electrochemical properties were evaluated. PNR-modified electrodes were successfully used for the development of a glucose enzyme sensor, in which glucose oxidase was encapsulated in an oxysilane sol-gel matrix, operating at low potentials where interferences are small.

KEYWORDS: Carbon film resistor electrodes; Nafion coatings; bismuth films; MWCNT; electrochemical sensors and biosensors; cyclic voltammetry; EIS; AFM; confocal Raman.

ÍNDICE GERAL

| | |
|--------------------|-----|
| RESUMO..... | vii |
| ABSTRACT..... | ix |
| PREFÁCIO | xv |
| ABREVIATURAS | xix |

1. O CARBONO COMO MATERIAL DE ELÉCTRODO E EM SENSORES

| | |
|---|----|
| ELECTROQUÍMICOS | 1 |
| 1.1. Carbono como material de eléctrodo | 3 |
| 1.1.1. Propriedades e estrutura do carbono | 4 |
| 1.1.2. Carbono vítreo | 7 |
| 1.1.3. Grafite pirolítica e filmes de carbono | 9 |
| 1.1.4. Nanotubos de carbono..... | 10 |
| 1.2 Sensores electroquímicos..... | 13 |
| 1.2.1. Definição..... | 13 |
| 1.2.2. Tipos de sensores electroquímicos..... | 15 |
| 1.3 Materiais para sensores electroquímicos | 17 |
| 1.4. Eléctrodos quimicamente modificados | 19 |
| 1.4.1 Modificações de eléctrodos utilizadas | 21 |

2. MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO ELECTROQUÍMICA E MORFOLÓGICA

| | |
|--|----|
| 2.1. Alguns fundamentos de electroquímica..... | 35 |
| 2.2. Técnicas voltamétricas..... | 39 |
| 2.2.1. Voltametria cíclica | 39 |
| 2.2.2. Voltametria de onda quadrada | 45 |
| 2.2.3. Voltametria de redissolução..... | 47 |
| 2.3. Cronoamperometria | 49 |

| | |
|--|-----|
| 2.4. Espectroscopia de impedância electroquímica | 51 |
| 2.5. Microscopia de força atómica | 59 |
| 2.6. Microscopia de Raman confocal | 62 |
| | |
| 3. EXPERIMENTAL | 65 |
| 3.1. Reagentes e soluções | 67 |
| 3.2. Eléctrodos de filme de carbono | 69 |
| 3.2.1. Preparação | 69 |
| 3.2.2 Pré-tratamento electroquímico | 70 |
| 3.2.3 Modificação dos eléctrodos de filme de carbono | 71 |
| 3.3. Imobilização de enzimas para biossensores de glucose e etanol | 73 |
| 3.3.1 Método sol-gel | 73 |
| 3.3.2. Método de reticulação | 74 |
| 3.4 Instrumentação | 76 |
| | |
| 4. CARACTERIZAÇÃO DE ELÉCTRODOS DE FILME DE CARBONO | 81 |
| 4.1 Introdução | 83 |
| 4.2 Caracterização electroquímica | 85 |
| 4.2.1 Resistências de 2 Ω | 85 |
| 4.2.2 Resistências de 1,5 Ω , 15 Ω , 140 Ω e 2 k Ω | 92 |
| 4.3. Análise de superfície | 105 |
| 4.3.1. Microscopia de força atómica | 105 |
| 4.3.2. Microscopia de Raman confocal e difracção de raios-X | 107 |
| 4.4. Conclusões | 110 |
| | |
| 5. ELÉCTRODOS DE FILME DE CARBONO MODIFICADOS COM NAFION | 111 |
| 5.1 Introdução | 113 |
| 5.2 Modificação com Nafion | 114 |
| 5.2.1 Caracterização morfológica e estrutural | 114 |
| 5.2.2 Caracterização electroquímica | 118 |
| 5.3 Influência de tensioactivos | 127 |
| 5.3.1 Espectroscopia de impedância electroquímica | 127 |

| | |
|---|-----|
| 5.3.2 Voltametria de redissolução anódica | 134 |
| 5.4 Conclusões | 139 |
| | |
| 6. ELÉCTRODOS DE FILME DE CARBONO MODIFICADOS COM FILMES DE | |
| BISMUTO | 141 |
| 6.1 Introdução | 143 |
| 6.2 Eléctrodos modificados com filme de bismuto..... | 144 |
| 6.2.1. Influência de Triton na determinação de zinco..... | 145 |
| 6.2.2. Influência de Triton na determinação de cádmio e chumbo | 146 |
| 6.3. Eléctrodos filme de bismuto com Nafion | 147 |
| 6.3.1. Janela de potencial | 147 |
| 6.3.2. Determinação de metais por voltametria de redissolução anódica de onda | |
| quadrada..... | 149 |
| 6.3.3. Espectroscopia de impedância electroquímica de eléctrodos de Nafion-BiF .. | 153 |
| 6.4. Conclusões | 158 |
| | |
| 7. ELÉCTRODOS DE FILME DE CARBONO MODIFICADOS COM NANOTUBOS DE | |
| CARBONO EM BIOSSENSORES | 161 |
| 7.1 Introdução | 163 |
| 7.2 Método de modificação dos eléctrodos..... | 165 |
| 7.2.1 Biossensor para glucose..... | 165 |
| 7.3 Biossensor para etanol | 172 |
| 7.3.1 Optimização dos principais parâmetros para a determinação de etanol | 172 |
| 7.3.2 Determinação de etanol por amperometria | 176 |
| 7.3.3 Estabilidade operacional e selectividade do biossensor..... | 177 |
| 7.4 Conclusões | 178 |
| | |
| 8. ELÉCTRODOS DE FILME DE CARBONO MODIFICADOS COM MEDIADORES | |
| REDOX EM BIOSSENSORES..... | 181 |
| 8.1 Introdução | 183 |
| 8.2 Deposição dos mediadores redox..... | 184 |

| | |
|---|-----|
| 8.2.1 Hexacianoferrato de cobre | 185 |
| 8.2.2 Poli(vermelho neutro) | 187 |
| 8.3 Biossensores baseados em sol-gel | 191 |
| 8.3.1 Preparação..... | 191 |
| 8.3.2 Resposta do biossensor para a glucose | 192 |
| 8.4 Conclusões | 195 |
| CONCLUSÕES..... | 197 |
| BIBLIOGRAFIA | 205 |

PREFÁCIO

O mercúrio é, em termos históricos, um dos materiais que mais contribuiu para o desenvolvimento da electroanálise [1]. Uma das principais vantagens do mercúrio como eléctrodo é a sua larga janela de potencial catódica, aproximadamente $-2,0$ V. Não obstante esta e outras vantagens, o mercúrio apresenta uma elevada toxicidade, estando em primeiro lugar na lista de materiais perigosos, provocando envenenamento severo e doenças graves. Alguns países chegaram mesmo, ou estão em vias de, proibir a sua utilização em baterias, lâmpadas, termómetros, entre outras aplicações comuns [2]. Atendendo a esta proibição, novos materiais estão a ser desenvolvidos e caracterizados para uso em aplicações electroquímicas.

Uma alternativa ao mercúrio como eléctrodo são os materiais baseados em carbono. Estes materiais são apelativos para a electroquímica devido a apresentarem uma larga janela de potencial, serem electroquimicamente inertes e de um modo geral de baixo custo. Comparativamente ao mercúrio os eléctrodos de carbono estendem a janela de potencial para a região anódica, aproximadamente $+2,0$ V [3]. Outra característica importante é a existência de diversos alótropos de carbono com propriedades distintas permitindo um grande leque de escolha de materiais para eléctrodos.

Para além do uso directo de materiais de carbono, poder-se-á aumentar a gama de aplicações em electroquímica através do recurso a modificações intencionais da superfície do eléctrodo. Uma das formas mais simples consiste no pré-tratamento electroquímico, que permite uma limpeza da superfície, fomentando o aparecimento de grupos funcionais. Este pré-tratamento pode ser realizado através do uso de soluções de ácidos com varrimento de potencial ou aplicação de potencial fixo anódico ou catódico, ou mesmo um misto dos dois. Outras formas mais elaboradas podem também ser levadas a cabo, como por exemplo, revestindo a superfície com filmes poliméricos [4], de bismuto [5] e de mediadores redox [6].

Uma das limitações da utilização de materiais de carbono em sensores é a possibilidade de envenenamento da sua superfície, por exemplo, por compostos orgânicos. O bloqueamento da superfície e conseqüente inaplicabilidade do eléctrodo resulta da sua

elevada actividade de superfície [1]. É necessário realizar estudos do comportamento dos eléctrodos em condições reais, simulando em laboratório vários meios naturais, *p.e.*, utilizando tensioactivos como é o caso do Triton.

O desenvolvimento de biossensores electroquímicos enzimáticos tem-se revelado numa área de grande interesse de investigação multidisciplinar. Tal facto prende-se com a necessidade de uma quantificação rápida, exacta, precisa e de baixo custo de analitos como por exemplo a glucose. A caracterização e possíveis modificações funcionais do material de suporte são fundamentais para que um biossensor electroquímico apresente as propriedades requeridas para uma imobilização das enzimas.

Esta dissertação tem como objectivos principais a caracterização e aplicação de eléctrodos de filme de carbono em electroanálise de metais pesados e em biossensores electroquímicos enzimáticos para a determinação de glucose e etanol. A caracterização e aplicação segue um estudo electroquímico e morfológico, com o auxílio de técnicas voltamétricas, espectroscopia de impedância electroquímica, microscopia de força atómica e Raman confocal.

Nos primeiros capítulos discutem-se os conceitos gerais que sustentam o trabalho prático. No Capítulo 1, serão apresentadas algumas propriedades do carbono dado o papel que este possui no desenvolvimento de materiais para sensores. Serão abordados alguns materiais como o carbono vítreo, grafite pirolítica, filmes de carbono e nanotubos de carbono. Expor-se-ão ainda alguns tópicos sobre sensores electroquímicos, em particular o seu conceito, tipos e características necessárias para a sua aplicação em electroanálise.

No Capítulo 2 serão apresentadas as técnicas electroquímicas e de análise de superfície empregues neste trabalho. Nas técnicas electroquímicas serão dadas as noções sobre voltametria cíclica, de onda quadrada e de redissolução anódica, e espectroscopia de impedância electroquímica. Nas técnicas de análise de superfície discutem-se sucintamente as microscopias de força atómica e Raman confocal.

Numa segunda parte, iniciada no Capítulo 3 com os detalhes experimentais, apresentam-se e discutem-se os resultados obtidos, e publicados em revistas da especialidade [7-13].

Nos Capítulos 4 e 5 caracterizam-se electroquímica e morfológicamente eléctrodos de filme de carbono preparados a partir de resistências de filmes de carbono com vários

valores nominais [7-9,11]. Em particular, no Capítulo 4 será estudada a influência do pré-tratamento electroquímico nas características dos eléctrodos. No Capítulo 5, analisa-se a modificação dos eléctrodos com um filme polimérico de Nafion nas características electroquímicas e morfológicas. Será ainda estudada a influência do tensioactivo Triton X-100 na electroanálise de metais pesados por voltametria de redissolução anódica. No Capítulo 6 apresenta-se o estudo de eléctrodos modificados com filmes de bismuto na determinação dos catiões metálicos zinco, cobre e chumbo [10].

Nos Capítulos 7 e 8 serão apresentadas duas aplicações dos eléctrodos de filme de carbono como suporte para o desenvolvimento de biossensores electroquímicos enzimáticos. No Capítulo 7 desenvolvem-se biossensores para a glucose e etanol baseados em eléctrodos modificados com nanotubos de carbono e as enzimas glucose e etanol oxidase [12]. O Capítulo 8 será dedicado ao desenvolvimento de biossensores para a glucose utilizando dois mediadores redox, hexacianoferrato de cobre e poli(vermelho neutro), na modificação de eléctrodos de filmes de carbono de várias resistências nominais [13].

ABREVIATURAS

| | |
|--------|--|
| AdSV | Voltametria de redissolução adsorptiva (<i>adsorptive stripping voltammetry</i>) |
| AFM | Microscopia de força atómica (<i>atomic force microscopy</i>) |
| AlcOx | Álcool oxidase |
| ASV | Voltametria de redissolução anódica (<i>anodic stripping voltammetry</i>) |
| BIA | Análise por fluxo descontínuo (<i>batch injection analysis</i>) |
| BiF | Eléctrodo de filme de bismuto (<i>bismuth film electrode</i>) |
| BSA | Albumina sérica bovina; (<i>bovine seric albumine</i>) |
| CA | Cronoamperometria (<i>chronoamperometry</i>) |
| c-AFM | Microscopia de força atómica, de modo contacto (<i>contact mode-atomic force microscopy</i>) |
| CFE | Eléctrodos de filme de carbono (<i>carbon film electrodes</i>) |
| CME | Eléctrodos quimicamente modificados (<i>chemical modified electrode</i>) |
| CNT | Nanotubos de carbono (<i>carbon nanotubes</i>) |
| CSV | Voltametria de redissolução catódica (<i>cathodic stripping voltammetry</i>) |
| CV | Voltametria cíclica (<i>cyclic voltammetry</i>) |
| CVD | Deposição química de vapor (<i>chemical vapour deposition</i>) |
| EIS | Espectroscopia de impedância electroquímica (<i>electrochemical impedance spectroscopy</i>) |
| EQCM | Microbalança de cristal de quartzo com electroquímica (<i>electrochemical quartz crystal microbalance</i>) |
| GA | Glutaraldeído |
| GOPMOS | 3-glicidoxipropiltrimetoxisilano |
| GOx | Enzima glucose oxidase |
| MHCF | Hexacianoferratos metálicos |
| MTFE | Eléctrodos de filmes finos de mercúrio |
| MTMOS | Metiltrimetoxisilano |
| MWCNT | Nanotubos de carbono de paredes múltiplas (<i>multi-walled carbon nanotubes</i>) |
| NR | Vermelho neutro (<i>neutral red, N8,N8,3-trimetilfenazina-2,8-diamina</i>) |
| PB | Solução tampão fosfato (<i>phosphate buffer</i>) |

| | |
|-------|---|
| PBS | Solução tampão fosfato salino (<i>phosphate buffer saline</i>) |
| PG | Grafite pirolítica |
| PNR | Poli(vermelho neutro) (<i>poly neutral red</i>) |
| PT | Pré-tratamento electroquímico |
| RVC | Carbono vítreo reticulado (<i>reticulated vitreous carbon</i>) |
| SCE | Eléctrodo de calomelanos saturado (<i>saturated calomel electrode</i>) |
| SNOM | Microscopia óptica de campo próximo (<i>scanning near-field optical microscopy</i>) |
| SV | Voltametria de redissolução (<i>stripping voltammetry</i>) |
| SWCNT | Nanotubos de carbono de parede simples (<i>single walled carbon nanotubes</i>) |
| SWV | Voltametria de onda quadrada (<i>square wave voltammetry</i>) |

CAPÍTULO 1

O CARBONO COMO MATERIAL DE ELÉCTRODO E EM SENSORES ELECTROQUÍMICOS

Neste capítulo serão apresentados alguns conceitos gerais sobre carbono e materiais de carbono utilizados em electroquímica. Serão ainda discutidas noções básicas sobre sensores e biossensores electroquímicos, definições, tipos e características. Especial ênfase será dado às propriedades dos materiais utilizados como eléctrodos em sensores ou suporte para o desenvolvimento de sensores e biossensores electroquímicos. Focar-se-ão modificações de eléctrodo através de polímeros e outros compostos, com o intuito de melhorar as características da superfície dos eléctrodos bem como a sua resposta a diferentes analitos.

1.1. Carbono como material de eléctrodo

A utilização de carbono como material de eléctrodo tem aumentado de uma forma considerável nos últimos anos como demonstra o número de publicações existentes na literatura, veja-se, como exemplo, as recentes revisões publicadas [2,3,14,15]. A primeira aplicação em electroquímica de materiais de carbono é atribuída a Humphry Davy em 1809 que utilizou eléctrodos de grafite para a produção electroquímica de metais alcalinos.

A diversidade do carbono como material é uma consequência do seu polimorfismo estrutural, estabilidade química e a natureza forte da ligação carbono-carbono. Para a electroquímica, convém salientar ainda o seu baixo custo (de um modo geral), janela de potencial ampla e ser electroquimicamente inerte [3]. Dependendo do tipo de material de carbono, este pode apresentar características de metal ou semicondutor, possibilitando diversas aplicações devido às suas propriedades catalíticas e cinéticas, capacitância e adsorção [2]. Por outro lado a superfície de carbono pode adsorver uma variedade de compostos através de adsorção física não específica e adsorção química específica com

revestimento funcional. Este pode ser formado pela acção forçada dos reagentes ou através da presença de grupos funcionais nativos resultantes de um tratamento termo-mecânico do material. Os materiais de carbono formam ligações covalentes fortes com alguns modificadores de superfície favorecendo o desenvolvimento de eléctrodos modificados [2].

1.1.1. Propriedades e estrutura do carbono

A configuração electrónica do carbono é $1s^2 2s^2 2p^2$. Devido à separação energética entre os electrões do nível de valência, as funções de onda electrónicas para esses electrões podem rapidamente misturar-se, obtendo-se as hibridizações sp^3 , sp^2 e sp . Para este trabalho, têm especial relevância a hibridização sp^2 que é característica de carbonos trivalentes.

Uma propriedade que deriva da distribuição electrónica do carbono é a existência de alótropos, *i.e.*, compostos constituídos por um só tipo de átomo mas uma estrutura espacial diferente. A capacidade de um elemento em combinar-se para formar alótropos não é propriedade exclusiva do carbono. Outros elementos da quarta coluna da tabela periódica apresentam esta mesma característica, apesar de o carbono ser particularmente relevante devido ao número e à variedade dos seus alótropos. Presentemente encontram-se referenciados mais de 15 alótropos de carbono, sendo os mais conhecidos a grafite e o diamante. Mais recentemente, outros alótropos, designados por “exóticos”, foram sintetizados como é o caso dos Buckminster-fulerenos [16], nanoespuma [17] e nanobuds [18] de carbono, e nano-rodos de diamante [19].

Nos materiais do tipo grafite, os átomos de carbono surgem numa estrutura trigonal baseada numa hibridização sp^2 com uma ligação C-C intraplanar de $1,42 \text{ \AA}$ [20]. O electrão não envolvido nas ligações intraplanares é estabilizado por uma ligação de van der Waals com um electrão de um átomo de carbono de um plano adjacente, criando a estrutura ideal de grafite de folhas de grafeno empilhadas, representada na Figura 1.1. O espaçamento entre as camadas planares é de $3,354 \text{ \AA}$, ou seja, mais de 2 vezes o espaçamento dos átomos de carbono no plano basal. A grafite apresenta propriedades com elevado grau anisotrópico, devido à ligação fraca de van der Waals entre as camadas. Esta característica

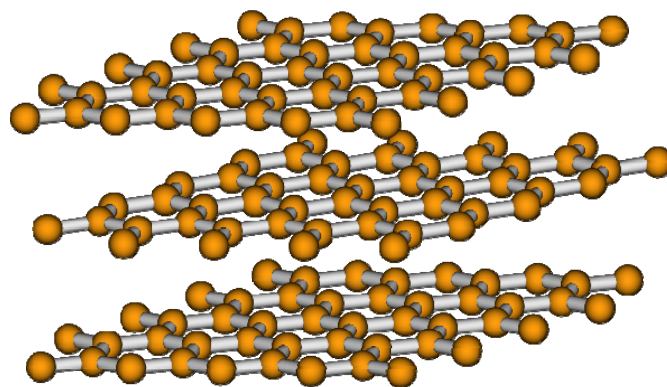


Figura 1.1 – Estrutura de um cristal de grafite.

resulta num grau de desordem na direcção perpendicular ao plano basal, enquanto que os electrões fracamente ligados entre os planos adjacentes faz com que a grafite seja boa condutora de electricidade. O empilhamento das camadas planas ocorre em duas formas diferentes: α (hexagonal) ou β (romboédrica). Recentemente foi verificada a existência de um novo empacotamento do tipo cúbico [21].

Outra família de alótropos de carbono é a do tipo diamante. Estes são constituídos a partir de carbono com hibridização do tipo sp^3 , com os quatro electrões de valência igualmente distribuídos pelas orbitais. Estas orbitais são caracterizadas por apresentarem o máximo de probabilidade ao longo do eixo que liga o centro de um tetraedro e o vértice. A estrutura destes alótropos é, por essa razão, tetraédrica com quatro ligações covalentes equivalentes de 1,54 Å e um ângulo incluso de 109,47°. A natureza direccionada da distribuição electrónica e a estrutura tetraédrica conferem a estes materiais uma elevada resistência e estabilidade [20]. Ao contrário dos materiais do tipo grafite, a inexistência de electrões fracamente ligados torna os alótropos do tipo diamante num material isolador. A introdução de defeitos na estrutura cristalina, como no caso da dopagem, pode torná-los semicondutores ou condutores [20].

Como exemplos destes alótropos tem-se o diamante e a lonsdalita, que diferem na estrutura cristalina de base. O diamante apresenta um empacotamento do tipo cúbico de faces centradas, Figura 1.2, podendo ser visto como constituído por anéis de seis carbonos interligados. Por seu turno, a lonsdalita é constituída por uma unidade do tipo hexagonal, resultante de alguns dos anéis hexagonais serem substituídos por configurações em barco.

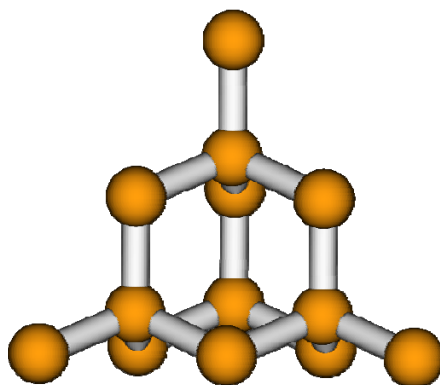


Figura 1.2 – Estrutura do diamante.

Esta diferença no empacotamento repercute-se na dureza destes dois materiais. Por exemplo, a dureza do diamante é de 10 na escala de Mohs (valor máximo), enquanto que a lonsdalita apresenta um valor de 7-8. A classe dos fulerenos surgiu em 1985 através de estudos de feixes moleculares [16]. Apesar desta descoberta, já em 1970 Osawa tinha previsto a existência de uma estrutura molecular com 60 átomos de carbono numa estrutura circular. Recentemente [22] foi também discutida a possibilidade de compostos tubulares terem sido descobertos no ano de 1952. Partindo de uma estrutura típica da grafite constituída apenas por um empacotamento hexagonal de átomos de carbono, os fulerenos apresentam ainda pentágonos, e em alguns casos heptágonos, forçando a dobragem da folha de grafite em esferas, cilindros e elipses. Ao contrário da grafite e do diamante que surgem como estruturas cristalinas repetidas, os fulerenos podem ser entendidos como um alótropo molecular do carbono.

Esta família pode ser dividida consoante o material resultante [23]: agregados, nanotubos, megatubos, nano-onions, nanobuds e nanoespuma [24], entre outros. O fulereno mais simples é constituído por 20 átomos de carbono, C_{20} . Ao contrário da hibridização sp^2 na grafite e sp^3 no diamante, a percentagem de carácter s e p encontra-se dependente do número de carbonos.

Os fulerenos tubulares designados por nanotubos de carbono, pela relevância que apresentam na electroquímica, e outros campos de investigação e aplicação, serão descritos na Subsecção 1.1.4. Na Figura 1.3 encontram-se representadas as estruturas do C_{60} e de um nanobud.

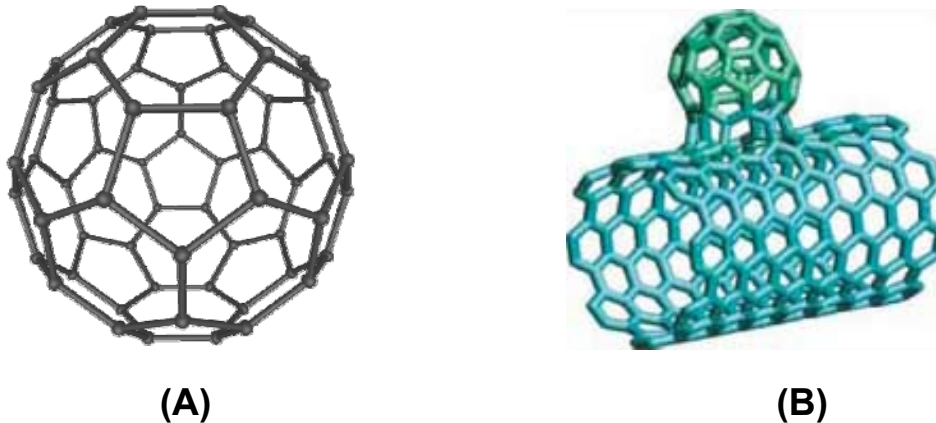


Figura 1.3 – Estruturas do (A) C₆₀ [16] e (B) de um nanobud [18].

1.1.2. Carbono vítreo

Ao contrário das grafites moldáveis derivadas de precursores que grafítizam rapidamente e apresentam vários graus de anisotropia, características e propriedades muito idênticas ao cristal ideal de grafite, o carbono vítreo é processado pela carbonização (pirólise) de um precursor orgânico. Pelo facto de não grafítizar rapidamente as suas características e propriedades são essencialmente isotrópicas. O carbono vítreo apresenta uma estrutura, Figura 1.4, semelhante a materiais não cristalinos (vítreos) com um alto teor de lustro e características de fractura semelhantes ao vidro, daí a sua designação de carbono vítreo. Esta forma alotrópica é frequentemente designada por carbono polimérico dado que deriva em grande parte da carbonização de precursores poliméricos, levada a cabo sob pressão entre 1000 °C e 3000 °C. O carbono vítreo é um material relativamente recente desenvolvido nos anos de 1960, apresentando propriedades interessantes, como por exemplo, alta resistência mecânica, resistência a ataques químicos, entre outras [1,25,26].

Um precursor indicado para a formação de carbono vítreo deverá apresentar características bem definidas [27]: a estrutura da molécula deverá ser reticulada nas 3 dimensões, a carbonização deve ser desenvolvida no estado sólido, sem formação de mesofases e resultando na formação de um carvão. O peso molecular e o grau de aromaticidade devem ser elevados de modo a providenciar um elevado rendimento de carbono.

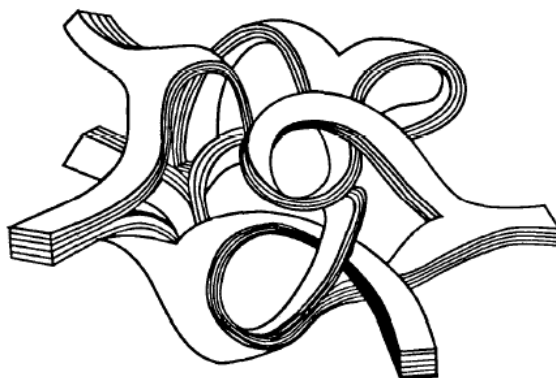


Figura 1.4 – Estrutura do carbono vítreo [26].

Exemplos de precursores são o polifurforil álcool, vários fenóis, poliamidas, poliacrilonitrilos e celulose. O precursor polimérico é habitualmente combinado com outros materiais, *p.e.*, solventes, por forma a obter as características de moldagem e carbonização do produto final. Após a carbonização o material residual é essencialmente todo carbono e do ponto de vista estrutural um carbono vítreo. A substância é considerada vítrea quando não apresenta uma ordem de longo alcance do tipo cristalino, *i.e.*, quando o arranjo dos seus constituintes moleculares é apenas algumas vezes o tamanho de cada constituinte [25,26]. No caso do carbono vítreo esta característica representa pequenas cristalites, de espessura até ~3 nm, orientadas aleatoriamente. Dentro de cada cristalite as distâncias interatómicas desviam-se do cristal ideal para mais de 5% entre o plano basal e entre planos. Julga-se que esta estrutura aleatória tem a forma de uma rede longa e estável de fitas grafíticas, apresentando ligações reticulares do tipo C-C covalentes. Foi sugerido que a estrutura do carbono vítreo apresenta algumas ligações do tipo sp^3 para além das típicas sp^2 da grafite. Esta presença contribui para as características de isotropia, elevada resistência mecânica e dureza do material [26,28-32].

O carbono vítreo pode ser dividido em 3 tipos básicos, diferindo apenas na macroestrutura [26]: sólido ou monolítico, espuma ou reticular, esferas ou partículas. O carbono vítreo na forma reticulada (RVC – *reticulated vitreous carbon*) é obtido da mesma forma que o carbono vítreo sólido, excepto no que diz respeito a permitir uma reticularização do precursor antes da carbonização [33]. O RVC pode ser empregue como

eléctrodo devido a ser quimicamente inerte, ter uma janela de potencial ampla, e a sua hidrodinâmica e vantagens decorrentes da sua estrutura porosa.

1.1.3. Grafite pirolítica e filmes de carbono

A produção de grafite moldada e carbono vítreo é baseada num processo de carbonização, pirólise, de um sólido. Um processo alternativo conhecido por deposição química de vapor (CVD – *chemical vapour deposition*) de carbono tem como produtos carbono pirolítico ou grafite também referido como pirocarbono ou pirografite. Ao contrário dos materiais atrás descritos, a grafite pirolítica (PG) tem a sua aplicação como revestimentos depositados em substratos como por exemplo, grafite moldada, fibras de carbono, ou estruturas carbono-carbono porosas [26].

Os materiais baseados em CVD de carbono vêm reportados no trabalho de Powell *et al.* [34] como tendo sido desenvolvidos nos anos de 1880 na produção de lâmpadas incandescentes. A CVD de grafite pirolítica é um processo teoricamente simples e baseado na decomposição térmica de um hidrocarboneto gasoso. Na realidade o mecanismo desta decomposição é bastante complexo e não total entendido [35]. A pirólise do precursor envolve uma série de reacções envolvendo moléculas cujo tamanho aumenta gradualmente. Por exemplo, no caso do metano, a sequência de deposição é: metano, benzeno, hidrocarbonetos poliaromáticos, carbono [35,36].

A PG é um agregado de cristalites grafiticos cuja dimensão pode atingir diversas centenas de nanómetros: tem uma estrutura turboestrática usualmente com muitos planos basais embrulhados, defeitos de estrutura e imperfeições cristalinas [26]. Dentro do agregado as cristalites apresentam vários graus de orientação: quando estes são essencialmente paralelos entre eles a natureza e as propriedades da PG são semelhantes ao do cristal de grafite ideal. A estrutura da PG pode ser colunar, laminar ou isotrópica, dependendo das condições de deposição, como é o caso da temperatura, pressão e composição dos gases de entrada [34,36,37].

Os filmes de carbono e de grafite têm sido preparados por evaporação em vácuo [38-41], pirólise [42-49], impressão [50-55], e por fotoactivação por laser [56] de locais num substrato de grafite ou carbono vítreo. Outras técnicas baseadas em

pulverização por ressonância electrónica de ciclotrão têm sido propostas obtendo-se um filme do tipo gráfitico constituídos por carbonos sp^2 [15,57].

Vários processos pirolíticos têm sido utilizados com sucesso, sendo a maioria baseado em deposição de precursores voláteis. Por exemplo, o metano pode ser pirolizado através da passagem por um substrato do tipo carbono vítreo a 1000°C [44], vitrocerâmica a 926 °C [45] ou em quartzo aquecido a temperaturas moderadas [42]. O etileno pode ser reduzido cataliticamente a 550 °C num filme de níquel depositado em vidro, obtendo-se propriedades semelhantes ao carbono vítreo [46]. Outros compostos de maior peso molecular podem ser sublimados a baixas pressões e pirolizados num substrato de quartzo a 850 °C [47] ou platina a 1000 °C [43]. Um filme fino de poliacrilonitrilo é depositado num substrato de quartzo e pirolizado em seguida a 1000°C formando um filme de carbono cuja espessura é controlada pela espessura do filme inicial [48].

1.1.4. Nanotubos de carbono

Os nanotubos de carbono (CNT – *carbon nanotubes*) são formados por arranjos hexagonais de carbono que originam pequenos cilindros, usualmente com diâmetro de poucos Å a algumas dezenas de nm enquanto que o comprimento pode variar de várias centenas de nm a vários µm [58,59].

Do ponto de vista estrutural, os CNT podem ser classificados em nanotubos de parede simples (SWCNT – *single walled carbon nanotubes*) e os de paredes múltiplas (MWCNT – *multi-walled carbon nanotubes*). Os primeiros são constituídos apenas por uma única folha de grafeno enrolada sobre si mesma formando um tubo cilíndrico de diâmetro da ordem de 0,2 nm a 2,0 nm enquanto que os MWCNT envolvem múltiplas folhas de grafeno enroladas de forma concêntrica, cujo diâmetro coaxial varia entre 2 nm a 100 nm, com uma distância entre camadas de 0,34 a 0,36 nm [58,60].

A estrutura de um SWCNT pode ser definida [60-62] utilizando um vector de enrolamento \mathbf{r} e um ângulo quiral θ , Figura 1.5(A). O vector de enrolamento é definido como uma combinação linear dos vectores base \mathbf{a} e \mathbf{b} do hexágono de acordo com

$$\mathbf{r} = n\mathbf{a} + m\mathbf{b} \quad (1.1)$$

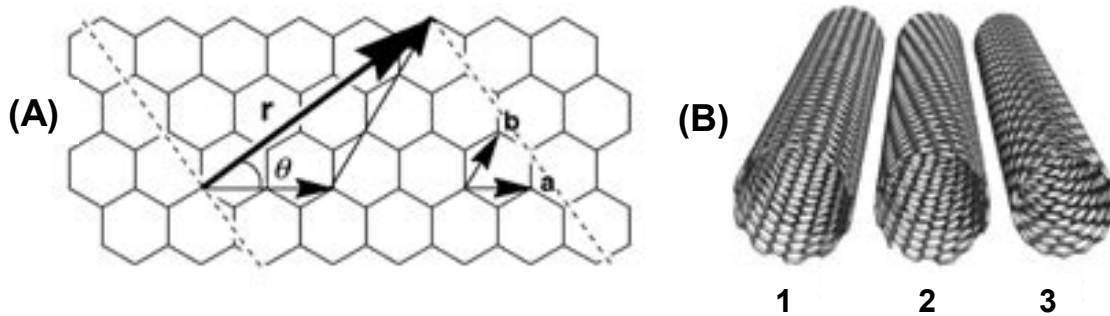


Figura 1.5 – (A) Esquema ilustrativo do modo de enrolamento para formação de nanotubos cilíndricos partindo de uma folha planar de grafeno **a** e **b** são os vectores da estrutura hexagonal primitiva, **r** o vector de enrolamento e θ é o ângulo quiral. (B) Representação de um SWCNT ideal de terminais abertos sem defeitos com as estruturas: 1 – braço-cadeira metálico (10,10), 2 – quiral semiconductor (12,7) e 3 – zig-zag metálico (15,0). [60]

onde n e m são números inteiros. O vector de enrolamento é perpendicular ao eixo do nanotubo.

Deste modo, diferentes tipos de nanotubos podem ser definidos consoante os valores de n e m , sendo importante notar que a maneira pela qual a folha de grafeno é enrolada determina a estrutura dos nanotubos e as suas propriedades físicas. De acordo com estudos teóricos, os SWCNT podem ser metálicos ou semicondutores em função do seu diâmetro e do seu ângulo de quiralidade [60,63], Figura 1.5(B). Assim, se $n \pm 3 = m$ o CNT é metálico, enquanto que para outras combinações de n e m o CNT apresenta carácter de semiconductor. Na Figura 1.6 encontram-se as estruturas ideais de um MWCNT sem defeitos.

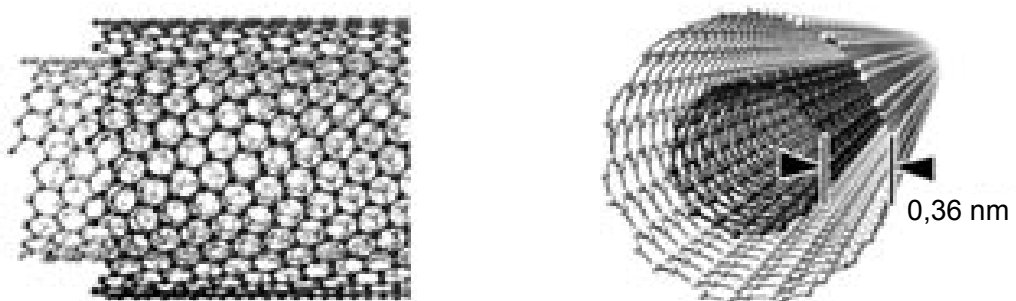


Figura 1.6 – Representação de uma estrutura ideal de MWCNT sem defeitos [60].

A razão entre o comprimento e o diâmetro dos nanotubos é superior a 1000, sendo por isso considerados como uma estrutura unidimensional [60,61,64,65]. A estrutura molecular única resulta em propriedades macroscópicas muito interessantes, incluindo elevadas resistividade mecânica, condutividade eléctrica e resistência térmica. Por exemplo, a densidade de corrente 10^7 – 10^9 A cm⁻² é cerca de 3 vezes superior à do cobre, a condutividade térmica de 1750–5800 W mK⁻¹ é comparável à do diamante e o módulo de Young é cerca de 1,2 Tpa, *i.e.*, superior ao do diamante [59]. Um artigo de revisão sobre as características dos nanotubos de carbono foi recentemente publicado [66].

As propriedades únicas dos nanotubos de carbono conduziram às mais variadas aplicações em muitos campos como a electrónica, medicina, indústria aeroespacial, entre outros, forçando também o desenvolvimento de metodologias analíticas para a sua caracterização e controlo de qualidade [67]. No campo da química analítica e da electroquímica inúmeros trabalhos de investigação têm sido dedicados aos nanotubos de carbono desde a sua síntese, purificação e aplicação, com artigos de revisão recentemente publicados.

Nas últimas décadas a síntese de nanotubos de carbono teve uma evolução muito significativa. Os métodos mais utilizados são a descarga de arco eléctrico, vaporização por laser e decomposição catalítica de hidrocarbonetos, também designada por CVD [68]. Outros métodos têm sido empregues na síntese de CNT, incluindo redução assistida [69], aquecimento óhmico [70], metátese de estado sólido [71], moagem [72], quebra de hidrocarbonetos líquidos [73], radiação solar concentrada [74], métodos baseados em chama [75] e electrólise de sais de haletos fundidos [76].

Como consequência do processo de fabrico, os nanotubos de carbono contém também carbono amorfo, catalisador metálico e de alguns resíduos. Além disso, os métodos de produção actualmente existentes produzem nanotubos de vários comprimentos, diâmetros e estruturas, resultando numa falta de consistência nas propriedades dos nanotubos e, portanto, incerteza quanto às suas aplicações. Os rendimentos provenientes destes procedimentos podem variar de 50 a 90%, com os produtos secundários indesejáveis carbono amorfo, grafite e fulerenos [77].

Os CNT podem ser purificados através de solventes e microfiltração [78,79], por floculação com tensioactivos [80,81] e por oxidação [82].

A utilização dos nanotubos em química encontra-se limitada por estes não formarem dispersões homogêneas. Diversas metodologias podem ser encontradas na literatura para minimizar este efeito, as quais são enquadradas em três grupos [77]: (i) dispersão após tratamento oxidativo com ácidos; (ii) estabilização não-covalente e (iii) estabilização covalente.

1.2 Sensores electroquímicos

1.2.1. Definição

De acordo com a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), um *sensor químico* pode ser definido como um dispositivo pequeno que, como resultado dum processo de interacção química, transforma informação química ou bioquímica num sinal que permite a análise qualitativa e/ou quantitativa de um analito [83]. Idealmente, estes dispositivos devem responder continuamente e de forma reversível, não perturbando a amostra [84].

Os sensores químicos são constituídos por um transdutor coberto por um elemento de reconhecimento químico, Figura 1.7. Este elemento de reconhecimento interage com o analito, resultando em alterações químicas que são traduzidas pelo transdutor num sinal mensurável. Este sinal é, normalmente, um sinal electrónico cuja magnitude é proporcional à concentração de uma espécie química ou a um conjunto de espécies químicas [85].

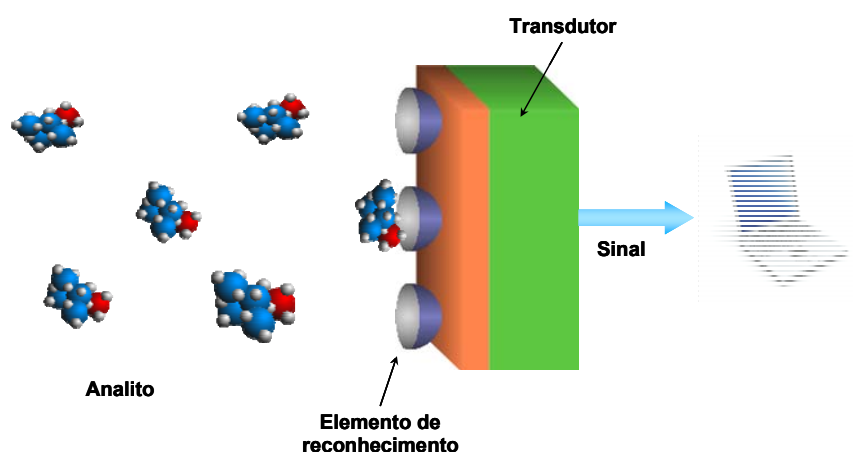


Figura 1.7 – Esquema de um sensor químico. Adaptado da Ref [86].

A obtenção de informação analítica depende essencialmente da capacidade do elemento de reconhecimento, usualmente posicionado na extremidade do dispositivo, em reconhecer a espécie de interesse de maneira selectiva. Há inúmeras alternativas de imobilização deste elemento na superfície do sensor e um aspecto relevante associado a esta operação prende-se com a necessidade de acesso a algum processo químico que viabilize a transdução do sinal para o detector. Por sua vez, o sinal transmitido deve ser maximizado em relação às informações sobre o analito, ou seja, pretende-se minimizar o efeito de contribuições estranhas como, por exemplo, de interferentes, ruído electrónico ou erros experimentais. Neste sentido, um aspecto de grande importância na produção de sensores de uso geral e em larga escala reside na capacidade efectiva do dispositivo na distinção do analito, devendo também considerar-se outros aspectos referentes à sensibilidade, estabilidade e robustez [87].

O elemento de reconhecimento desempenha um papel fundamental na resposta do sensor, uma vez que é responsável pela sua selectividade a um determinado analito ou a um grupo de analitos, evitando interferências de outras substâncias. Este elemento pode ser de origem biológica (enzimas, ácidos nucleicos, anticorpos, ou mesmo tecidos) denominando-se o sensor por biossensor. O analito detectado através dos biossensores pode ser puramente químico (orgânico ou inorgânico) ou de natureza biológica [85]. Dentro destes sensores, o material sensitivo biológico deve agir como um catalisador e catalisar a reacção de compostos químicos ou bioquímicos para a obtenção dos sinais de saída [88-90].

No que diz respeito ao transdutor, este pode ser óptico, piezo-eléctrico, térmico, ou electroquímico, sendo esta uma outra forma de classificação dos sensores, ou seja, de acordo com o princípio de operação do transdutor. Os sensores electroquímicos representam uma subclasse importante dos sensores químicos, nos quais o elemento de transdução utilizado é um eléctrodo. A combinação destas duas formas diferentes de classificação deu origem a um novo tipo de sensores designados por biossensores electroquímicos, onde os métodos electroquímicos são aplicados para a sua construção e funcionamento [88].

1.2.2. Tipos de sensores electroquímicos

Existem essencialmente três tipos de sensores directamente ligados às técnicas electroanalíticas que podem ser efectuadas [91-93]:

(a) *Conductimétricos* – A concentração de carga (condutividade) é obtida através de medições de resistência da solução, pelo que não é um sensor selectivo de espécies presentes em solução. No entanto, as medidas condutimétricas podem ser bastante úteis em situações onde seja necessário verificar se a concentração total iónica é inferior a um determinado valor máximo permitido ou, em casos de detecção *on-line*, após separação de misturas através de cromatografia iónica.

(b) *Potenciométricos* – O potencial de equilíbrio de um eléctrodo indicador é medido em relação a um eléctrodo de referência utilizando um voltímetro de elevada impedância, *i.e.*, de corrente nula. No caso de um eléctrodo redox inerte, como, por exemplo, um eléctrodo de platina utilizado como eléctrodo indicador, o potencial medido é o de mistura, sendo o seu valor dependente de todas as espécies presentes em solução e respectivas concentrações. A escolha adequada do material de eléctrodo pode influenciar a resposta para um ião em particular, ou seja, aumentar a selectividade da técnica, com interferência mínima na medida do potencial por parte dos outros iões em presentes em solução. Um dos exemplos típico deste tipo de eléctrodos, conhecidos como eléctrodos selectivos de iões, é o eléctrodo de pH. Os limites de detecção destes eléctrodos são da ordem de 100 nm L^{-1} da concentração total do ião presente num determinado estado de oxidação, mas as diferenças nas medidas na concentração podem descer até 10 pmol L^{-1} . Estas medidas são dependentes da exactidão e da precisão do circuito de medida externo.

(c) *Amperométricos e Voltamétricos* – A corrente é registada em função do potencial aplicado, podendo ser obtidas mais informações acerca das espécies em solução e atingidos menores limites de detecção. Em diferentes valores de potencial, várias espécies em solução podem reagir, e ser determinadas quase em simultâneo numa mesma experiência, sem ser necessário recorrer a separações prévias. Nas técnicas voltamétricas os limites de detecção são da ordem dos pmol L^{-1} , utilizando-se técnicas de pré-concentração do analito na superfície do eléctrodo e instrumentação adequada e desenvolvida para esse efeito. Após o estudo do perfil voltamétrico, podem

ser empregues sensores *amperométricos* a potencial fixo. Neste caso, o potencial aplicado ao eléctrodo promove a reacção das espécies que se pretendem determinar, originando uma corrente, que é proporcional à concentração da espécie em solução se o potencial aplicado for devidamente escolhido. Se for adicionalmente empregue a situação de estado estacionário de convecção, é medida uma corrente constante se a concentração das espécies electroactivas for uniforme.

As vantagens de utilização de um sensor electroquímico para, por exemplo, monitorização ambiental dizem respeito aos aspectos esquematizados na Figura 1.8, e são de entre outras [92]:

⇒ Em sensores voltamétricos, o potencial aplicado pode ser escolhido de tal modo que seja obtida uma maior selectividade e especificidade em cada medida, permitindo deste modo estudos de especificação. Dado que cada espécie e elemento químico, bem como os seus estados de oxidação, apresentam um potencial característico para a oxidação e redução, é possível obter uma grande especificidade na análise. Idealmente, os potenciais de eléctrodo dos pares redox devem ser suficientemente afastados para que não exista qualquer interferência entre espécies. Uma maior selectividade neste tipo de sensores está relacionada com a correcta escolha das condições para o estudo da reacção de eléctrodo, como sejam, por exemplo, o material do eléctrodo, modificação da sua superfície, utilização de técnicas de varrimento de potencial [1]. É possível obter ainda informações sobre a cinética e o mecanismo de reacção através da mesma série de experiências.

⇒ A escolha do material de eléctrodo pode permitir uma maior selectividade, imprescindível, nos eléctrodos potenciométricos selectivos de iões. Em sensores voltamétricos torna-se também importante essa escolha, uma vez que é possível minimizar problemas de interferentes na análise que se pretende efectuar, por exemplo, por escolha de um material que não reaja com determinadas espécies.

⇒ A instrumentação electroquímica mais moderna com a utilização de programas mais elaborados, particularmente no caso de técnicas de potencial controlado associadas a sensores voltamétricos, permite o controlo do potencial em conjunto com a possibilidade de acumulação das espécies no eléctrodo. Desta forma, permitindo um aumento da sensibilidade e diminuição dos limites de detecção.

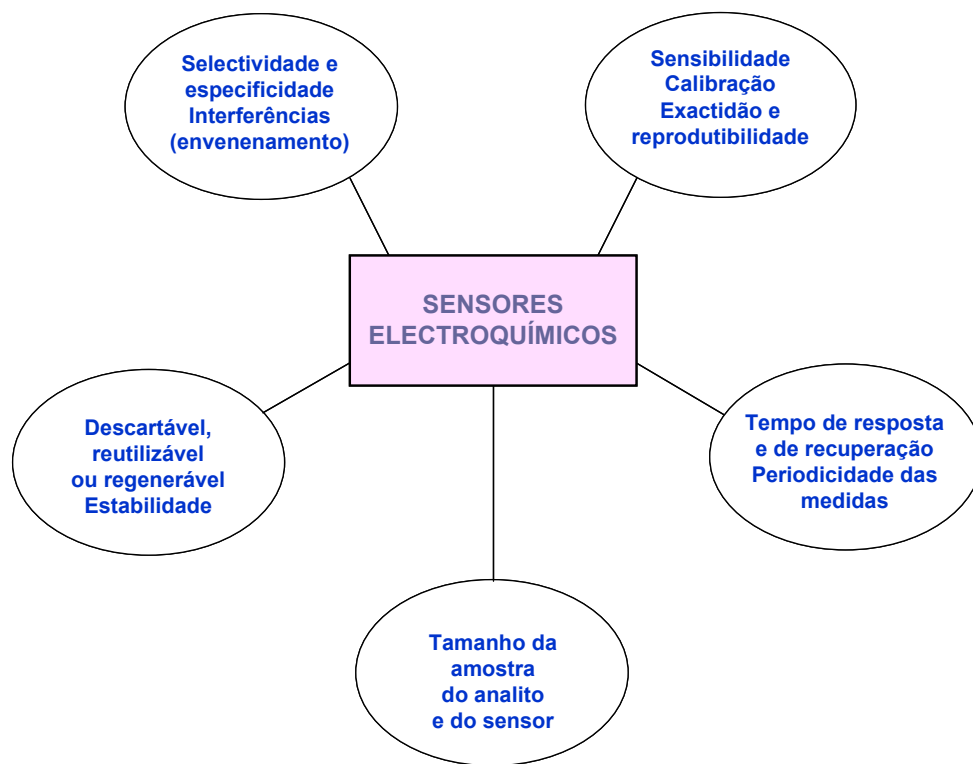


Figura 1.8 – Aspectos importantes na escolha de sensores electroquímicos para monitorização ambiental. Adaptado da Ref. [92].

- ⇒ A utilização de controlo computadorizado, dá a possibilidade de medição e análise em tempo real, e no caso de sistemas em fluxo, permite uma monitorização *on-line*.
- ⇒ Possibilidade de realização de ensaios fora do laboratório utilizando sensores portáteis.
- ⇒ Possibilidade de miniaturização dos sensores, para que possam ser empregues em situações onde outras técnicas e sondas não sejam utilizáveis.
- ⇒ Desta forma, as características mais importantes a serem desenvolvidas na pesquisa de um sensor electroquímico são a sensibilidade, selectividade, estabilidade, precisão, resposta rápida, facilidade de uso, baixo custo e robustez.

1.3 Materiais para sensores electroquímicos

A aplicação de um material como eléctrodo num sensor electroquímico está dependente de um elevado número de critérios de design, de forma a que todos os

benefícios possam ser obtidos como elevada sensibilidade, exactidão e reprodutibilidade dos resultados assim como um baixo limite de detecção para um número grande de analitos. Deste modo, para que um material possa ser utilizado como sensor electroquímico deve apresentar as seguintes características [94,95]:

- janela de potencial larga;
- elevada sobretensão para o hidrogénio e o oxigénio;
- baixa corrente residual (baixa porosidade/rugosidade);
- baixa resistência óhmica;
- possibilidade de uma regeneração simples da superfície.

A escolha de um material de eléctrodo depende de uma forma clara da zona de potenciais úteis do eléctrodo no solvente utilizado e das qualidades e pureza do material. O intervalo de potenciais úteis é limitado por factores como [1]:

- oxidação ou redução do solvente;
- decomposição do electrólito suporte;
- oxidação/redução, dissolução do eléctrodo ou formação de uma camada na sua superfície de uma substância isoladora/semicondutora.

Os eléctrodos sólidos podem ainda ser influenciados por contacto com soluções contendo contaminantes o que promove o envenenamento do eléctrodo e a sua subsequente perda de utilidade. É também habitualmente necessário que, na região de potenciais em que o eléctrodo será utilizado, este seja quimicamente inerte.

De entre os materiais utilizados em electroanálise de metais pesados, o eléctrodo de mercúrio ocupa um lugar de destaque. O desenvolvimento de métodos voltamétricos esteve sempre ligado ao eléctrodo de mercúrio. Devido à elevada toxicidade deste, estando em primeiro lugar na lista de materiais perigosos, causando envenenamento severo e doenças graves, alguns países proibiram a sua utilização em baterias, lâmpadas, termómetros, entre outras utilizações comuns [2]. Em electroanálise, os eléctrodos sólidos preparados com materiais não tóxicos pretendem substituir o mercúrio, sendo que os eléctrodos à base de materiais de carbono representam uma alternativa bastante promissora.

1.4. Eléctrodos quimicamente modificados

A denominação *eléctrodo quimicamente modificado* (CME – *chemically modified electrode*) foi introduzida na química electroanalítica por Murray e colaboradores [96,97] em 1975, para designar eléctrodos com espécies quimicamente activas convenientemente imobilizadas na superfície desses dispositivos. O objectivo desta modificação é pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eléctrodo/solução, alterando a reactividade e selectividade do eléctrodo (sensor) base, permitindo o desenvolvimento de eléctrodos com vista a diversas aplicações [98,99].

Num eléctrodo modificado, a superfície do eléctrodo pode ser propositadamente alterada por adsorção irreversível directa, por ligação covalente a sítios específicos da superfície do eléctrodo, por recobrimento com filmes poliméricos ou, ainda, na preparação de eléctrodos à base de pasta de carbono, com um modificador pouco solúvel em água para a sua adsorção neste tipo de substrato [100]. Os compostos modificadores são seleccionados de acordo com o analito que se pretende determinar, bloqueando o acesso directo e/ou inibindo processos de eléctrodo, e promovendo outros, permitindo deste modo uma maior selectividade nas análises [1].

A preparação de um CME, que pode ser efectuada através de vários procedimentos sumariados na Tabela 1.1., depende do material de eléctrodo (suporte) que deve apresentar características electroquímicas apropriadas e, também ser adequado para o método de imobilização pretendido. Os CME devem preencher as seguintes características [101]:

- Boa estabilidade mecânica e química.
- Correntes de fundo baixas.
- Facilidade de preparação com uniformidade de um eléctrodo para outro.

A modificação com filmes poliméricos consiste no recobrimento da superfície do eléctrodo com filmes poliméricos condutores ou permeáveis ao electrólito de suporte e ao analito de interesse. A modificação com membranas poliméricas permite a imobilização de várias monocamadas da espécie activa na superfície modificada, ampliando consideravelmente a resposta electroquímica [97].

Tabela 1.1. – Métodos de modificação da superfície dos eléctrodos.

| Modificações | Características |
|----------------------|---|
| Adsorção | Incorporação simples e rápida de compostos numa ampla gama de eléctrodos suporte. |
| Ligação covalente | Incorporação de um vasto número de substâncias, de maneira estável, através da manipulação da reactividade dos grupos funcionais existentes na superfície do eléctrodo. |
| Filmes poliméricos | Imobilização de policamadas da espécie activa na superfície do eléctrodo – Ampliação da resposta electroquímica. |
| Materiais compósitos | Possibilidade de modificação interna do material de eléctrodo. Exemplos: pasta de carbono, resina epóxida, poliestireno, entre outros. |

No caso de eléctrodos utilizados em voltametria de redissolução, a modificação dos eléctrodos com polímeros tem sido utilizada para reduzir fenómenos de adsorção, por exclusão selectiva das espécies interferentes e por protecção da superfície do eléctrodo [102]. O revestimento polimérico pode também permitir alcançar efeitos electrocatalíticos com uma consequente pré-concentração do analito no interior do filme [103-105], um benefício extremamente importante quando se pretendem detectar analitos em concentrações da ordem dos nanomolar. Os filmes poliméricos podem representar uma nova superfície de eléctrodo, ou seja, filmes formados por polímeros condutores ou polímeros redox, ou podem ser semi-permeáveis, seleccionados de forma a permitir a passagem dos analitos requeridos para a superfície do eléctrodo impedindo que outros compostos adsorvam na superfície ou sofram reacções de eléctrodo.

Nas próximas secções discutir-se-ão sucintamente as várias modificações de eléctrodo que foram utilizadas no decorrer deste trabalho, tendo em vista aplicações em sensores electroquímicos e em biossensores enzimáticos electroquímicos.

1.4.1 Modificações de eléctrodos utilizadas

Filmes de bismuto

Desde o ano 2000, com os trabalhos de Wang e colaboradores [95], que a modificação de eléctrodos com filmes de bismuto (BiF – *bismuth film electrode*) se tornou bastante atractiva para a substituição do mercúrio em determinações electroanalíticas [5,106]. O bismuto é um elemento químico amigo do ambiente, de baixa toxicidade, e de amplo uso em formulações farmacêuticas e de cosmética [107,108]. A vantagem da utilização de filmes de bismuto em análises voltamétricas advém da propriedade do bismuto formar “ligas” com metais pesados de uma maneira análoga à formação de amálgamas que o mercúrio forma com esses metais. As “ligas” podem ser binárias ou multi-componentes com uma variedade de metais pesados, incluindo o chumbo, cádmio, tálio, índio e gálio [5,106].

A modificação com filmes de bismuto pode ser realizada nos mesmos eléctrodos substrato que os filmes de mercúrio. Na maioria das vezes têm sido utilizados eléctrodos de várias formas de carbono de diferentes tamanhos e geometrias, com grande relevância para o carbono vítreo [95,109-128]. Outros eléctrodos de carbono como as fibras de carbono [95,114,129,130], eléctrodos de carbono impresso [131-133], nanotubos de carbono [134], pasta de carbono [114,135-139], grafite pirolítica [140] e também em resistências de filme de carbono [10,141], têm sido utilizados para o desenvolvimento de sensores electroquímicos com base em BiF.

Os filmes de bismuto podem ser preparados através de três formas diferentes: *in-situ*, *ex-situ* ou modificação por precursor de bismuto [106]. Na preparação *in-situ* o filme de Bi é electrodepositado através de uma solução que contém os iões Bi(III) e o analito que se pretende analisar, ou seja, o filme é depositado na superfície do eléctrodo durante a análise. A concentração de Bi(III) na solução deverá ser ~10 vezes superior à do analito por forma a evitar efeitos de saturação, com concentrações típicas no intervalo de 400–1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ [95,106,111,117,135]. A formação do filme ocorre através da reacção:



por aplicação de um potencial constante em regime de convecção forçada. O potencial aplicado e o tempo de deposição estão directamente dependentes das condições necessárias

à determinação do analito. A possibilidade de formação de $\text{Bi}(\text{OH})_3$ por hidrólise dos iões $\text{Bi}(\text{III})$ em meio alcalino ou neutro limita o pH da solução pelo que é geralmente necessário que a formação do filme *in-situ* seja efectuada em soluções ligeiramente ácidas. Existe ainda a possibilidade de formação de complexos estáveis $\text{Bi}(\text{OH})^{2+}$ solúveis em meio aquoso que podem sofrer redução electroquímica na superfície do eléctrodo [106].

A preparação *ex-situ* envolve primeiro a formação do filme de Bi no eléctrodo numa solução contendo os iões $\text{Bi}(\text{III})$, sendo depois este eléctrodo modificado transferido para a solução que contém o analito que se pretende analisar. A reacção química de deposição do filme envolvida é



onde a concentração dos iões $\text{Bi}(\text{III})$ varia entre 1–200 mg L^{-1} , em solução ácida [106]. A deposição deste filme pode ser realizada através da aplicação de potencial constante, corrente constante (10 mA cm^{-2} durante 300 s) ou por varrimento de potencial (20 ciclos entre -1.4 e -0.3 V a 50 mV s^{-1}) [141]. Apesar da formação de filmes de Bi *ex-situ* ser mais versátil que a *in-situ*, por permitir que os processos de deposição do filme e análise dos analitos sejam controlados individualmente, é um método mais complicado e moroso.

A terceira forma de modificação de eléctrodos com filmes de bismuto baseia-se na utilização de um precursor de bismuto (*p.e.*, Bi_2O_3) na preparação do eléctrodo. Este método é essencialmente utilizado em eléctrodos de pasta de carbono, onde o precursor pode ser incorporado facilmente no eléctrodo por mistura deste com a pasta de carbono. O filme de bismuto é gerado *in-situ*, sem necessidade de utilização de soluções de sais de $\text{Bi}(\text{III})$ [142].

Filmes de Nafion[®]

O Nafion[®], cuja estrutura química está representada na Figura 1.9, é um polímero perfluorado de troca catiónica e é o mais frequentemente utilizado no desenvolvimento de sensores electroquímicos de metais pesados. O material da membrana consiste num polímero perfluorado com unidades de tetrafluoropolietileno ($n = 5$ a 13), ligado a um éter que se encontra por sua vez ligado a um ácido sulfónico [143].

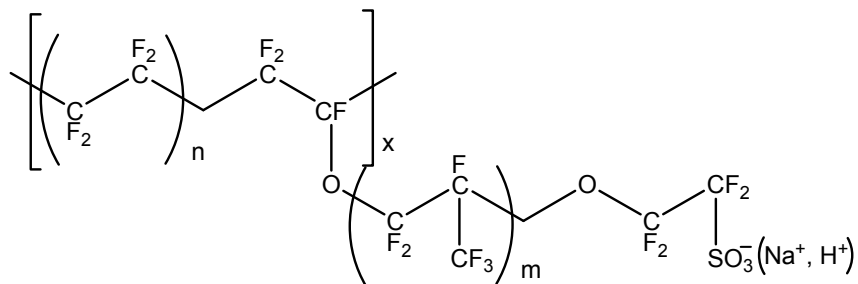


Figura 1.9 – Fórmula estrutural do Nafion adaptada da Ref. [86].

Quando a membrana é hidratada a sua estrutura solvatada é caracterizada por dois domínios [144,145]: um hidrofílico, associado ao grupo sulfónico, e outro hidrofóbico. A parte hidrofílica é responsável pela atracção dos catiões e onde a água é adsorvida, enquanto que a parte hidrofóbica é responsável por adsorção e estabilização de superfícies hidrofóbicas, como a superfície do eléctrodo de carbono vítreo.

O Nafion apresenta características ideais de membrana semi-permeável, ou seja, é insolúvel em água, não condutora e quimicamente inerte [146]. Os filmes de Nafion são geralmente preparados através da colocação de uma solução do polímero sobre o eléctrodo a modificar através do método de evaporação [146,147] ou por rotação [148], sendo as propriedades do filme resultante dependentes de muitos factores decorrentes do grau de hidratação do filme de Nafion formado. Deste modo, a concentração de água ou outros solventes na solução polimérica e a humidade relativa durante a secagem do filme são factores críticos na formação, estabilização e funcionamento do filme [149].

A dissolução do filme polimérico de Nafion e as características electroquímicas dos eléctrodos revestidos com Nafion foram estudados primeiramente por Martin *et al.* [150] tendo surgido posteriormente um elevado número de publicações.

O Nafion apresenta grande afinidade por catiões orgânicos hidrofóbicos, de acordo com os coeficientes de seletividade determinados por Espenscheid *et al.* [151]. A pré-concentração máxima obtida depende do tempo necessário para o equilíbrio filme-solução do analito ser alcançado, estando este dependente do tamanho, carga, estrutura e concentração do contra-íon do analito e da força iónica da solução do analito. A velocidade do equilíbrio filme-solução é limitada pela velocidade de difusão iónica no filme. As

membranas com maior velocidade de transporte do ião originam eléctrodos modificados com um tempo de resposta mais rápido [143].

Devido à carga negativa dos grupos sulfónicos na extremidade da cadeia do fluoropolímero, o Nafion pode ser misturado com outros polímeros sulfónicos com vista a um melhoramento das características de troca-iónica e aumento da discriminação contra interferentes [152].

Até há bem pouco tempo, os revestimentos de Nafion eram vastamente utilizados em modificação de eléctrodos de filmes fino de mercúrio (MTFE). Este era aprisionado na forma de microgotas entre o eléctrodo suporte (na maioria das vezes, eléctrodo carbono vítreo) e o filme de Nafion, colocado antes da electrodeposição do mercúrio, permitindo a utilização em análises de metais pesados com ultrassons e fora do laboratório por BIA (Batch Injection Analysis) [147,152-154]. Outras aplicações dos eléctrodos MTFE revestidos com Nafion incluem a electroanálise de cobre, zinco, chumbo e cádmio em amostras naturais como bebidas e fluídos biológicos [155-158].

Com o desenvolvimento de novos materiais de eléctrodo, com vista à total remoção do mercúrio em electroanálise de metais pesados, a modificação com Nafion de outros tipos de eléctrodos tem sido bastante utilizada, como por exemplo, em eléctrodos de filme de bismuto [122,159,160], nanotubos de carbono [161-163], em microeléctrodos de platina [164] e nesta dissertação em filmes de carbono [7-9] e filmes de carbono modificados com filmes de bismuto [10].

Filmes de hexacianoferrato de cobre

Os compostos de valência mista como os hexacianoferratos metálicos (MHCF, que incluem os metais de hexacianoferrato (II) e de hexacianoferrato (III)) têm suscitado grande interesse devido às suas propriedades electrocatalíticas, electrocrómicas, de troca-iónica, sensitivas de iões e fotomagnéticas [165-168]. Os hexacianoferratos metálicos sólidos apresentam aplicações em electrocatálise, electrocromismo, baterias de estado sólido e electroanálise, entre outros [165]. O crescente interesse neste tipo de compostos para modificações de eléctrodos, levando ao desenvolvimento dos mais variados sensores electroquímicos, baseia-se na possibilidade de obtenção de filmes com características

electroquímicas bem definidas quer a nível dos processos de oxidação-redução e propriedades de troca iónica quer na intercalação de componentes [169-171].

A história dos HCF iniciou-se com a descoberta do pigmento azul de Prússia há mais de 300 anos, composto obtido através de uma reacção de coordenação do complexo aniónico $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ com o catião Fe^{3+} . Esta reacção de coordenação é a mais antiga reportada na literatura [172]. No entanto, só mais recentemente tem havido um maior conhecimento das características electroquímicas dos HCF, especialmente daqueles em que os filmes são “insolúveis” em solução [171].

Os compostos MHCF são preparados através da mistura de soluções de hexacianoferrato de metal alcalino (II) ou (III) com um sal apropriado do metal de transição e apresentam uma fórmula geral, $\text{A}_h\text{M}_k[\text{Fe}(\text{CN})_6]_l \cdot m\text{H}_2\text{O}$ onde A é o catião de um metal alcalino, M é um ião de um metal de transição; e (h, k, l) são números estequiométricos. Deste modo, os hexacianoferratos de cobre (CuHCF) apresentam duas fórmulas gerais possíveis dependendo da valência do ião complexo de ferri ou ferrocianeto ($\text{K}_2\text{Cu}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]_2$ e $\text{Cu}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]_2$) [165].

Os MHCF apresentam uma estrutura cúbica de faces centradas, de célula unitária $\sim 10,2 \text{ \AA}$, com coordenação octaédrica entre o metal e o ferro por ligações $-\text{N}\equiv\text{C}$ e $-\text{C}\equiv\text{N}$, respectivamente. Os catiões do metal alcalino, necessários para compensação da carga eléctrica, estão situados nos locais tetraédricos da estrutura, onde podem coexistir moléculas de água e aniões. Na Figura 1.10 está representada uma estrutura para um MHCF com uma razão estequiométrica de metal: ferro 3:2, conforme a dos CuHCF.

Vários métodos têm sido utilizados para a modificação de eléctrodos com MHCF desde electrodeposição, adsorção, encapsulamento em matrizes poliméricas, deposição química autocatalítica, por colocação directa do filme de MHCF insolúvel no eléctrodo, e por camadas auto-montadas [173].

No caso dos filmes de CuHCF têm sido depositados em diferentes substratos como em Pt [174], Au [175], e em diversos tipos de eléctrodos de carbono, *p.e.*, carbono vítreo [169,175-178]; pasta de carbono [179-181]; grafite [182,183] e em resistências de filmes de carbono [184-187].

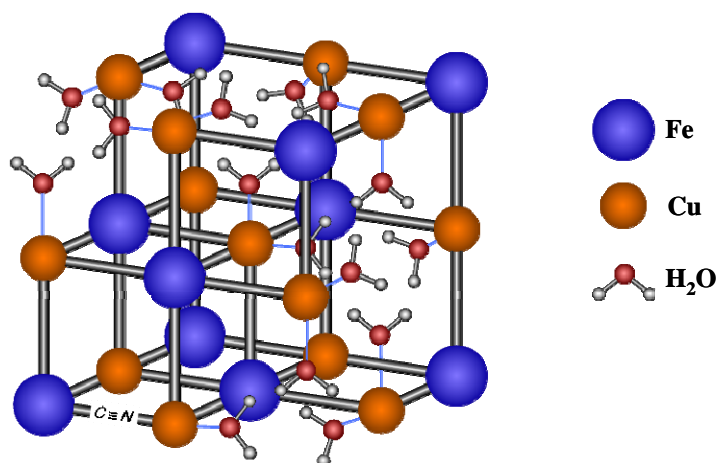


Figura 1.10 – Representação esquemática da estrutura de $M_3[Fe(CN)_6]_2$, na razão estequiométrica 3:2 de metal:ferro. Adaptado da Ref. [165].

Filmes de poli(vermelho neutro)

Os polímeros electroactivos, que representam uma classe de materiais orgânicos, são materiais de grande interesse devido ao facto exibirem condutibilidade electrónica e iónica quando sujeitos a determinadas soluções de electrólito. Apesar da existência de condutibilidade electrónica ter sido comprovada no poliacetileno [188], só após a descoberta da electropolimerização do pirrol [189] e da anilina [190] os polímeros electroactivos têm sido intensivamente estudados.

De entre estes compostos, as azinas representam um grupo com diversas aplicações na química electroanalítica como indicadores ou mediadores redox, sendo utilizadas na sua forma de monómero ou depois da electropolimerização [191-193]. Este grupo pode ser definido pela fórmula geral da Figura 1.11, onde o X = N, S, O, respectivamente para as fenazinas, fenotiazinas e fenoxazinas.

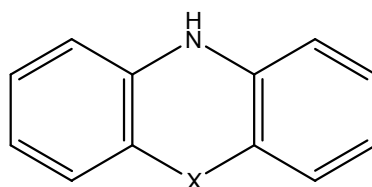


Figura 1.11 – Fórmula geral das azinas.

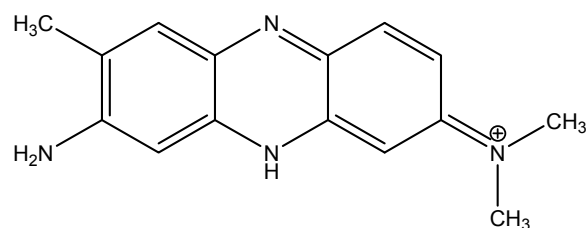
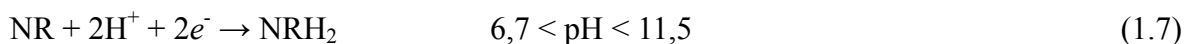
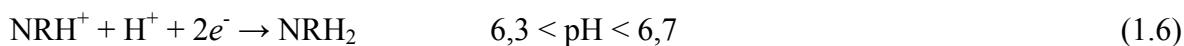
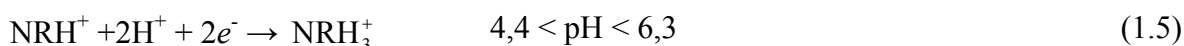
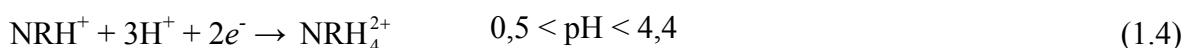


Figura 1.12 – Estrutura química do vermelho neutro (NR).

O composto fenazínico vermelho neutro, (NR – *Neutral Red*, N⁸,N⁸,3-trimetilfenazina-2,8-diamina), cuja fórmula estrutural está representada na Figura 1.12 tem sido utilizado para várias finalidades químicas e biológicas por exemplo coloração para marcadores biológicos [194,195], indicador de pH em sistemas bioquímicos [196], na determinação de DNA usando métodos ópticos e electroquímicos [197,198], no desenvolvimento de sensores ópticos [199], entre outras [6]. As propriedades químicas e electroquímicas do NR fazem com que seja uma substância ideal para a modificação de eléctrodos como mediador electrónico [200].

A electropolimerização do NR é facilitada pelo grupo aminico localizado no anel heteroaromático da sua estrutura química. O NR, como outros compostos fenazínicos, é electroactivo e pode ser oxidado electroquimicamente. A protonação do NR e do leuco-NR depende do pH da solução [201]:



representando NR o vermelho neutro e NRH₂ o leuco-NR.

Os radicais obtidos durante a reacção de oxidação do NR iniciam o processo de polimerização, sendo a estrutura do polímero dependente do número de radicais formados [201]. A polimerização do NR está também dependente do potencial aplicado que é responsável pela formação dos radicais, bem como, do pH [6,191,201-207].

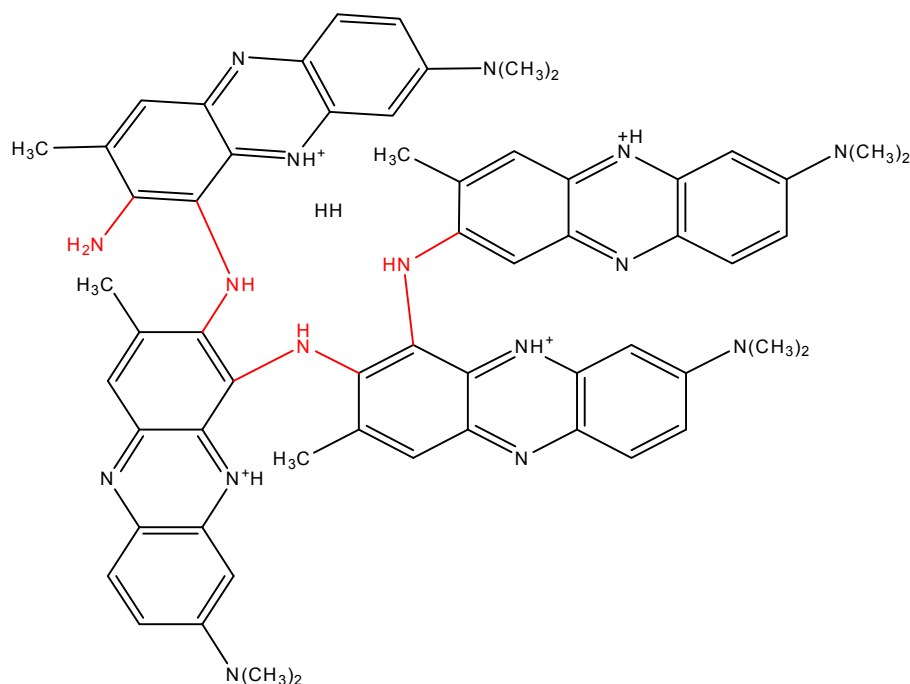


Figura 1.13 – Possível estrutura química de um tetramero do vermelho neutro.

O mecanismo de polimerização inclui a formação de radicais, dimerização e tetramerização dos monómeros que se combinam para formar o polímero via ligações C-N. O polímero resultante apresenta uma grande resistência mecânica e é fortemente adsorvido na superfície do eléctrodo, o que pode melhorar o carácter catalítico do eléctrodo [208,209], muito embora o comportamento e a sua estrutura não sejam ainda totalmente conhecidos. Uma possível estrutura química de um tetramero está ilustrada na Figura 1.13. Muitos estudos têm sido realizados para caracterizar o PNR [6] incluindo voltametria cíclica [204,210,211], espectroscopia de impedância electroquímica [212-214], espectroscopia de ultravioleta e visível (UV-VIS) e espectroscopia de infravermelho-transformadas de Fourier (FTIR) [204], microbalança de cristal de quartzo com electroquímica (EQCM – *electrochemical quartz crystal microbalance*) [213,215].

O PNR foi utilizado na modificação de eléctrodos de Au [210,216], ITO [210,212,214], e em substratos de carbono como o carbono vítreo [210,217], grafite [215], nanotubos de carbono [200,217,218], e em eléctrodos de filmes de carbono [187,219-225].

Filmes de sol-gel

Outra forma de modificar as superfícies dos eléctrodos envolve o encapsulamento a baixa temperatura de espécies de reconhecimento no interior de um filme de sol-gel. A utilização do processo de sol-gel para produzir materiais de sensores para aplicações analíticas tem atraído um grande interesse por parte dos investigadores [226,227]. Tal é devido a vários factores, como a facilidade de construção, flexibilidade no processo de síntese, estabilidade mecânica, serem inertes quimicamente, possibilidade de controlar a porosidade, fácil imobilização, inchamento negligenciável e permitem que a enzima oclusa na matriz de sol-gel mantenha a sua actividade enzimática [228-233]. As duas grandes vantagens de um sistema sol-gel são a sua capacidade de retenção de um alto teor de água, o que promove a estabilidade a longo termo da enzima [228,234], sendo que o processo pode ser realizado à temperatura ambiente [229,235,236].

O termo *sol* é utilizado para definir uma dispersão de partículas coloidais, de dimensão entre 1 e 100 nm, estável num fluído enquanto que o termo *gel* pode ser visto como sendo um sistema formado por uma estrutura rígida de partículas coloidais (gel coloidal) ou de cadeias poliméricas (gel polimérico) que imobiliza a fase líquida nos seus interstícios.

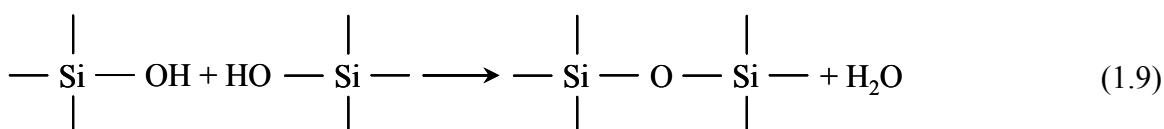
O processo de sol-gel pode ser dividido em duas classes dependendo da natureza do precursor inorgânico utilizado: dos sais (cloretos, nitratos, sulfetos, entre outros) e a dos alcóxidos. Nesta última a hidrólise de uma solução de tetralcoxissilanos num solvente orgânico, *p.e.*, etanol, leva à formação de partículas com grupo funcional silanol, as quais através de polimerização por condensação dão origem a um sol, e a continuação do processo produz um gel. Esta transformação é designada por transição sol-gel. Após a secagem do gel, forma-se um xerogel, silicato poroso com área de superfície porosa controlada [184,237,238]. As reacções químicas envolvidas na formação do sol, do gel e do xerogel influenciam fortemente a composição e as propriedades do produto final [227,236,239,240].

A reacção de polimerização sol-gel pode ser dividida em duas etapas [227,236,239,240] ilustrado com precursores oxissilano:

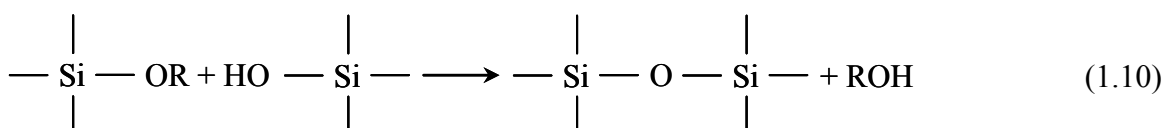
1. Hidrólise do grupo alcóxido com a formação dos grupos funcionais silanol:



2. Condensação do grupo silanol, que inicialmente leva à formação do sol e, eventualmente à formação do gel:



ou,



Do mecanismo de sol-gel apenas a primeira etapa, de hidrólise, é bem conhecida, pois as reacções de condensação ocorrem por um mecanismo bastante complexo que envolve muitas reacções de hidrólise e condensação ao mesmo tempo.

As reacções de hidrólise e condensação ocorrem por substituição nucleofílica bimolecular no átomo de silício. Uma vez que os alcóxidos de silício têm baixa reactividade, para promover o aumento da velocidade destas reacções são adicionados ao processo catalisadores ácidos, básicos e/ou nucleofílicos. Os catalisadores ácidos mais utilizados são o ácido clorídrico e a amónia; os básicos, o hidróxido de potássio; e os nucleofílicos os fluoretos de potássio e de hidrogénio, N-metilimidazol, hexametilfosforamida [227,235,236].

A razão molar água:silano, a natureza e a concentração do catalisador e o tipo de precursor alcóxido são parâmetros específicos que influenciam fortemente as velocidades relativas das reacções de hidrólise e condensação na formação do sol-gel. Em geral preparações com baixo valor de pH e baixo teor de água produzem materiais densos com poros pequenos, enquanto que preparações de pH alto e altos teores de água produzem materiais mais poroso [227,235,236,239-241]

Os materiais baseados em Si são sólidos inorgânicos que apresentam uma área de superfície de alta especificidade ($200\text{--}1500 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) e uma estrutura tridimensional com

muitos poros, de dimensão da ordem dos sub-micrómetros, interligados entre eles, formando uma cadeia polimérica de dimensão média superior a 1 μm [227,236] conforme se mostra esquematicamente na Figura 1.14, no encapsulamento de uma enzima na estrutura de gel de sílica. Esta estrutura porosa permite uma velocidade de difusão mais rápida dos analitos para um grande número de sítios de ligação, o que constitui um factor fulcral no desenvolvimento de sensores de elevada sensibilidade [242]. Por outro lado, a superfície de sílica pode ser modificada por uma grande variedade de moléculas orgânicas e inorgânicas de reactividade definida, promovendo assim o desenvolvimento de sensores para uma grande variedade de analitos. Quando aplicado em conjunto com a electroquímica estas propriedades podem ser exploradas com grande impacto em electroanálise (ou por ligação específica ou por reconhecimento preferencial), e/ou permitindo electrocatálise no eléctrodo modificado.

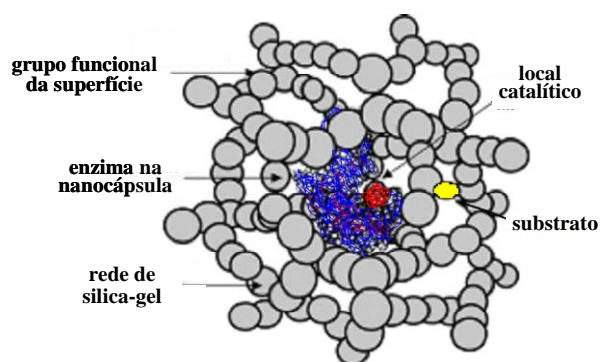


Figura 1.14 – Estrutura de gel de sílica com enzima encapsulada no seu interior. Adaptado da Ref. [257].

Os oxisilanos mais utilizados para a preparação de sensores são o tetrametiloxisilano (TMOS) [243-249], tetraetiloxisilano (TEOS) [250-254], aminopropiltrióxido (APTOS) [252,255], 2-(3,4-epoxiciclohexil)-etiltrimetoxisilano [238,255] e metil-trimetiloxisilano [237,252,256].

Os materiais de eléctrodo mais comuns utilizados para este tipo de modificações são metais, como o ouro [245], e diferentes tipos de eléctrodos de carbono em particular grafite [256], carbono impresso [258], pasta de carbono [243,256], carbono vítreo [251], e, mais recentemente, filmes de carbono [184,187,224,225]. O material de eléctrodo-substrato varia consoante o tipo de sensor e a aplicação em particular deste.

CAPÍTULO 2

MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO ELECTROQUÍMICA E MORFOLÓGICA

As técnicas electroquímicas descritas neste capítulo são as que foram utilizadas no decorrer deste trabalho. Dar-se-á mais ênfase à espectroscopia de impedância electroquímica (EIS), dado ser a técnica mais utilizada neste trabalho. Apresentar-se-ão apenas as informações mais relevantes e de aplicação imediata no trabalho para as técnicas de voltametria cíclica e de redissolução anódica, bem como das microscopias de força atómica e de Raman confocal. Uma informação mais detalhada sobre os fundamentos teóricos dos diversos métodos pode ser encontrada em vários livros da especialidade [1,84,91,94,259-261].

2.1. Alguns fundamentos de electroquímica

A electroquímica envolve os fenómenos químicos associados à separação de carga [1]. Esta separação pode conduzir à transferência de carga, ocorrendo homogeneamente em solução ou heterogeneamente na superfície do eléctrodo. De modo a assegurar a electroneutralidade, ocorrem duas ou várias reacções de transferência de carga em direcções opostas. As reacções de transferência de carga heterogéneas estão normalmente separadas no espaço e correm geralmente em eléctrodos diferentes imersos em solução numa célula electroquímica.

A maioria dos processos de transferência de carga envolve a transferência de electrões, sendo no caso mais simples de espécies oxidadas, O, e reduzidas, R, em solução representada esquematicamente



onde a espécie O, recebe n electrões para se transformar em R. O par O/R tem uma energia associada, energia redox, E_{redox} , que pode estar relacionada com o potencial de eléctrodo.

Os electrões num eléctrodo (que é um condutor) têm um máximo de energia distribuída em torno do nível de Fermi, E_F , sendo à volta deste que os electrões podem ser fornecidos ou recebidos. A aplicação de um potencial ao eléctrodo influencia o E_F , sendo os electrões transferidos de (reação de redução) ou para (reação de oxidação) o nível de Fermi.

A célula electroquímica é constituída por três eléctrodos: o *eléctrodo de trabalho* onde ocorre a reacção electroquímica cujo potencial é controlado através de um *eléctrodo de referência* com a ajuda de um potencióstato e um *eléctrodo auxiliar* por onde flui a corrente da célula electroquímica com o eléctrodo de trabalho através do electrólito de suporte. O eléctrodo de referência utilizado numa experiencia electroquímica deve possuir uma impedância elevada para que por ele não passe corrente mantendo o seu potencial constante. Os eléctrodos estão ligados no interior da célula electroquímica através do transporte iónico efectuado pelo electrólito de suporte e no exterior através de fios condutores, para que seja possível o transporte de carga.

Numa reacção electroquímica, ao ser aplicado um potencial bem definido ao eléctrodo de trabalho, as espécies electricamente carregadas vão ser atraídas electrostaticamente para a superfície do eléctrodo. Outras espécies presentes em solução podem também interagir com a superfície do eléctrodo de trabalho através da adsorção, pelo que para descrever um processo de eléctrodo é necessário considerar o transporte de espécies para a superfície do eléctrodo bem como a própria reacção de eléctrodo.

O movimento das espécies numa célula electroquímica, designado por transporte de massa, pode ser devido a efeitos de difusão (transporte de espécies devido a gradientes de concentração), de convecção (movimento mecânico do fluido) e de migração (movimento à interacção com campo eléctrico de partículas carregadas).

Em experiências electroanalíticas [91], a utilização de um electrólito de suporte em grande quantidade permite negligenciar os efeitos de migração. No caso da convecção (se esta existir é na maioria dos casos controlada exteriormente) é considerado que ocorra apenas numa camada nas proximidades da superfície do eléctrodo, designada por espessura da camada de difusão. Por seu turno, na proximidade da superfície do eléctrodo (*camada de difusão*) só ocorre transporte por difusão. Uma representação esquemática dos processos de eléctrodo conducentes à transferência de electrão pode ser encontrada na Figura 2.1.

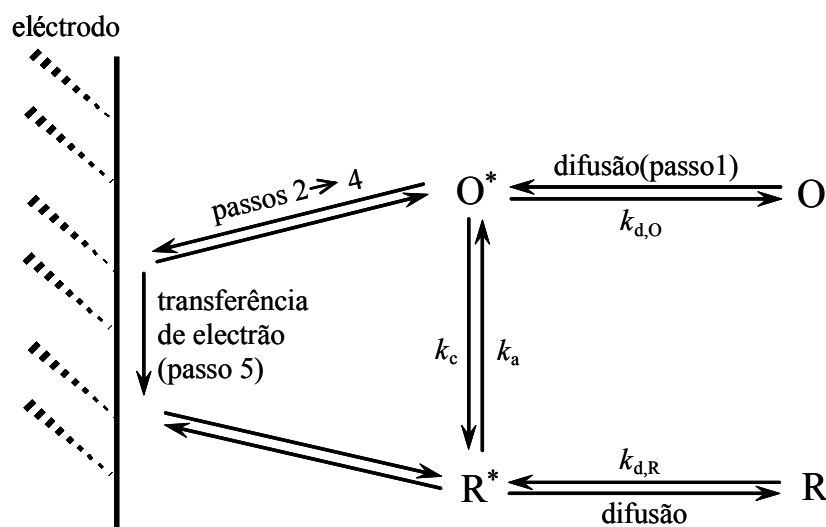


Figura 2.1 – Representação esquemática de um processo de transferência eletrônica num eléctrodo. No diagrama encontra-se a sequência dos processos envolvidos. Adaptado da Ref. [1].

No esquema da Figura 2.1 podem distinguir-se alguns parâmetros de elevada importância:

1) k_d – coeficiente de transferência de massa associado ao processo de difusão do interior da solução fora da camada de difusão, para a proximidade da superfície do eléctrodo. Este processo é descrito pelas leis de Fick [262,263].

2) k_a e k_c – constantes de velocidade de transferência de carga das reacções anódica e catódica, respectivamente. Estas constantes podem ser determinadas através das expressões de Butler-Volmer [264,265]:

$$k_a = k_0 \exp[\alpha_a n F (E - E^{\ominus}) / RT] \quad (2.2)$$

$$k_c = k_0 \exp[-\alpha_c n F (E - E^{\ominus}) / RT] \quad (2.3)$$

onde k_0 é a constante de velocidade padrão da reacção electroquímica; α_a e α_c são os coeficientes de transferência de carga anódico e catódico, respectivamente; E^{\ominus} é o potencial formal do sistema. Os valores de k_a e k_c dependem do potencial e da constante de velocidade padrão, k_0 , podendo considerar-se duas situações extremas:

➤ $k_0 \gg k_d$ – *reacção reversível*. Para todos os valores de potencial, atinge-se um estado de equilíbrio na superfície do eléctrodo, sendo possível aplicar a equação de

Nernst para qualquer potencial. Em virtude da reacção ser demasiadamente rápida, não é possível extrair qualquer informação cinética. A corrente é determinada apenas pelas diferenças de energia electrónica entre o eléctrodo e as espécies em solução e a velocidade com que estas alcançam a superfície do eléctrodo;

➤ $k_0 \ll k_d$ – *reacção irreversível*. Quando são atingidos potenciais bastante elevados para que ocorra a reacção, o transporte de massa não influencia a constante de transferência de carga, e o processo é controlado pela cinética de reacção lenta.

3) Formação da *dupla camada electrolítica*, que afecta a cinética das reacções de eléctrodo [266,267]. A dupla camada electrolítica é a região interfacial entre o eléctrodo e a solução onde ocorrem as reacções de eléctrodo, e apresenta a maior diferença de potencial no circuito eléctrico [91]. A designação de “dupla camada” reflecte os primeiros modelos desenvolvidos para descrever esta região. O conceito básico consistia num ordenamento de cargas positivas ou negativas na superfície do eléctrodo e num ordenamento em quantidade igual e de carga oposta na solução para neutralizar a carga do eléctrodo. A constante de proporcionalidade entre o potencial aplicado ao eléctrodo e a carga devida às espécies ordenadas na região interfacial é a *capacidade de dupla camada*.

Os efeitos da dupla camada eléctrica na cinética das reacções de eléctrodo podem ser minimizados através do uso de uma grande quantidade de electrólito inerte sendo as concentrações das espécies electroactivas muito mais baixas (<5 mM). No caso da utilização de microeléctrodos, esta adição para muitos tipos de experiências não é necessária pois as correntes obtidas são muito pequenas.

Em todas as experiências electroquímicas, considera-se que o eléctrodo de trabalho funciona como receptor de electrões durante uma reacção de oxidação e a corrente denominada de corrente anódica, I_a , tem um valor positivo. No caso da reacção de redução o eléctrodo de trabalho actua como dador de electrões e a corrente, corrente catódica, I_c , tem um valor negativo.

2.2. Técnicas voltamétricas

A voltametria consiste na medição da corrente que flui através do eléctrodo de trabalho em função de um potencial aplicado. A aplicação deste potencial ao eléctrodo de trabalho origina duas fracções de corrente: uma directamente relacionada com a transferência de carga, corrente faradaica, I_F , e outra necessária para organizar as moléculas e iões presentes na dupla camada do eléctrodo, a corrente capacitiva, I_C . A corrente total registada é:

$$I_t = I_C + I_F \quad (2.4)$$

No decorrer de uma experiência voltamétrica, o potencial aplicado e a corrente medida variam com o tempo. A curva de corrente em função de potencial $I = I(E)$ registada denomina-se por *voltamograma*.

Neste trabalho, utilizaram-se duas técnicas de varrimento de potencial: voltametria cíclica e voltametria de redissolução anódica de onda quadrada, as quais se descrevem em seguida.

2.2.1. Voltametria cíclica

A voltametria cíclica (*Cyclic Voltammetry, CV*) é muito utilizada como técnica exploratória do comportamento de compostos electroactivos e do mecanismo de oxidação e redução. Permite diagnosticar a reversibilidade de sistemas, assim como detectar a presença de passos químicos associados à transferência de carga e verificar a ocorrência de adsorção do reagente ou produtos nos eléctrodos [1,91].

Em CV, o potencial aplicado tem a forma de uma onda triangular, pelo que o varrimento é feito em duas direcções, conforme se mostra na Figura 2.2. O potencial aplicado varia de forma linear a uma velocidade de varrimento constante, $v = dE/dt$ entre um potencial inicial, E_i , e um potencial E_f , escolhidos previamente. Após ser atingindo um determinado tempo, t_λ , do início do varrimento de potencial, quando se atinge o valor E_{max} , o sentido do varrimento é invertido e é varrido até E_{min} . Normalmente o potencial de inversão corresponde ao valor máximo ou mínimo do intervalo de potencial escolhido. O varrimento prossegue variando sucessivamente entre E_{max} e E_{min} . O sentido do varrimento poderá ser negativo ou positivo.

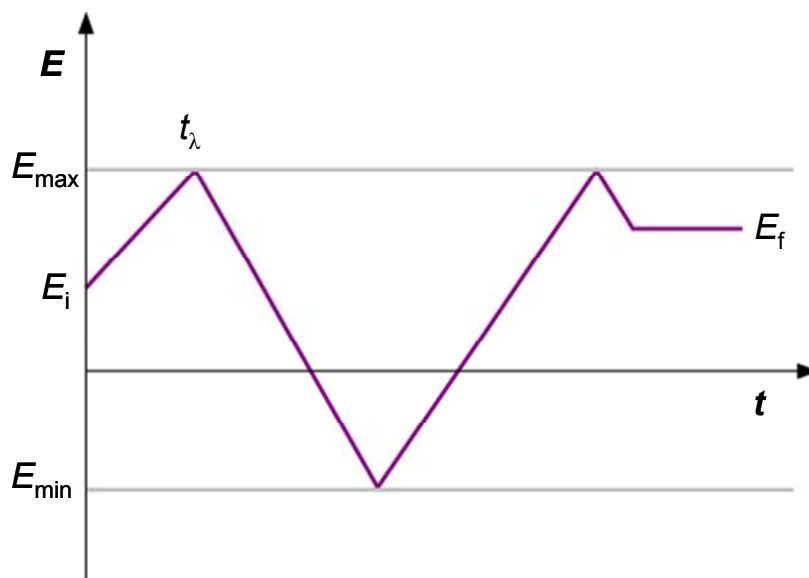


Figura 2.2 – Variação do potencial com o tempo em voltametria cíclica: E_i – potencial inicial, E_f – potencial final; E_{\max} – potencial máximo (neste caso corresponde também ao potencial de inversão, E_λ); E_{\min} – potencial mínimo; t_λ – tempo de inversão.

A corrente faradaica, devida à reacção de eléctrodo, é registada na zona de potenciais pré-definidos, intervalo escolhido de forma a que a reacção de eléctrodo possa ser acompanhada, juntamente com uma corrente capacitiva. A dupla camada varia com o varrimento de potencial, e a contribuição capacitiva aumenta com o aumento da velocidade de varrimento.

Os parâmetros mais importantes em voltametria são:

- a direcção do varrimento de potencial;
- a velocidade de varrimento;
- o potencial inicial, E_i ;
- o potencial máximo, E_{\max} ;
- o potencial mínimo, E_{\min} ;
- o potencial final, E_f .

O gráfico resposta intensidade de corrente em função do potencial, *voltamograma cíclico*, está representado na Figura 2.3. Este voltamograma cíclico é típico de um sistema

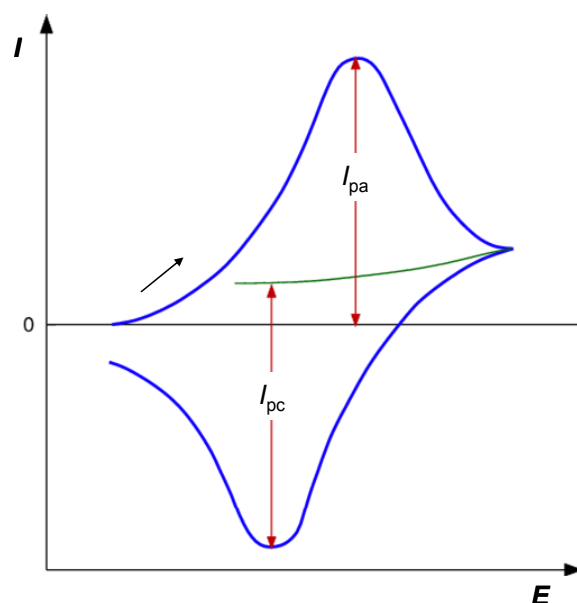


Figura 2.3 – Voltamograma cíclico de um sistema reversível.

reversível, podendo obter-se graficamente os parâmetros característicos com relativa facilidade. A forma da curva pode ser entendida da seguinte forma: ao alcançar o potencial onde ocorre a reacção de eléctrodo, a corrente sobe até atingir um máximo, *corrente de pico*, onde a concentração da espécie electroactiva é praticamente nula. Contudo, e devido ao gradiente de concentração provocado pelo consumo desta espécie, a corrente começa a diminuir, seguindo um perfil proporcional a $t^{1/2}$.

Mecanismo de transferência electrónica reversível

Considerando uma reacção de transferência electrónica simples de um sistema que contém apenas em solução a espécie oxidada, O:



a corrente faradaica observada depende da cinética e do transporte por difusão das espécies electroactivas. A forma da curva da Figura 2.3 pode ser calculada matematicamente, através da resolução da 2ª Lei de Fick para as espécies O e R

$$\frac{\partial[\text{O}]}{\partial t} = D_{\text{O}} \frac{\partial^2[\text{O}]}{\partial x^2} \quad (2.6)$$

$$\frac{\partial[\text{R}]}{\partial t} = D_{\text{R}} \frac{\partial^2[\text{R}]}{\partial x^2} \quad (2.7)$$

atendendo às condições condições fronteira [1]:

$$t=0 \quad x=0 \quad [\text{O}]_* = [\text{O}]_{\infty} \quad [\text{R}]_* = 0 \quad (2.8)$$

$$t>0 \quad x \rightarrow 0 \quad [\text{O}]_* \rightarrow [\text{O}]_{\infty} \quad [\text{R}]_* \rightarrow 0 \quad (2.9)$$

$$t>0 \quad x=0 \quad D_{\text{O}} \left(\frac{\partial[\text{O}]}{\partial x} \right)_0 = D_{\text{R}} \left(\frac{\partial[\text{R}]}{\partial x} \right)_0 = 0 \quad (2.10)$$

$$0 < t \leq \lambda \quad E = E_i - vt \quad (2.11)$$

$$t > \lambda \quad E = E_i - vt + v(t - \lambda)$$

onde λ é o valor de t quando o potencial é invertido. Uma última condição fronteira exprime o regime cinético da reacção de eléctrodo, sendo que no caso do sistema reversível é a equação de Nernst

$$\frac{[\text{O}]_*}{[\text{R}]_*} = \exp \left[\frac{nF}{RT} (E - E^{\ominus}) \right] \quad (2.12)$$

A solução da 2ª Lei de Fick considerando que a difusão é planar, pode ser expressa na forma

$$I = -nF[\text{O}]_{\infty} (\pi D_{\text{O}} \sigma)^{1/2} \chi(\sigma t) \quad (2.13)$$

onde $\sigma = v(nF/RT)$, $\sigma t = (E_i - E)(nF/RT)$, e v é a velocidade de varrimento. Desta forma, verifica-se que a corrente é dependente da raiz quadrada da velocidade de varrimento. Os valores de $\pi^{1/2} \chi(\sigma t)$ em função de $n(E - E'_{1/2})$ para uma difusão planar e a também com correcção esférica estão tabelados, podendo ser consultados, *p.e.*, em [1].

A solução para o valor máximo de corrente, I_p , é conhecida como a equação de Randles-Sevcik [268,269] que a 25 °C, se resume a:

$$I = -2,69 \times 10^5 n^{3/2} A D_{\text{O}}^{1/2} v^{1/2} [\text{O}]_{\infty} \quad (2.14)$$

com A a área do eléctrodo em cm^2 , D_O o coeficiente de difusão da espécie em $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$, $[O]_\infty$ a concentração da espécie oxidada no seio da solução em mol cm^{-3} e v a velocidade de varrimento em V s^{-1} .

Através da equação de Randles-Sevcik podem ser deduzidos os critérios de diagnóstico para uma reacção reversível:

1. $I_p \propto v^{1/2}$
2. E_p independente de v
3. $\Delta E_p = |E_{pa} - E_{pc}| = 57,0/n$ (mV)
4. $|E_p - E_{p/2}| = 56,6/n$ (mV)
5. $|I_{pa} / I_{pc}| = 1$

A aplicação dos critérios de reversibilidade permite calcular o número de electrões envolvidos na reacção de transferência de carga. Se a reacção for reversível, o potencial formal de redução, $E^{\ominus'}$, pode ser estimado através de:

$$E^{\ominus'} = \frac{E_{pc} + E_{pa}}{2} \quad (2.15)$$

Estas condições de reversibilidade têm que ser verificadas em simultâneo, não sendo possível avaliar-se se um sistema é reversível apenas por uma qualquer das condições ser satisfeita. Quando não são verificadas, o sistema pode ser considerado como *quasi*-reversível ou irreversível, dependendo da extensão da irreversibilidade.

Mecanismo de transferência electrónica irreversível

Se a velocidade de transferência electrónica for lenta relativamente à escala de tempo da experiência (e deste modo relativamente lenta à velocidade de transporte de massa por difusão) então, as concentrações das espécies intervenientes na reacção de eléctrodo não são *Nernstianas*. O efeito qualitativo será um desvio do pico catódico para potenciais mais negativos e do pico anódico para potenciais mais positivos. Assim, um sistema que a baixa velocidade de varrimento se comporta como reversível, pode mostrar-se como não-reversível quando se aumenta a velocidade de varrimento.

Os critérios de diagnóstico para reacções totalmente irreversíveis são [1]:

1. $|E_p - E_{p/2}| = 47,7/(\alpha n')$ mV
2. $\left| \frac{\partial E_{pa}}{\partial \lg v} \right| = \frac{29,6}{\alpha n}$ mV
3. E_p dependente de v

com n' o número de electrões transferidos no passo determinante, e α o coeficiente de transferência de carga electroquímica.

O voltamograma cíclico de um sistema electroquímico irreversível pode apresentar picos de corrente que não têm associados quaisquer picos no varrimento inverso. A região de escala de tempo (ou de v) intermédia entre a dos processos reversíveis e irreversíveis é denominada de *quasi-reversível*. No caso de sistemas *quasi-reversíveis* observa-se um pico reverso mas, com $\Delta E_p > 57/n$ mV. Se $\alpha \approx 0,5$, para os processos de oxidação e redução, então $|I_{pa}/I_{pc}| \approx 1$.

A forma do pico no voltamograma e os parâmetros associados podem ser expressos por um parâmetro Λ que representa uma razão cinética/transporte, e é uma medida quantitativa de reversibilidade:

$$\Lambda = k_0 / \left(D_O^{\alpha_a} D_R^{\alpha_c} \sigma \right)^{1/2} = k_0 / \left(D_O^{(1-\alpha_c)} D_R^{\alpha_c} \sigma \right)^{1/2} \quad (2.16)$$

Quando os coeficientes de difusão das espécies oxidada e reduzida forem iguais, *i.e.*, $D_R = D_O = D$, a equação anterior resume-se a:

$$\Lambda = k_0 D^{1/2} \sigma^{-1/2} \quad (2.17)$$

o que mostra que quando a velocidade de varrimento é grande, ou seja, para valores de σ elevados, o grau de reversibilidade é baixo, *i.e.*, Λ tem um valor pequeno. Uma reacção é considerada *quasi-reversível* se a constante heterogénea padrão da reacção estiver no intervalo $0,3 v^{1/2} \geq k_0 \geq 2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ [1], com $D = 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ e $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

A constante de velocidade heterogénea padrão, k_0 , pode ser estimada através do parâmetro Ψ [270] que relaciona o grau de reversibilidade com a separação entre os picos anódico e catódico:

$$\Psi = \Lambda \pi^{1/2} \quad (2.18)$$

pelo que

$$\Psi = \frac{(D_O / D_R)^{\alpha/2} k_0}{[D_O \pi \nu (nF / RT)]^{1/2}} \quad (2.19)$$

Este parâmetro Ψ encontra-se tabelado em [1] considerando $\alpha=0,5$.

Se um reagente ou produto da reacção de eléctrodo for adsorvido na superfície do eléctrodo a forma da onda voltamétrica é diferente da apresentada na Figura 2.3, resultando em outros conjuntos de expressões matemáticas para a sua descrição e entendimento [1].

A voltametria cíclica foi utilizada ao longo deste trabalho para caracterizar os eléctrodos de filme de carbono quanto à sua janela de potencial, determinação das constantes heterogénea padrão para a reacção de sistemas redox antes e após a aplicação de pré-tratamento electroquímico. Utilizou-se esta técnica também para estudar a influência da modificação dos eléctrodos com filmes de Nafion, de bismuto e de nanotubos de carbono [7-12].

2.2.2. Voltametria de onda quadrada

A voltametria de onda quadrada (SWV – *Square Wave Voltammetry*) surgiu nos anos de 1950 com os trabalhos de Bakker e seus colaboradores [271,272], mas pouco utilizada nessa altura devido principalmente a limitações instrumentais (a SWV é uma técnica rápida que exige um rigoroso controlo electrónico). Com o progresso tecnológico, esta técnica passou a ser considerada importante em electroanálise. A forma da onda de potencial e a resposta típica de um sistema reversível estão representados na Figura 2.4 [1,273-275].

Em SWV, a forma da onda utilizada combina uma onda quadrada de impulso ΔE_p de larga amplitude com uma escala de potencial com degraus de amplitude ΔE_s . O resultado é uma corrente que pode ser obtida a elevadas velocidades efectivas de varrimento. Devido à construção da onda, durante cada ciclo de frequência $f = \tau^{-1}$, um impulso de potencial positivo é aplicado ao eléctrodo durante a primeira metade do ciclo seguindo-se a aplicação de um impulso de potencial negativo na restante metade.

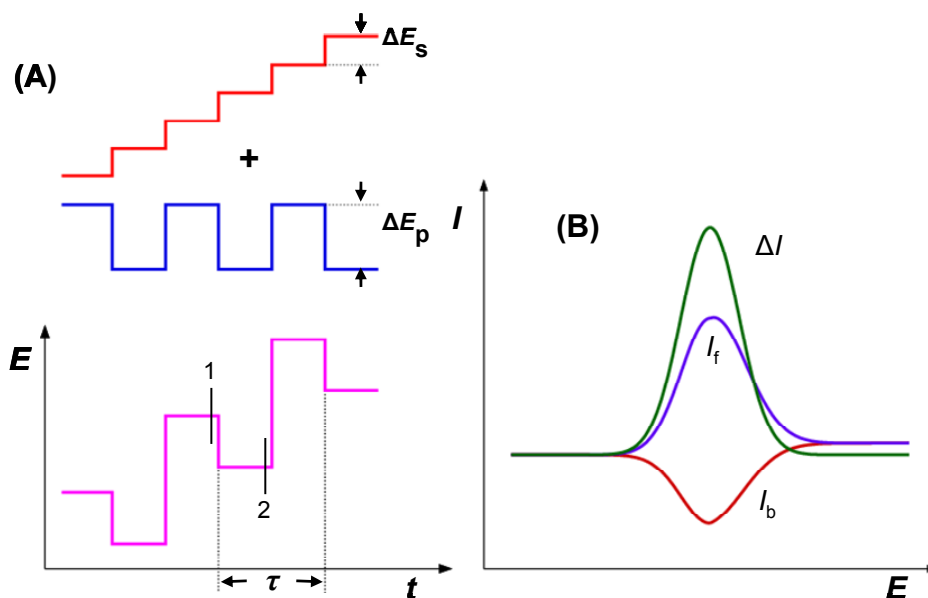


Figura 2.4 – SWV. (A) Esquema de aplicação de potenciais; (B) Resposta típica.

A amostragem de corrente é efectuada imediatamente antes do final de ambos os impulsos, positivo e negativo, em cada ciclo (pontos 1 e 2 na Figura 2.4(A)). A corrente total, ΔI ou I_t registada corresponde à diferença entre a corrente $I(1)$ registada no final do impulso de potencial directo – corrente directa (I_f – *forward current*), e a corrente $I(2)$ registada no final do impulso inverso – corrente inversa (I_b – *backward current*). Como $I(2)$ tem sinal contrário a $I(1)$, para sistemas reversíveis $\Delta I = I(1) - I(2)$ é maior do que $I(1)$, Figura 2.4(B).

Em SWV o regime de pequenos impulsos simétricos e o tipo de amostragem de corrente faz com que a diferença de corrente ΔI seja zero para uma espécie electroactiva que se encontre em condições de corrente limitada por difusão. Isto permite, por exemplo, ajudar a remover a corrente devida à redução do oxigénio dissolvido, possibilitando desta forma a realização de determinações electroanalíticas sem necessidade de desoxigenação da amostra, tornando a análise menos morosa e menos dispendiosa.

Em relação a outras técnicas de impulso de potencial (como a voltametria de impulsos normal e de impulsos diferencial) que funcionam com velocidades de varrimento efectivas de $1\text{-}10 \text{ mV s}^{-1}$, na SWV a velocidade de varrimento equivalente pode atingir 1 V s^{-1} . Este facto confere mais algumas vantagens à SWV como técnica analítica, em

termos de rapidez de análise, de menor consumo de reagente e da diminuição de problemas associados ao bloqueamento da superfície do eléctrodo.

A técnica de SWV foi associada neste trabalho à voltametria de redissolução anódica para a determinação de metais pesados.

2.2.3. Voltametria de redissolução

A voltametria de redissolução (*SV- stripping voltammetry*) é uma excelente técnica para a determinação de espécies químicas de nível vestigial e tem sido vastamente aplicada para esse fim em diversos tipos de matriz: em meios naturais como a água de rios, lagos, etc. e em matrizes alimentares, biológicas e farmacêuticas. É uma técnica que combina um passo de acumulação, pré-concentração, do analito no eléctrodo de trabalho com a aplicação de um varrimento que permita a reacção electródica da espécie acumulada originando o sinal analítico.

A SV apresenta, entre outras, as vantagens de um baixo limite de detecção ($\sim 10^{-10} - 10^{-11}$ M), capacidade de análise e especiação de multi-elementos, possibilidade de medições *in-situ*, é considerada uma técnica simples e de relativo baixo custo [1,84,94,261,276].

A voltametria de redissolução baseia-se em dois passos: o de pré-concentração e o de redissolução. No primeiro é efectuada uma pré-concentração por deposição ou adsorção das espécies no eléctrodo durante um determinado período de tempo (etapa que ocorre sob controlo do potencial ou em circuito aberto). No segundo passo, o material depositado é redissolvido na solução através de uma técnica de varrimento de potencial, registando-se um pico de corrente que é proporcional à concentração da espécie [1]. Em alguns casos é necessário realizar uma etapa intermédia em que se efectua uma mudança para um meio electrolítico inerte após o passo de pré-concentração.

As três técnicas mais comuns de SV são a voltametria de redissolução anódica (ASV – *anodic stripping voltammetry*), voltametria de redissolução catódica (CSV – *cathodic stripping voltammetry*) e voltametria de redissolução com acumulação adsortiva (AdSV – *adsorptive stripping voltammetry*).

Voltametria de redissolução anódica (ASV)

A voltametria de redissolução anódica é utilizada para a análise de catiões em solução, nomeadamente de catiões de metais pesados. O passo de pré-concentração envolve um processo catódico durante um determinado período de tempo por aplicação de um potencial conveniente, em que a espécie química é reduzida ao estado zero de oxidação da solução para a superfície do eléctrodo de trabalho formando uma amálgama no caso do eléctrodo de trabalho ser um eléctrodo de mercúrio (gotejante ou de filme de mercúrio) ou uma camada adsorvida quando o eléctrodo de trabalho é um eléctrodo sólido:



Esta etapa é normalmente realizada em regime de convecção forçada. O eléctrodo é mantido a um potencial catódico por norma superior em cerca de 0,4 V ao potencial padrão da espécie em solução que mais dificilmente é reduzida. O tempo de deposição requerido depende da concentração da espécie em solução, sendo comum o uso de períodos 1 a 10 min de deposição para determinação de espécies num intervalo de concentração entre 10^{-7} M a 10^{-9} M [261].

No final da etapa de pré-concentração, o regime de convecção forçada é interrompido, aguardando-se 10 a 15 s, tempo de equilíbrio, onde são estabelecidas concentrações uniformes e eliminadas as correntes de convecção. Após este período de tempo, aplica-se um potencial suficientemente positivo para que ocorra a oxidação da espécie química depositada:



Podem ser aplicados diferentes perfis de variação de potencial durante a etapa de redissolução, incluindo varrimento linear, impulso de diferencial, onda quadrada, degrau de potencial, ou técnicas de corrente alternada. Um destes perfis de potencial vastamente utilizado é o de onda quadrada pelo que a técnica de redissolução é frequentemente denominada por voltametria de redissolução anódica de onda quadrada (SWASV – *square-wave anodic stripping voltammetry*). A resposta registada, I vs E , permite qualificar e quantificar os iões metálicos presentes em solução, dado que a cada ião corresponde um potencial bem definido e a intensidade de pico está relacionada com a concentração.

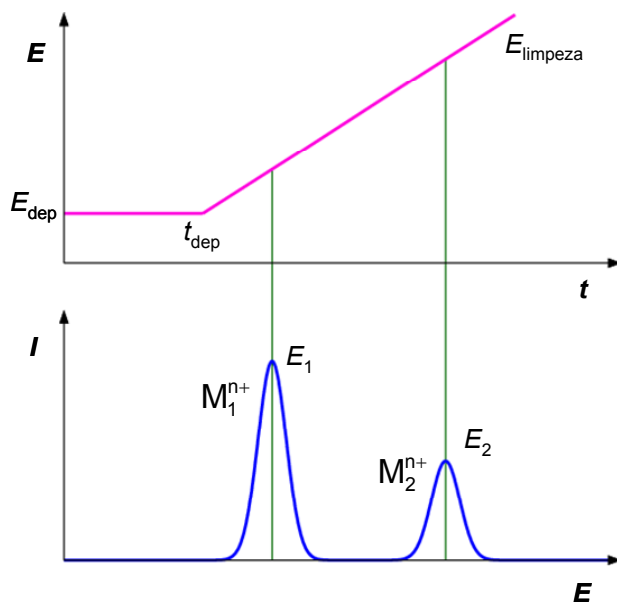


Figura 2.5 – ASV: modo de aplicação do potencial em função do tempo, e voltamograma resultante.

Na Figura 2.5 mostram-se esquematicamente as etapas de uma experiência de ASV, bem como a resposta típica obtida para o caso de dois iões metálicos.

A grande sensibilidade da técnica de SV está relacionada não só com a pré-concentração dos iões mas também com a técnica de varrimento de potencial utilizada no passo de redissolução. A grande vantagem de se utilizar onda quadrada é o facto de esta ser uma técnica bastante rápida pelo que não é necessário remover o oxigénio da solução para efectuar uma análise de SWASV, o que implica menor tempo dispendido [84,94,277,278]. A técnica de SWASV foi utilizada neste trabalho para determinação dos iões metálicos cádmio, chumbo e zinco, em eléctrodos de filme de carbono de 2Ω estudando-se a influência na electroanálise destes iões da modificação dos eléctrodos com filmes de Nafion e de bismuto, bem com a de tensioactivos em solução [7-10].

2.3. Cronoamperometria

A cronoamperometria (CA – *Chronoamperometry*) é uma técnica em que se aplica um degrau de potencial ao eléctrodo de trabalho e é registada a resposta de corrente em função do tempo [1,261].

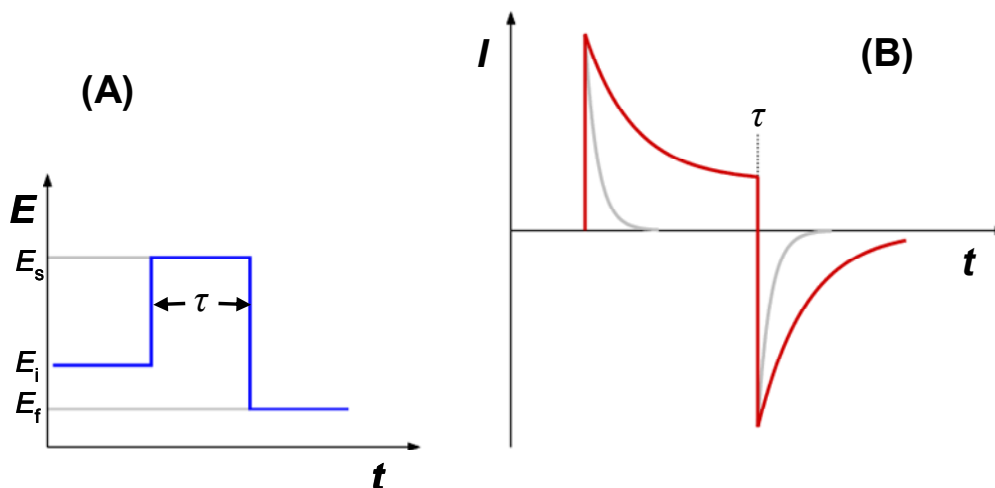


Figura 2.6 – (A) Representação esquemática do duplo degrau de potencial e (B) evolução da corrente com o tempo (cronoamperograma). Adaptado da Ref. [261].

Numa experiência de cronoamperometria, varia-se o potencial do eléctrodo de trabalho de E_i , potencial onde não ocorre a reacção faradaica, até um valor de potencial, E_s , onde à superfície do eléctrodo a concentração das espécies electroactivas é nula, ou seja, potencial onde ocorre a reacção de transferência de carga. Este potencial E_s pode ser mantido até ao final da experiência, ou no caso de uma experiência de cronoamperometria de degrau duplo de potencial, ser um valor E_f obtido por nova aplicação de um degrau de potencial após decorrido um tempo τ da aplicação de potencial inicial, como mostrado esquematicamente na Figura 2.6(A). A resposta é um transiente corrente-tempo, Figura 2.6(B).

O degrau de potencial aplicado origina uma corrente instantânea como resultado da redução de O para R. A corrente está limitada por difusão e varia com o tempo. Para um eléctrodo plano, uniformemente acessível às espécies electroactivas do seio da solução, o resultado da variação da corrente com o tempo calculada através da resolução da 2ª Lei de Fick com condições fronteira apropriadas [1,259,261] é a *equação de Cottrell* [279]

$$I = nFAJ = \frac{nFAD^{1/2}c_{\infty}}{(\pi t)^{1/2}} \quad (2.22)$$

com I a corrente medida no tempo t num eléctrodo de área A , que é directamente proporcional à concentração das espécies electroactivas no seio da solução, c_{∞} . As outras

constantes na equação são: J e D o fluxo e o coeficiente de difusão da espécie electroactiva e F a constante de Faraday. Verifica-se, desta forma, que

$$I = K t^{-1/2} \quad (2.23)$$

ou, seja, a corrente diminui com $t^{1/2}$. Deste modo, a equação de Cottrell para um eléctrodo planar afirma que o produto de $I t^{1/2}$ é uma constante K , desde que a reacção seja controlada por difusão. Efeitos provocados pela convecção natural e outros que perturbem o gradiente de concentração não podem ser descartados após um determinado tempo crítico que pode variar de uns segundos a vários minutos dependendo da disposição experimental do sistema. Estes efeitos provocam um desvio ao comportamento definido pela equação de Cottrell. Do ponto de vista experimental, há que ser considerado também que para pequenos valores de t ocorre uma contribuição capacitiva para a corrente, que tem que ser subtraída [1].

Neste trabalho utilizou-se a técnica de cronoamperometria no desenvolvimento de biossensores para a glucose e etanol [12,13]

2.4. Espectroscopia de impedância electroquímica

Os primeiros trabalhos publicados sobre espectroscopia de impedância electroquímica (EIS – *Electrochemical Impedance Spectroscopy*) remontam ao início da década de 1970 [280]. Inicialmente, a EIS foi aplicada na determinação da capacitância da dupla camada eléctrica e em análises polarografias no modo *ac*, sendo que a utilização mais corrente no presente momento é na caracterização de processos de eléctrodo e de interfaces mais complexas. As aplicações mais comuns de EIS são em estudos de corrosão, de membranas, de sólidos iónicos, de electrólitos sólidos, de polímeros condutores, e da interface líquido/líquido [1]. O campo de aplicação desta técnica estende-se a vários sistemas, entre eles, eléctrodos cobertos com filmes poliméricos electrolíticos, soluções contendo líquidos imiscíveis, eléctrodos selectivos, eléctrodos cobertos com filmes finos de óxidos inorgânicos, entre outros.

A técnica proporciona informações sobre as diferentes constantes de tempo associadas aos processos electroquímicos que ocorrem na interface dos eléctrodos, porém apesar da sua vasta aplicabilidade no estudo das propriedades electroquímicas de materiais,

a aplicação da EIS na caracterização de sensores electroquímicos foi muito pouco explorada inicialmente. Nos últimos anos tem-se assistido a um aumento significativo no número de trabalhos relacionados a este tema.

Na técnica de EIS é aplicada uma pequena perturbação ao eléctrodo de trabalho e registada a sua resposta. O sinal aplicado ao eléctrodo baseia-se em corrente alternada, *ac*. Usualmente, a perturbação é aplicada no potencial, sendo medida a corrente resultante [281]. No entanto, esta perturbação pode também ser da corrente aplicada ou, no caso da utilização de eléctrodos hidrodinâmicos, da velocidade de convecção [1]. Esta pequena perturbação traz vantagens para a resolução das equações matemáticas que permitem a descrição dos fenómenos envolvidos na aplicação da EIS, dado que é possível utilizar formas-limite destas equações, que são normalmente lineares. Além disso, o sistema é perturbado apenas próximo do equilíbrio, enquanto nos métodos descritos de varrimento linear, o sistema é perturbado longe do equilíbrio. A palavra impedância é utilizada para descrever uma resistência obtida através de métodos *ac*. A lei de Ohm utilizada para descrever a relação entre potencial e corrente é dada pela expressão

$$E = IR \quad (2.24)$$

em que E é o potencial, em V, que atravessa uma resistência, R , em Ω , e resultando uma corrente, I , em A. No caso de se tratar de um sinal de corrente alternada, a resposta de um circuito a um regime forçado sinusoidal é dada através da lei de Ohm generalizada

$$E = IZ \quad (2.25)$$

$$I = \frac{1}{Z}E = YE \quad (2.26)$$

onde Z é a impedância do circuito, medida em Ω , e Y é a admitância.

Do conceito de corrente alternada sabe-se que o potencial e a corrente variam com o tempo e são, normalmente, representados por uma onda sinusoidal. A Figura 2.7 mostra um gráfico típico de uma onda de potencial aplicado e a corrente eléctrica de um circuito de corrente *ac*. A resposta à perturbação aplicada pode deferir em fase e amplitude do sinal aplicado. A medição da impedância, ou seja, a quantificação da diferença de fase e de amplitude do sinal permite, analisar um processo de eléctrodo no que diz respeito às

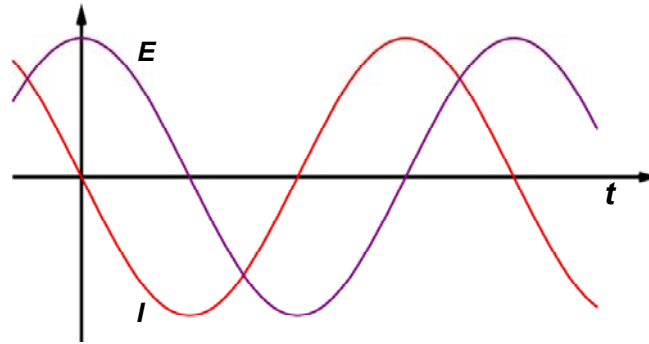


Figura 2.7 – Forma da curva *ac* para o potencial aplicado (*E*) e a resposta de corrente (*I*) obtida. Adaptado da Ref. [281].

contribuições da difusão, da cinética, da dupla camada, de reacções homogéneas acopladas, entre outros.

Considerando o sinal de potencial sinusoidal aplicado à interface eléctrodo/solução

$$E(t) = E_0 \sin(\omega t) \quad (2.27)$$

em que ω é a frequência angular da perturbação, $\omega = 2\pi f$ (rad s^{-1}), onde f é a frequência da perturbação. A resposta gerada pela interface é desfasada de um ângulo φ relativamente à perturbação, pelo que

$$I(t) = I_0 \sin(\omega t + \varphi) \quad (2.28)$$

A impedância, Z , é o factor de proporcionalidade entre E e I . As impedâncias consistem em resistências, reactâncias (derivadas de elementos capacitivos) e indutâncias [1]. Dado que a impedância é uma grandeza complexa, a sua representação pode ser feita de diversas formas.

Atendendo à equação generalizada da lei de Ohm para um sistema, pode escrever-se:

$$Z = \frac{E}{I} = \frac{E_0}{I_0} \frac{\sin(\omega t)}{\sin(\omega t + \varphi)} \quad (2.29)$$

e recorrendo à fórmula de Euler pode escrever-se

$$Z = \frac{E_0}{I_0} \frac{\exp(j\omega t)}{\exp[j(\omega t + \varphi)]} = |Z| \exp(-j\varphi) \quad (2.30)$$

onde $j = (-1)^{1/2}$.

A impedância no plano complexo, plano de Argand, é expressa em função da sua parte real, Z' , e da sua parte imaginária, Z'' , análoga à representação de um número complexo, sendo que:

$$\mathbf{Z} = Z' + j Z'' \quad (2.31)$$

As representações em exponencial e em plano complexo, que se mostram no diagrama da Figura 2.8, relacionam-se entre si através das seguintes relações:

$$|\mathbf{Z}| = (Z'^2 + Z''^2)^{1/2} \quad (2.32)$$

$$\varphi = \arctan \frac{Z''}{Z'} \quad (2.33)$$

$$Z' = |\mathbf{Z}| \cos \varphi \quad (2.34)$$

$$Z'' = |\mathbf{Z}| \sin \varphi \quad (2.35)$$

As representações de impedância em coordenadas polares, ou seja, $\lg |\mathbf{Z}|$ e ângulo de fase, $\theta = (\omega t - (\omega t + \varphi)) = -\varphi$, em função de $\lg f$, designadas por diagramas de Bode, são também muito usuais [1,281]. A grande vantagem dos diagramas de Bode é que torna

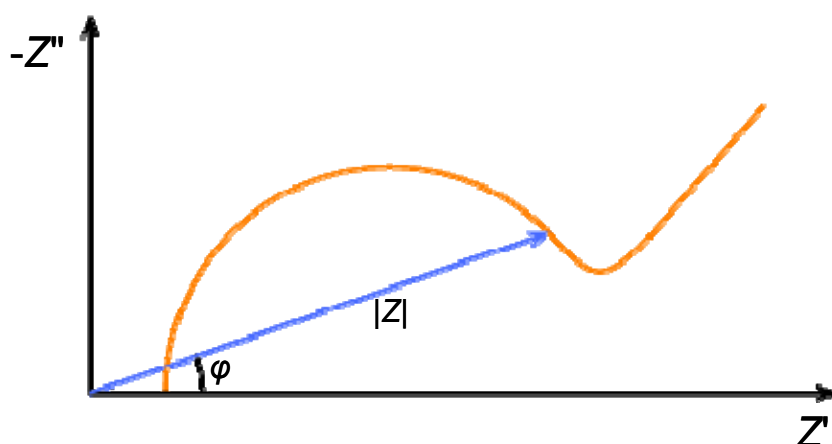


Figura 2.8 – Representação esquemática da impedância na forma exponencial e no plano complexo para uma reacção de eléctrodo. Adaptado da Ref. [282].

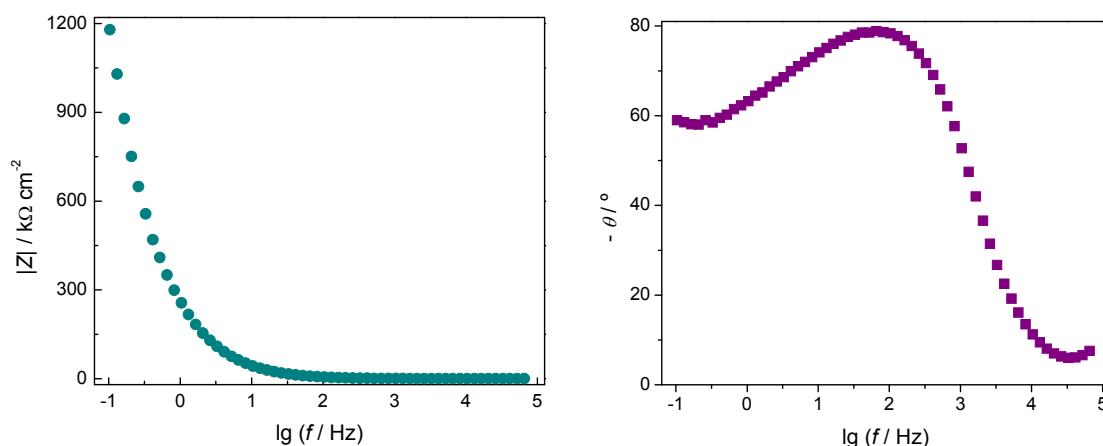


Figura 2.9 – Diagramas de Bode para um eléctrodo de filme de carbono modificado com Nafion em solução tampão ácido acético/acetato de sódio 0,1 M pH 4,3.

mais clara a contribuição dos vários constituintes do sistema para o espectro de impedância global, enquanto os diagramas de plano complexo revelam melhor a natureza desses constituintes, *i.e.*, se são resistências, condensadores, ou outros elementos. Na Figura 2.9 estão representados os diagramas de Bode obtidos para um eléctrodo de filme de carbono modificado com Nafion em solução tampão ácido acético/acetato de sódio 0,1 M pH 4,3, aplicando-se um potencial de $-1,0 \text{ V vs. SCE}$.

De uma outra forma semelhante aos diagramas de Bode e não tão usual quanto estes é a representação da parte imaginária da impedância em função do $\lg f$. Neste caso a determinação dos coeficientes angulares das rectas obtidas tanto para a componente imaginária $-Z''$ quanto a real Z' em relação à frequência, fornecem informações acerca do tipo de difusão existente no sistema. Se a difusão for linear o coeficiente é próximo a 0,5, obedecendo a uma função de Warburg que representa a impedância electroquímica dos processos Nernstianos. Para valores superiores a 0,5, a função de Warburg já não tem validade, dado que as espécies electroactivas difundem-se em campos de difusão bi ou tri-dimensionais. O modelo de descrição de processos difusivos em 2 ou 3 dimensões foram abordados por Beaunier *et al.* [283].

Em princípio, qualquer célula electroquímica pode ser representada por um modelo eléctrico. Assim, uma interface eléctrodo/electrólito na qual ocorra uma determinada reacção electroquímica será análoga a um circuito eléctrico formado por um conjunto de

resistências, condensadores e indutores. É nesta analogia que reside uma das principais vantagens da impedância electroquímica, já que torna possível a caracterização de um sistema electroquímico através do circuito eléctrico equivalente. Outros elementos podem ser adicionados a estes circuitos como é o caso do elemento de Warburg e o elemento de fase constante.

O objectivo da técnica será então medir os valores de Z' e Z'' para perturbações com várias frequências e propor um circuito equivalente mais próximo da realidade física que apresente a mesma resposta. No entanto, um determinado sistema pode originar vários circuitos equivalentes válidos, pelo facto de que dois ou mais circuitos apresentarem respostas idênticas ou os resultados obtidos nas experiências de EIS poderem ser ajustados a vários circuitos equivalentes. Por esta razão, é importante a escolha de um circuito eléctrico equivalente em que os elementos apresentem significado físico [281].

O circuito equivalente mais simples designado por circuito de Randles [284] está representado na Figura 2.10, é constituído por uma resistência que corresponde à resistência da célula, R_{Ω} , um condensador, que representa a dupla camada eléctrica, C_{dl} , e uma impedância faradaica resultante dos processos de eléctrodo. Esta impedância faradaica é resultado de uma combinação em paralelo das impedâncias das reacções catódicas, Z_c , e anódicas, Z_a . A resistência R_{Ω} é o resultado das resistências do electrólito, dos cabos de ligação e dos eléctrodos.

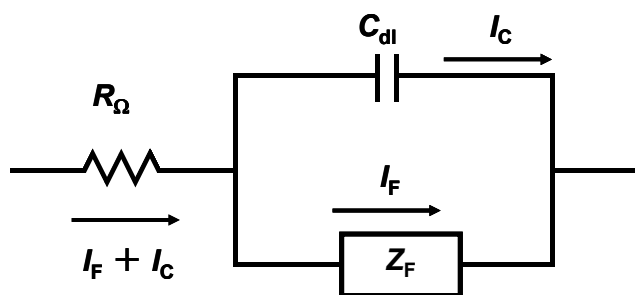


Figura 2.10 – Circuito de Randles para para um processo de eléctrodo simples.
Adaptado da Ref. [1].

Considerando uma reacção de eléctrodo simples, os processos envolvidos são como já referido anteriormente, o transporte de massa e a transferência de carga. A reacção de eléctrodo pode ser descrita através da impedância faradaica, Z_F (soma das impedâncias

devidas à transferência de carga, R_{ct} , e ao transporte de massa, Z_W , designada por impedância de Warburg),

$$Z_F = R_{ct} + Z_W \quad (2.36)$$

Nesta equação, a componente R_{ct} é definida como a resistência à remoção ou adição de um electrão de uma espécie química, a potencial constante, e Z_W é a soma das impedâncias relacionadas com o transporte de massa das espécies oxidantes e reductoras. Usando transformadas de Laplace e após algum cálculo matemático, Z_W pode escrever-se como

$$Z_W = \sigma\omega^{-1/2} - j\sigma\omega^{-1/2} \quad (2.37)$$

em que σ é o coeficiente de Warburg.

A expressão para o circuito equivalente de Randles completo é:

$$Z_{Randles} = R_\Omega + \frac{R_{ct} + \sigma\omega^{-1/2}}{(C_{dl}\sigma\omega^{1/2} + 1)^2 + \omega^2 C_{dl}^2 (R_{ct} + \sigma\omega^{-1/2})^2} - j \frac{\omega C_{dl} (R_{ct} + \sigma\omega^{-1/2})^2 + \sigma^2 C_{dl} + \sigma\omega^{-1/2}}{(C_{dl}\sigma\omega^{1/2} + 1)^2 + \omega^2 C_{dl}^2 (R_{ct} + \sigma\omega^{-1/2})^2} \quad (2.38)$$

O gráfico em plano complexo (gráfico de Sluyters ou Cole-Cole) de um processo de eléctrodo simples está representado na Figura 2.11.

A expressão (2.31) pode ser simplificada quando consideradas suas situações limite:

$\Rightarrow \omega \rightarrow 0$, *i.e.*, em frequências baixas, a reacção é controlada por difusão, e a impedância do sistema é a de Warburg. No espectro de plano complexo da Figura 2.11 obtém-se uma recta de declive unitário, com $\theta = \pi/4$ e a intercepção no eixo real $R_\Omega + R_{ct} - 2\sigma^2 C_{dl}$.

$\Rightarrow \omega \rightarrow \infty$, frequências elevadas, o controlo é puramente cinético e $R_{ct} \gg Z_W$:

$$Z = R_\Omega + \frac{R_{ct}}{1 + \omega^2 C_{dl}^2 R_{ct}^2} - j \frac{\omega C_{dl} R_{ct}^2}{1 + \omega^2 C_{dl}^2 R_{ct}^2} \quad (2.39)$$

ou,

$$\left(Z' - R_{\Omega} - \frac{R_{ct}}{2} \right)^2 + Z''^2 = \left(\frac{R_{ct}}{2} \right)^2 \quad (2.40)$$

A representação no plano complexo da Figura 2.11, origina um semicírculo de raio $R_{ct}/2$, e as intercepções no eixo real são R_{Ω} e $(R_{\Omega}+R_{ct})$.

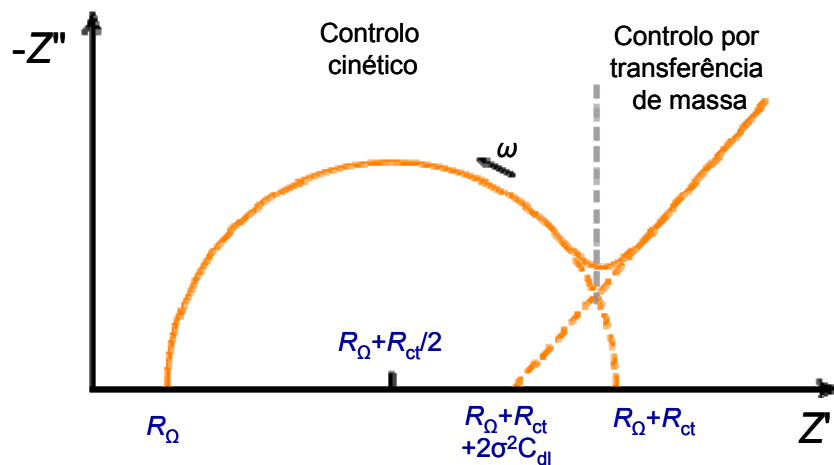


Figura 2.11 – Espectro de impedância no plano complexo para um processo de eléctrodo simples. Adaptado da Ref. [1].

Muitos processos de eléctrodo são mais complexos e a sua análise através de EIS revela-se mais complicada do que a apresentada até ao momento. Um outro factor a ter em conta está relacionado com a dependência da impedância de uma interface na sua estrutura microscópica o que no caso de um eléctrodo sólido, pode influir significativamente na forma dos espectros de impedância. Nestes eléctrodos são normalmente observados desvios à idealidade, pelo que o circuito eléctrico equivalente não pode ser apenas representado por uma resistência e um condensador (capacitância da dupla camada). A impedância nestes casos passa a ser descrita por um elemento de fase constante, CPE - *constant phase element*, que dá conta dos vários elementos RC em paralelo que seriam necessários para compreender todos os processos, e ajustar os dados de impedância destes eléctrodos. Em sistemas reais deste género, o CPE representa um condensador não ideal

cuja capacitância é dada por

$$Q_{\text{CPE}} = b(i\omega C)^\alpha \quad (2.41)$$

onde b é uma constante de proporcionalidade.

Foi demonstrado que para eléctrodos porosos, o parâmetro de rugosidade α pode variar entre 0,5 e próximo de 1. Eléctrodos lisos apresentam o valor $\alpha=1$ e o CPE é a de um condensador ideal [285].

2.5. Microscopia de força atómica

A microscopia de força atómica (AFM, *atomic force microscopy*) é uma técnica de varrimento por sonda baseada na interacção entre a amostra e a ponta de análise, tendo sido desenvolvida por Binnig, Quate e Gerber em 1986 [286]. A existência de tais interacções foi detectada em estudos de microscopia de túnel de varrimento. Um braço mecânico permite detectar deflexões resultantes da interacção de curto alcance do tipo exponencial entre os átomos da ponta e os da amostra, sendo as forças envolvidas da ordem dos 10^{-7} a 10^{-11} N.

A montagem típica de um AFM encontra-se representada na Figura 2.12, sendo composta pela sonda e componentes de varrimento e detecção. Sistemas auxiliares de controlo automatizado e de imagem são também empregues, assim como equipamento de estabilização antivibração.

O sistema de sonda é um dos mais importantes para esta técnica, sendo constituído pela ponta e um braço deflector. A escolha e montagem deste sistema irá condicionar a sensibilidade e resolução do aparelho, sendo habitualmente utilizadas pontas de Si e Si₃N₄. Uma condição importante do braço da sonda é a sua elevada frequência de ressonância, por forma a que vibrações indesejadas sejam eliminadas. A detecção da deflexão tem de ser bastante sensível para que pequenas variações sejam registadas. Para a detecção das oscilações do braço são empregues sistemas baseados em efeito de túnel [286], interferometria, capacitância, piezoresistência, piezoelectricidade e deflexão óptica por laser [287]. No caso particular do sistema utilizado foi empregue a deflexão óptica por laser, onde a radiação é redireccionada para um fotodetector por um conjunto de espelhos.

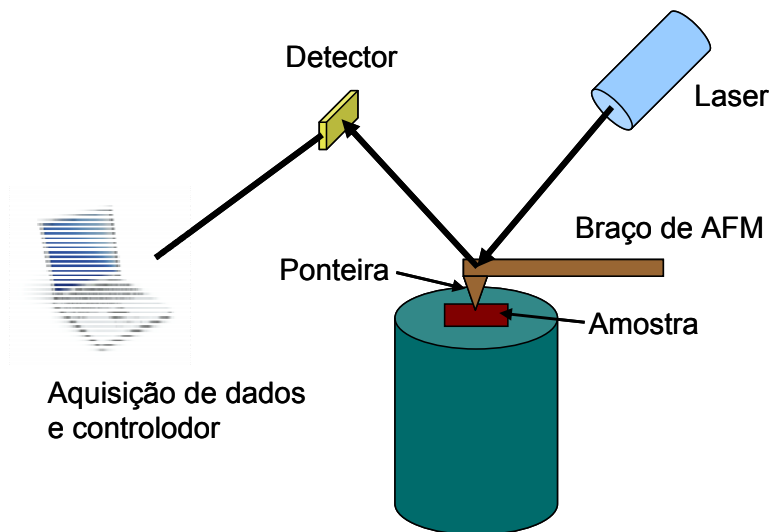


Figura 2.12 – Montagem típica de um AFM.

Finalmente o sinal eléctrico é obtido por dois fotodíodos separados por $10\ \mu\text{m}$ o que permite a detecção de radiação de comprimentos de onda diferentes. A deflexão do braço torna-se proporcional à diferença de sinais dos dois fotodetectores.

As técnicas de AFM podem ser classificadas quanto ao modo de actuação da ponta de análise: de contacto e de força dinâmica. Esta última é ainda dividida em não-contacto e de contacto intermitente. No AFM de contacto, sendo a técnica mais usual e utilizada neste trabalho, a ponta efectua um varrimento com contacto contínuo na amostra. Em termos práticos, a deflexão do braço é mantida constante através da aplicação de uma força consoante a região em estudo. Esta variante é designada por modo de imagem de força constante (*Constant Force Imaging*).

A aplicação do modo de contacto com força constante requer algum estudo e adaptação da intensidade das forças empregues [288]. Esta escolha irá possibilitar uma melhor qualidade das imagens obtidas, através da minimização das forças de adesão bem como diminuindo possíveis danos na amostra. Na Figura 2.13 encontra-se um gráfico típico da força em função da distância da ponta de análise. Numa primeira fase, A, a ponta é aproximada da amostra, o que numa situação ideal corresponderia a uma interacção nula. No entanto, devido a interacções de longo alcance do tipo atractivas, o braço apresenta uma ligeira deflexão. A deflexão, designada por elástica, pode ser determinada pela lei de

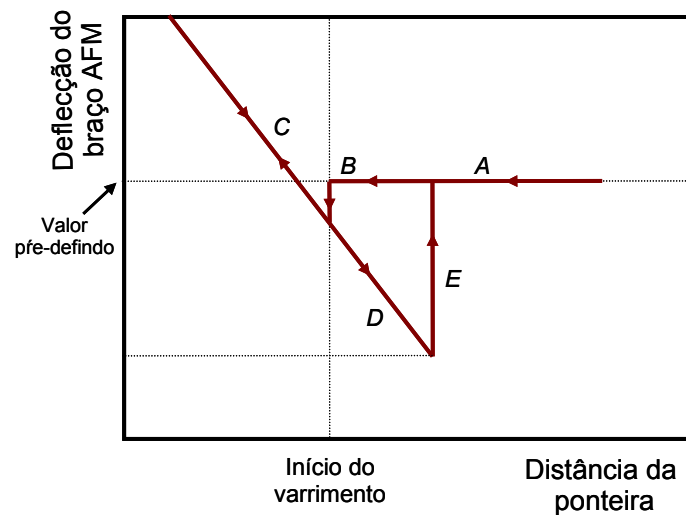


Figura 2.13 – Gráfico típico da força em função da distância da ponta de análise de AFM. Adaptado da Ref. [289].

Hook, considerando as constantes de mola características do material. Na região seguinte, B, o aumento das interações atractivas suplantam o valor da força elástica do braço, forçando o contacto com a amostra. Atingido o valor máximo de repulsão, o sistema de varrimento faz com que a ponta se separe da amostra, existindo forças de capilaridade e de adesão. No momento em que as forças de adesão são inferiores à força elástica do braço, este separa-se da superfície.

Comparativamente com outras técnicas de estudo de morfologia do tipo STM, o AFM pode ser utilizado em amostras semicondutoras ou mesmo isoladoras [290], uma vez que não depende de contactos eléctricos ou de condução de corrente. Dado que é baseado em interações intermoleculares, tem sido utilizado recentemente no estudo de adesão de moléculas biológicas a superfícies e de manipulação molecular. No entanto, o AFM apresenta também algumas limitações [288]. É conhecido que todos os materiais formam camadas mais ou menos espessas de bolsas de ar e de moléculas de água na sua superfície. A existência de tais perturbações faz com que a ponta de análise em AFM de contacto seja deflectida para mais próximo da superfície em resultado das forças de adesão e electrostáticas, provocando forças laterais e normais de elevado valor que tendem a limitar a resolução da instrumentação.

2.6. Microscopia de Raman confocal

A classe de técnicas espectroscópicas do tipo Raman tem como base o efeito com o mesmo nome descoberto em 1928. Apesar de ter sido referenciado no início do século XX, só cerca de 50 anos mais tarde surgiu o primeiro microscópio, e o primeiro estudo de eléctrodos metálicos foi reportado por Fleischmann *et al.* [291]. A versatilidade da técnica associada ao desenvolvimento do equipamento associado permitiu a aplicação em diversas áreas, *p.e.*, [292,293].

Quando uma amostra é incidida com radiação observam-se dois efeitos ao nível dos fotões dispersos. O primeiro, e dominante, é o do espalhamento elástico dos fotões com o mesmo comprimento de onda e energia dos incidentes, sendo conhecido por espalhamento de Rayleigh, representado na Figura 2.14. O segundo, que ocorre em cerca de 1 em 10^6 fotões, envolve um espalhamento inelástico, também conhecido por efeito de Raman, podendo ocorrer na região de Stokes ou anti-Stokes. A radiação incidente promove a excitação da molécula ou átomos da amostra para um estado virtual, relaxando em seguida para um estado de energia superior ao inicial, espalhamento Stokes-Raman. Esta transição leva à emissão de um fotão de energia inferior aos incidentes, sendo a energia distribuída pelos graus de liberdade dos átomos da amostra. A região anti-Stokes ocorre com a relaxação para o estado fundamental, sendo menos intensa que a região Stokes.

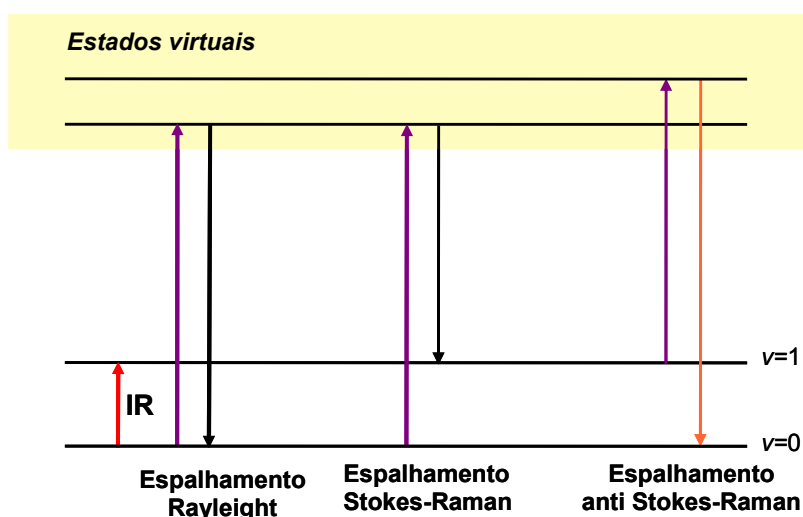


Figura 2.14 – Diagrama esquemático dos tipos de espalhamento originados por absorção de energia.

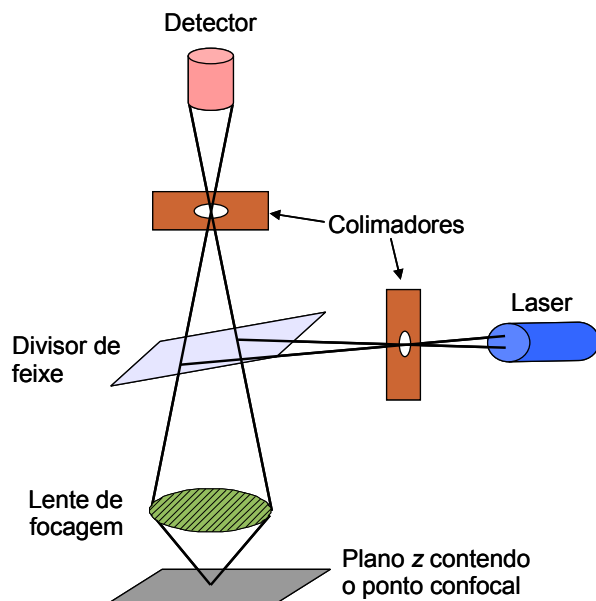


Figura 2.15 – Diagrama esquemático de Raman confocal.

A base das técnicas de Raman consiste na irradiação da amostra com um feixe de luz ou um laser monocromático intenso. A radiação dispersa pela amostra é analisada com o auxílio de monocromadores e lentes, por forma a remover a componente de espalhamento de Rayleigh. A grande dificuldade desta técnica reside neste ponto, uma vez que o espalhamento espontâneo de Raman é difícil de ser detectado.

No caso particular da espectroscopia de Raman confocal, representado esquematicamente na Figura 2.15, utilizada neste trabalho, o espectrómetro é acoplado a um microscópio óptico, sendo conhecida também por *optical sectioning*. Para isso é colocada uma abertura no plano confocal terminal do microscópio, o que irá promover um aumento da resolução espacial lateral e axial [294], podendo ser usadas em amostras transparentes ou translúcidas. O componente confocal inclui ainda um filtro que permite uma melhoria do sinal gaussiano de entrada.

O Raman confocal apresenta grandes vantagens, sendo duas das mais importantes a análises *in vivo*, não destrutiva, e a obtenção de sinal em locais pequenos no interior de uma amostra independentemente do tamanho do mesmo. Duas vantagens menos óbvias podem também ser referenciadas. Em primeiro, o aumento da resolução axial e lateral por um factor de dois relativamente a uma técnica padrão. A segunda é a rejeição da radiação

parasita e de fluorescência. No primeiro caso deve-se à existência de um diafragma opaco antes do *pinhole*. No caso da radiação fluorescência deve-se à focagem do laser num pequeno ponto fazendo com que o fluxo do laser no volume de amostragem seja suficientemente elevado para que a velocidade de supressão de fluorescência ocorra numa fracção de tempo muito inferior à técnica convencional de Raman.

Para além da análise morfológica de superfícies, o Raman confocal tem sido empregue em electroquímica, por exemplo, no estudo da electrodeposição de cobre *in situ* e na difusão de sais de lítio nos polímeros de baterias de lítio [295].

O mapeamento por Raman confocal da amostra pode ser obtido bastando que o equipamento permita um movimento da microsonda no plano da amostra. Esta técnica permite um conhecimento da região de interesse da amostra, tendo como limitação o alcance da microsonda e o limite de difracção do ponto em análise.

CAPÍTULO 3

EXPERIMENTAL

Neste capítulo descreve-se o procedimento experimental, incluindo a preparação dos eléctrodos de filme de carbono, célula electroquímica, instrumentos de medição, soluções, e metodologias envolvidas na preparação e modificação dos eléctrodos.

3.1 Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de qualidade analítica e com água ultrapura de resistividade $\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ obtida através de um sistema Millipore Milli-Q, Millipore Corporation, EUA.

Para a modificação dos eléctrodos de filme de carbono foram utilizados Nafion (5 % em etanol) e vermelho neutro da Aldrich, Chemie GmbH&Co KG, Steinheim, Alemanha; nitrato de bismuto (III) da Sigma, Alemanha; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ da Merck, Alemanha; 3-glicidoxipropiltrimetoxissilano, metiltrimetoxissilano, cuja estrutura está representada na Figura 3.1, da Aldrich, Chemie GmbH&Co KG, Steinheim, Alemanha.

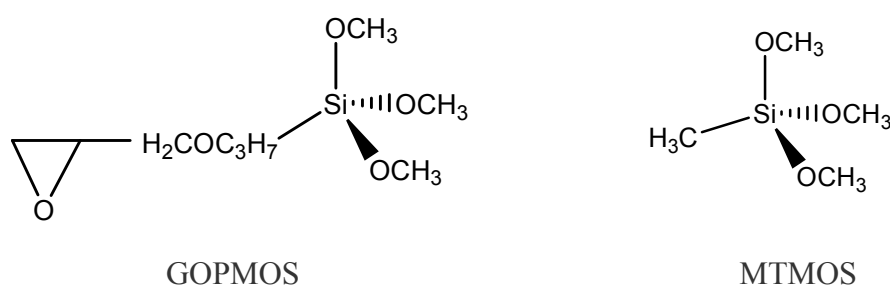


Figura 3.1 – Estrutura dos oxissilanos utilizados: 3-glicidoxipropiltrimetoxissilano (GOPMOS) e metiltrimetoxissilano (MTMOS).

Os nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) foram adquiridos na NanoLab (Newton, MA, EUA).

As enzimas glucose oxidase (Gox) da *Aspergillus Niger* EC1.1.3.4, álcool oxidase (AlcOx) da *Hansenula sp.* EC1.1.3.13 e a albumina sérica bovina (BSA) foram adquiridas à Sigma, Alemanha. Para a imobilização das enzimas utilizou-se glutaraldeído (GA, 25 % em água), albumina sérica bovina (BSA) da Sigma, Chemical Co. St. Louis, EUA.

Foram preparadas soluções padrão de 1 g L^{-1} nitrato de chumbo (II), cloreto de cádmio (II) e cloreto de zinco (II), todos da Sigma, Alemanha, em solução tampão ácido acético/acetato de sódio 0,1 M pH 4,45. Triton-X-100 da Sigma, EUA, foi utilizado após diluições apropriadas.

As soluções de glucose foram preparadas através de reagente α -D(+)-glucose (Sigma Chemical Co. St. Louis, EUA). Para o equilíbrio entre os monómeros α e β da glucose esta solução foi preparada e deixada a repousar durante 24 h no frigorífico a $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

Outros reagentes utilizados foram: DL-ácido láctico, L-ácido ascórbico (Sigma Chemical Co. St. Louis, EUA), ácido tartárico (da PAHI, Lisboa, Portugal), ácido cítrico, DL-ácido málico, e etanol (Merck, Darmstadt, Alemanha), KCl (Fluka, Chemie AG, Buchs, Suíça), os ácidos perclórico, sulfúrico, e nítrico (Riedel-de-Haën, Alemanha), e cloreto de hexaamino ruténio (III) (Aldrich, Alemanha).

As soluções tampão utilizadas foram:

- tampão acetato: $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{NaCH}_3\text{COO}$ 0,1 M pH 4,3-4,5;
- tampão fosfato (PB): $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0,1 M pH 7,0 e pH 7,5
- tampão fosfato salino (PBS): $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 0,1 M pH 6,0-8,0 + NaCl 0,05 M;
- para a deposição do filme de poli(vermelho neutro): $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,05 M pH 5,5 + KNO_3 0,1 M (vai ser designado como KPb 0,05 M + KNO_3 0,1 M).

3.2 Eléctrodos de filme de carbono

3.2.1. Preparação

Os eléctrodos de filme de carbono foram preparados a partir de resistências de filme de carbono de valores nominais de 1,5 Ω , 2,0 Ω , 15 Ω , 140 Ω e 2,0 k Ω . Estas resistências foram fabricadas a partir da deposição pirólítica de carbono em cilindros de cerâmica de 0,6 cm de comprimento e 0,15 cm de diâmetro. O filme de carbono é obtido através do precursor metano num ambiente de azoto, dentro de um forno a uma temperatura de 1100 °C. Após 10 minutos a 1 hora de pirólise forma-se uma camada de carbono com espessura de 5 a 500 $\Omega \text{ sq}^{-1}$, estando o tempo de deposição relacionado com a resistência e a espessura do filme depositado. No caso das resistências de 2,0 Ω , a espessura do filme é de 15 μm [296], enquanto que as resistências de maior valor apresentam espessuras de filme menor.

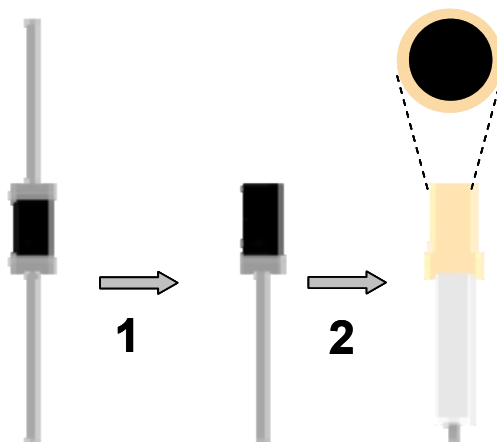


Figura 3.2 – Esquema de preparação dos eléctrodos de disco de filme de carbono.

Cada resistência tem nas extremidades capas metálicas que para além de protegerem a superfície dessas duas faces planas, funcionam como contacto externo. De forma a preparar os eléctrodos, uma dessas capas metálicas é retirada (Figura 3.2-1), procedendo-se ao isolamento da outra extremidade com uma capa plástica fixa com cola

epóxida. A área exposta do eléctrodo cilíndrico assim preparado é de $0,20 \text{ cm}^2$. Em alguns casos, foi utilizado um eléctrodo de disco que se obteve após a cobertura de toda a superfície lateral do eléctrodo preparado anteriormente com cola epóxida, conforme se mostra na Figura 3.2-2. A área geométrica do eléctrodo de disco é de $0,020 \text{ cm}^2$.

3.2.2 Pré-tratamento electroquímico

Os eléctrodos de filme de carbono foram sujeitos, quando necessário, a um pré-tratamento electroquímico. Este confere maior estabilidade à superfície do eléctrodo com consequente diminuição da sobretensão e correntes capacitivas. Foram utilizados dois tipos de pré-tratamento electroquímico: voltametria cíclica em ácido perclórico $1,0 \text{ M}$ durante três varrimentos [296] e aplicação de um potencial fixo de $+0,9 \text{ V vs. SCE}$ [297]. Neste último, foram estudados diversos tempos de aplicação do potencial, desde 1 a 6 minutos, tendo sido verificado que para tempos superiores a 4 minutos não ocorrem mais variações na sobretensão e na corrente capacitiva [11], optando-se por aquando da aplicação deste tipo de pré-tratamento, utilizar apenas 4 minutos de aplicação do potencial fixo.

No pré-tratamento com ácido perclórico teve-se o cuidado de que a corrente máxima de oxidação e redução não excedesse $\pm 1 \text{ mA}$ com os eléctrodos cilíndricos ou $\pm 0,1 \text{ mA}$ quando utilizados os eléctrodos de disco.

Os dois pré-tratamentos influenciam de forma distinta as características da superfície do eléctrodo: enquanto o tratamento com ácido leva à alteração e/ou remoção dos grupos da superfície, a polarização a potencial fixo positivo promove a oxidação desses grupos. O pré-tratamento com ácido tem sido mais utilizado quando a aplicação futura do eléctrodo é em sensor electroquímico, enquanto que a aplicação de potencial fixo é normalmente empregue para o desenvolvimento de biossensores electroquímicos.

Outros pré-tratamentos foram também utilizados, sendo discutidos ao longo deste capítulo, quando necessários.

3.2.3 Modificação dos eléctrodos de filme de carbono

Filme de bismuto

Os filmes de bismuto foram depositados nos eléctrodos de filme de carbono através da aplicação de um potencial constante. A deposição foi levada a cabo de duas maneiras distintas: *ex situ*, *i.e.*, numa solução separada e antes da caracterização electroquímica; *in situ* na mesma solução. No caso da deposição *ex situ*, a solução de deposição preparada em solução tampão ácido acético/acetato de sódio 0,1 M pH 4,45 continha 1 mg L⁻¹ de Bi(III) enquanto que para a solução de deposição *in situ* continha apenas 400 µg L⁻¹ de Bi(III). O eléctrodo de filme de carbono foi condicionado a +0,3 V *vs.* SCE durante 300 s para re-oxidar os metais pesados que possam eventualmente estar presentes na superfície do eléctrodo. O filme de bismuto foi depositado aplicando-se -1,4 V durante 300 s ou -1,2 V *vs.* SCE durante 120 s dependendo do método de deposição escolhido ser o *ex situ* ou *in situ*, respectivamente. Em qualquer das duas situações a solução foi agitada durante os passos de condicionamento e deposição.

Foram também preparados filmes de bismuto sobre eléctrodos de filme de carbono modificados com Nafion. Neste caso, procedeu-se primeiramente à modificação dos eléctrodos com Nafion, seguindo-se a deposição do filme de bismuto.

Filme de Nafion

A modificação dos eléctrodos de filme de carbono com pré-tratamento com um filme de Nafion foi realizada através da colocação no topo do eléctrodo de disco de 1 µL de Nafion 0,25% wt em álcoois alifáticos ou de 5 µL de Nafion no caso da utilização do eléctrodo cilíndrico, colocando-se em seguida 1 µL ou 3 µL de *N, N'*-dimetilformamida consoante o tipo de eléctrodo utilizado. Este procedimento foi utilizado para promover a obtenção de um filme tão uniforme quanto possível, tendo em conta diversas condições de revestimento, como sejam a temperatura, concentração de água, entre outras [149]. Após a evaporação dos solventes, o filme de Nafion foi curado com um jacto de ar quente ~70 °C durante cerca de 1 minuto, resultando num filme de ~1 µm de espessura.

Hexacianoferrato de cobre

Foram utilizados eléctrodos de filme de carbono de resistência nominal de 1,5, 15 e 140 Ω que foram pré-tratados em KCl 0,1 M por voltametria cíclica entre 0,0 e +1,0 V vs. SCE. O hexacianoferrato de cobre (CuHCF) foi depositado quimicamente por precipitação autocatalítica por imersão dos eléctrodos durante 50 minutos numa solução contendo CuCl_2 10 mM, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 10 mM, e KCl 0,1 M [185]. Após este procedimento, os eléctrodos foram secos com um jacto de ar quente durante 3 minutos e armazenados à temperatura ambiente durante 24 horas para estabilização do filme.

Poli(vermelho) neutro

O filme de poli(vermelho neutro) (PNR) foi depositado por voltametria cíclica em eléctrodos de 1,5, 2, 15 e 140 Ω previamente pré-tratados por varrimento de potencial entre -1,0 e +1,0 V vs SCE em solução KNO_3 0,1 M durante pelo menos 5 ciclos, até ter sido obtido um voltamograma estável. A electrodeposição do filme foi realizada através de uma solução de 1,0 mM de monómero, vermelho neutro, em solução tampão fosfato 0,05 M pH 5,5 + KNO_3 0,1 M por voltametria cíclica entre -1,0 e +1,0 V vs. SCE a uma velocidade de varrimento de 50 mV s^{-1} durante 15 ciclos [187]. Os eléctrodos foram armazenados à temperatura ambiente durante 24 horas para secagem e estabilização do filme de PNR.

Nanotubos de carbono

Os MWCNTs foram purificados e funcionalizados em ácido nítrico 2 M durante 20 h com agitação da solução. O produto sólido foi recolhido num filtro de papel e lavado diversas vezes com água nanopura até que o filtrado apresentasse um pH ~ 7 . Os nanotubos funcionalizados foram secos durante 24 h num forno a ~ 80 °C. Este procedimento foi utilizado para garantir que todos os metais de transição utilizados como catalisadores na produção dos MWCNTs e carbono amorfo fossem removidos. O ácido nítrico promove também alguma destruição dos nanotubos de carbono e introduz grupos carboxílicos (-COOH) nos terminais e nos defeitos da parede lateral da estrutura dos nanotubos [298,299]. Após este passo de funcionalização, fez-se uma dispersão de 2 mg de MWCNT-COOH em 1 mL de Nafion 1 % em etanol.

Foram utilizados eléctrodos de filme de carbono em forma de disco de resistência nominal 2Ω com área geométrica de $0,02 \text{ cm}^2$. Os eléctrodos foram sujeitos a um pré-tratamento electroquímico que consistiu no varrimento de potencial entre $-1,5$ e $+1,5 \text{ V vs. SCE}$ numa solução de PBS durante 10 ciclos, que permitiu a obtenção de um voltamograma cíclico estável. Utilizou-se também nesta fase um eléctrodo de carbono vítreo de 7 mm de diâmetro para otimizar as condições de modificação dos eléctrodos de filme de carbono por CNT. Antes da sua utilização, o eléctrodo de GC foi polido com pó de alumina de partículas de dimensão 1,00 e $0,05 \mu\text{m}$.

Foi utilizado um volume de $40 \mu\text{L}$ de MWCNT em Nafion 1 % para modificar o eléctrodo de carbono vítreo, ou, em alternativa os MWCNT funcionalizados foram colocados directamente na superfície dos eléctrodos de filme de carbono sem o uso de solventes [300].

3.3. Imobilização de enzimas para biossensores de glucose e etanol

A imobilização da enzima glucose oxidase (GOx) para a preparação de biossensores de glucose foi efectuada através do método sol-gel e pelo método de reticulação empregando glutaraldeído (GA) e albumina sérica bovina (BSA). Este último foi também utilizado para imobilizar a enzima álcool oxidase (AlcOx) para desenvolvimento de biossensores de etanol. No caso do método de sol-gel foram utilizados os eléctrodos preparados com os mediadores CuCHF e PNR, enquanto que o método de reticulação foi empregue em eléctrodos modificados com nanotubos de carbono.

3.3.1 Método sol-gel

A solução de sol-gel foi preparada através da mistura otimizada de dois compostos oxisilanos [184,187]: GOPMOS:MTMOS:H₂O – 130:70:600 μL . A esta mistura foram adicionados de $2 \mu\text{L}$ de HCl 6 M, agitando-se intensivamente durante alguns minutos, colocada posteriormente num banho de ultrassons durante 15 minutos. Seguidamente, esta mistura foi colocada sob um jacto de ar quente ($\sim 70 \text{ }^\circ\text{C}$) por forma a que o álcool formado durante a hidrólise dos oxisilanos evaporasse [301] e a solução perdesse 40% do seu

volume inicial. Aguardou-se 1 hora para que arrefecesse à temperatura ambiente, neutralizou-se a pH 7,0 e, por forma a prevenir que o xerogel resultante se quebrasse, adicionou-se 1 μL glicerol 5%. Misturaram-se cuidadosamente 50 μL deste xerogel com 15 μL de GOx 10% em solução PBS 0,1 M pH 7,0, aguardando-se 1 hora para que ocorresse o equilíbrio da solução. Após este tempo, os eléctrodos modificados com mediadores CuHCF e PNR, foram imersos na solução sol-gel-enzima durante 5 minutos, retirados e guardados a 4°C durante 3 dias para formação do sol-gel. Após a utilização e quando não em uso, os eléctrodos foram guardados em solução PBS 0,1 M pH 7,0 a 4 °C.

3.3.2. Método de reticulação

Os eléctrodos de filme de carbono com CNT e GC/CNT/Nafion foram modificados com 4 μL de uma mistura de enzima-BSA-GA. A Figura 3.3 mostra a preparação dos eléctrodos de filme de carbono modificados com AlcOx.

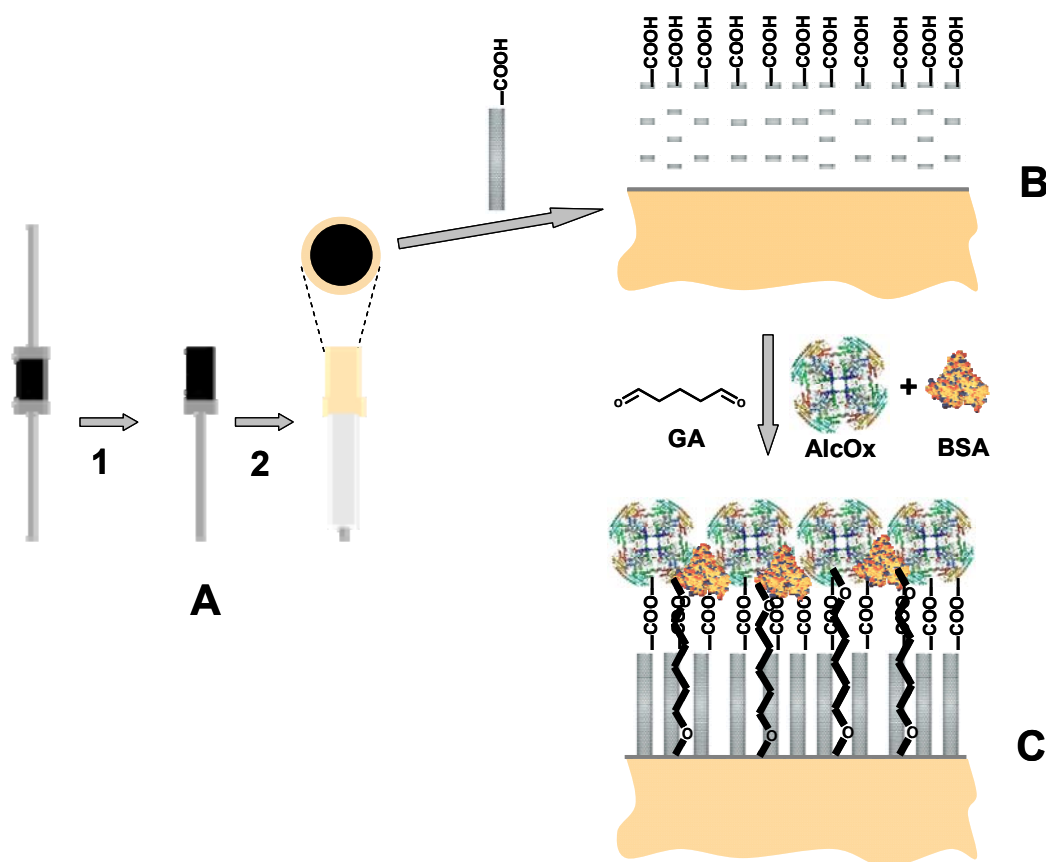


Figura 3.3 – Modificação de um eléctrodo de filme de carbono com nanotubos de carbono funcionalizados e posterior modificação com a mistura enzimática AlcOx-BSA-GA.

As quantidades de cada componente na mistura foram:

- **Biossensor de glucose:** 5 μL de solução GOx (10 mg de GOx em 1 mL de solução PBS 0,1 M pH 7,0) + 5 μL de solução de BSA (10 mg de BSA em 1 mL de solução PBS 0,1 M pH 7,0) + 1 μL de glicerol + 1 μL de solução de GA (2,3% em água);
- **Biossensor de etanol:** 2 μL de solução AlcOx (5 mg de AlcOx em 1 mL de solução PBS 0,1 M pH 7,0 + 1 μL de solução de BSA (10 mg de BSA em 1 mL de solução PBS 0,1 M pH 7,0) + 0,5 μL de glicerol + 0,5 μL de solução GA (2,3 % em água).

Os eléctrodos modificados com a mistura enzimática foram deixados a secar à temperatura ambiente durante cerca de 1 hora e depois imersos por cerca de 30 min na solução de PB ou PBS antes de efectuar qualquer medida por forma a dissolver algum GA que não tenha reagido com a enzima. Todos os biossensores foram guardados a 4 °C em solução tampão fosfato quando não se encontravam em utilização.

Optimização do método de modificação

A optimização da mistura enzimática de modificação dos eléctrodos com nanotubos de carbono foi efectuada em eléctrodos de GC. Os nanotubos de carbono foram fixos à superfície do eléctrodo de GC de diferentes formas, e a resposta amperométrica para a glucose considerada como eficiência do biossensor. Os três procedimentos testados foram:

- GC/MWCNT/GOx: o eléctrodo de GC foi modificado através de *drop-coating* da dispersão de MWCNT em Nafion, e após a evaporação dos solventes, foi colocada por cima a mistura enzimática de GOx-BSA-GA por cima do filme de MWCNT/Nafion formado.
- GC/MWCNT-GOx: o eléctrodo de GC foi modificado através de uma mistura formada por MWCNT-GOx-BSA-GA.
- GC/GOx/MWCNT: a camada enzimática foi primeiro colocada na superfície do eléctrodo de GC, e após se ter aguardado que secasse à temperatura ambiente, os MWCNT foram colocados por cima da camada enzimática.

Um eléctrodo de GC modificado com GOx (GC/GOx), no qual a mistura enzimática de GOx foi colocada directamente sobre o eléctrodo de GC, sem MWCNT, foi também preparado para permitir efectuar comparações com os eléctrodos modificados com MWCNT.

3.4 Instrumentação

As experiências de voltametria cíclica, de redissolução de onda quadrada e de amperometria foram efectuadas utilizando um potenciostato μ Autolab do Tipo II da Ecochimie, Utrecht, Holanda (Figura 3.4) controlado pelo software GPES (General Purpose Electrochemical System) versão 4.9.



Figura 3.4 – Potenciostato/galvanostato μ Autolab tipo II.

As medidas de espectroscopia de impedância electroquímica foram realizadas utilizando um analisador de frequências Solartron 1250 acoplado a uma interface electroquímica Solartron 1286 (Figura 3.5) da Solartron Analytical, Inglaterra. O controlo dos parâmetros, a aquisição e o tratamento dos dados obtidos foram efectuados por intermédio do software Zplot 2.4 (Scribner Associates, EUA).

Os espectros de impedância foram obtidos através de uma perturbação no potencial sinusoidal de intensidade nominal 10 mV sobreposto a um potencial aplicado fixo num intervalo de frequências entre 65,5 kHz e 0,1 Hz. Os ajustes dos espectros de EIS a circuitos eléctricos equivalentes foram efectuados através do programa ZView 2.9 (Scribner Associates, EUA).



Figura 3.5 – Equipamento de EIS: analisador de frequência Solartron 1250 acoplado a uma interface electroquímica Solartron 1286.

Os ensaios electroquímicos foram efectuados numa célula electroquímica de compartimento único, de capacidade volumétrica de 15 mL, contendo três eléctrodos (Figura 3.6): eléctrodo de calomelanos saturado (SCE) utilizado como referência, um eléctrodo de platina como auxiliar, e um eléctrodo de trabalho. Como eléctrodo de trabalho utilizou-se um eléctrodo de filme de carbono (descrito anteriormente) e em alguns casos foi utilizado um eléctrodo de carbono vítreo (de diâmetro 0,7 cm).

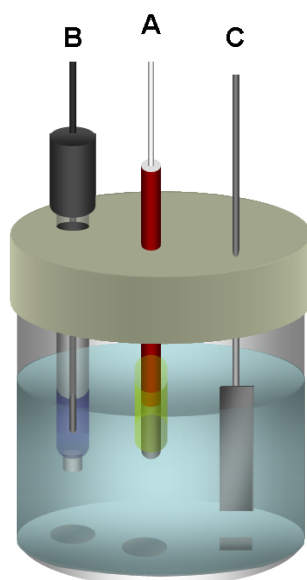


Figura 3.6 – Representação esquemática da célula electroquímica com os três eléctrodos (A) trabalho, (B) referência e (C) auxiliar.

As imagens de AFM dos filmes de carbono foram efectuadas através de um microscópio de força atómica Multimode™ com controlador Nanoscope E da Digital Instruments, Veeco Instruments, EUA (Figura 3.7). Foram utilizados “cantilevers” em forma de V de nitrato de silício (Silicon nitride Nanoprobes™), com 100 μm de comprimento e uma constante de força de 0,58 N m⁻¹. Todas as imagens foram obtidas no modo de AFM de contacto em ar à temperatura ambiente. As imagens foram processadas com o programa 4.23r6. O contraste e o brilho das imagens foram ajustados.



Figura 3.7 – Microscópio de força atómica Multimode™.

A espectroscopia de Raman confocal foi executada com um microscópio óptico de varrimento de campo próximo (SNOM - Scanning Near-field optical), AlphaSNOM da WiTec, Alemanha, Figura 3.8.

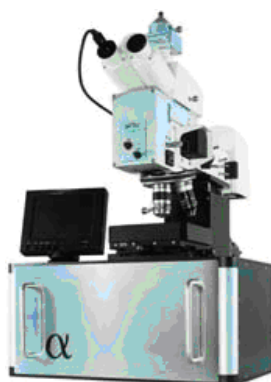


Figura 3.8 – Microscópio óptico de varrimento de campo próximo.

As medidas de pH foram realizadas utilizando um medidor de pH da Crison, Barcelona, Espanha, modelo micropH 2001. Todas as medidas experimentais foram efectuadas à temperatura ambiente de 25 ± 1 °C.

Os gráficos e figuras de voltamogramas, amperogramas e espectros de impedância electroquímica foram executados usando o software ORIGIN versão 6.0 da Microcal Software, Inc. EUA.

CAPÍTULO 4

CARACTERIZAÇÃO DE ELÉCTRODOS DE FILME DE CARBONO

Neste capítulo apresenta-se a caracterização electroquímica, morfológica e microestrutural de resistências de filme de carbono [7,9,11] de dois tipos: as primeiras de resistência nominal de 2 Ω , e as segundas de 1,5 Ω , 15 Ω , 140 Ω e 2 k Ω . Estas últimas diferem no processo de fabrico descrito na parte experimental, não sendo no entanto conhecido na sua totalidade. A caracterização electroquímica foi efectuada através de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância electroquímica estudando-se a influência do pré-tratamento no comportamento dos eléctrodos. A caracterização morfológica e microestrutural foi realizada através das técnicas de microscopia de força atómica e Raman confocal.

4.1 Introdução

Devido à grande preocupação em relação à toxicidade do mercúrio a comunidade científica tem vindo a pesquisar e desenvolver novos materiais de eléctrodos sem do mercúrio para utilização em electroanálise. Destes materiais destacam-se os à base de várias formas de carbono, bastamente utilizados como material de eléctrodo e de substrato (suporte) de eléctrodos [302]. Em particular, o carbono vítreo tem desempenhado um papel importante em estudos voltamétricos devido às suas características, nomeadamente, baixa permeabilidade aos gases, baixa porosidade, grande dureza, boa electrocondutividade e ampla janela de potencial em potenciais positivos.

A utilização de filmes de mercúrio em modificação de eléctrodos para electroanálise de metais pesados permite uma diminuição da quantidade de mercúrio utilizada neste tipo de análises. Apesar disso, a não utilização total de mercúrio seria preferível. Os eléctrodos de filme de carbono representam uma alternativa bastante promissora, pelo que vários tipos destes eléctrodos têm sido investigados com o objectivo

da sua utilização em electroanálise [296,303-305]. Os eléctrodos de filme de carbono preparados de resistências de filme de carbono de 2Ω foram investigados e caracterizados electroquimicamente, e a sua aplicação em análise de metais vestigiais através de voltametria de redissolução comprovada [296,306]. A caracterização por espectroscopia de impedância electroquímica destes eléctrodos de forma cilíndrica foi levada a cabo [307] em diversas soluções electrolíticas utilizadas em electroanálise e num intervalo alargado de pH, estudando-se a influência do pré-tratamento da superfície do eléctrodo no perfil voltamétrico obtido antes e após a aplicação do pré-tratamento.

O pré-tratamento electroquímico consiste na aplicação de potenciais positivos e/ou negativos ao eléctrodo de trabalho [47,308-311] ou no varrimento do potencial entre um intervalo de potenciais escolhido [312-314]. O pré-tratamento é utilizado para obter superfícies modificadas que apresentam maior estabilidade e menor sobretensão.

As principais variáveis do processo de pré-tratamento electroquímico são [308,315]:

- Os limites de potencial para o pré-tratamento;
- O tempo a que o eléctrodo ficará sujeito aos potenciais de pré-tratamento;
- A composição da solução de electrólito suporte, incluindo o pH da solução, natureza e concentração das espécies iónicas.

A utilização de um pré-tratamento electroquímico em eléctrodos de carbono aumenta a actividade da superfície dos eléctrodos, por introdução ou alteração dos grupos funcionais da superfície, sendo esses grupos funcionais possíveis mediadores de electrões entre os eléctrodos e as espécies electroactivas. Os grupos quinona parecem ser os mediadores no caso dos eléctrodos de carbono. No caso de eléctrodos de pasta de carbono, a anodização remove compostos orgânicos presentes na superfície do eléctrodo, tornando-o mais hidrofílico e conseqüentemente mais acessível às espécies em solução. Uma outra explicação é a de o pré-tratamento servir apenas para remover impurezas introduzidas no processo de polimento do eléctrodo [309,316].

No que diz respeito aos eléctrodos de filme de carbono, como estes não podem ser polidos mecanicamente, para se obter uma superfície limpa e reprodutível, recorre-se a pré-tratamentos electroquímicos.

4.2 Caracterização electroquímica

4.2.1 Resistências de 2Ω

4.2.1.1 Voltametria cíclica

Nesta parte do trabalho foram utilizados eléctrodos de disco de filme de carbono de área geométrica $\sim 0,020 \text{ cm}^2$ estudando-se a influência do pré-tratamento electroquímico em ácido perclórico 1,0 M. A janela de potencial, ou seja, o intervalo útil de potencial correspondente aos potenciais entre a libertação de hidrogénio e oxigénio, foi determinada anteriormente [307] para diversas soluções de electrólito (tampão $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{NaCH}_3\text{COO}$, NaClO_4 e $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{KCl}$) em eléctrodos de filme de carbono de forma cilíndrica e área de $\sim 0,20 \text{ cm}^2$. Verificou-se que o intervalo útil de potencial apresenta algumas diferenças consoante a solução de electrólito suporte utilizada. No caso da solução tampão acetato observaram-se maiores diferenças antes e após a aplicação do pré-tratamento em ácido perclórico, sendo que estas diferenças mais acentuadas na região dos potenciais negativos.

O objectivo deste estudo é verificar se o filme de carbono depositado no topo da resistência apresenta as mesmas características electroquímicas que o material depositado em todo o cilindro [7,9]. O pré-tratamento consistiu no varrimento de potencial, perfazendo 3 ciclos completos, em 1,0 M de ácido perclórico, num intervalo de potenciais definido por um máximo de corrente de $\pm 0,1 \text{ mA}$, o que corresponde $\sim -0,7 \text{ V}$ e $+1,0 \text{ V vs. SCE}$ [296].

Na Figura 4.1 apresentam-se os voltamogramas cíclicos obtidos com um eléctrodo de filme de carbono antes e após a aplicação do pré-tratamento (PT). De uma maneira geral, o limite de potencial positivo aumentou cerca de $0,1 \text{ V}$, ou seja de $\sim 1,8 \text{ V}$ para os eléctrodos sem pré-tratamento para $\sim 1,9 \text{ V (vs. SCE)}$ após o pré-tratamento electroquímico. Uma alteração mais significativa foi verificada para potenciais negativos, onde após aplicação do pré-tratamento o limite de potencial aumentou de $\sim -1,8 \text{ V}$ para $\sim -2,0 \text{ V (vs. SCE)}$. Para além do aumento do intervalo de potencial útil, verificou-se também uma diminuição da corrente de base. Vários eléctrodos sujeitos ao mesmo tipo de pré-tratamento apresentaram a mesma tendência após o pré-tratamento electroquímico, ou seja, obteve-se uma boa reprodutibilidade.

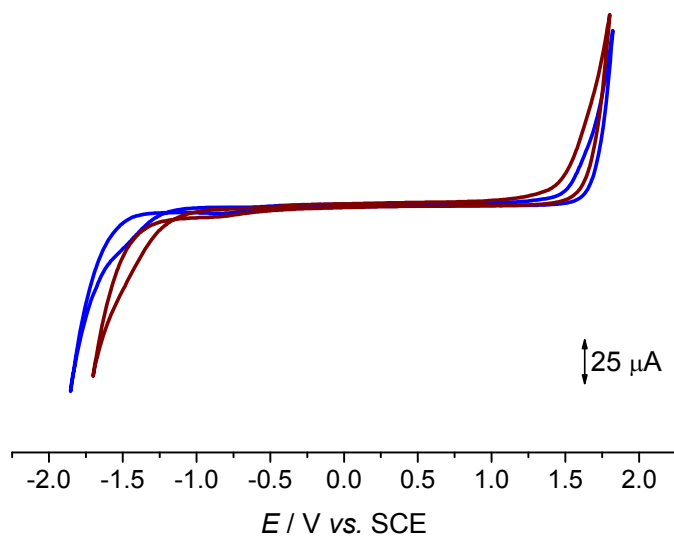


Figura 4.1 – Voltamogramas cíclicos em tampão acetato 0,1 M pH 4,4 para eléctrodos de disco filme de carbono, área 0,020 cm², (—) antes do pré-tratamento, (—) após pré-tratamento em ácido perclórico 1,0 M.

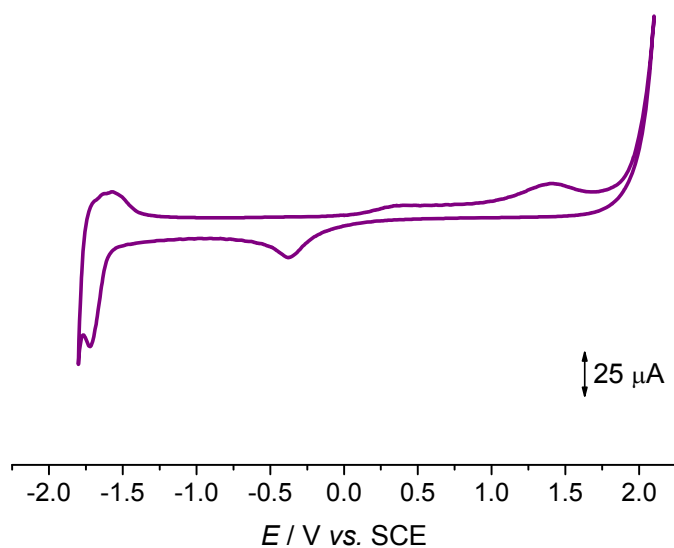


Figura 4.2 – Voltamograma cíclico em KNO₃ 0,1 M + HNO₃ 5 mM para eléctrodos de disco filme de carbono após pré-tratamento em ácido perclórico.

Uma outra solução de electrólito suporte, muito utilizada em voltametria de redissolução, KNO_3 0,1 M em HNO_3 5 mM [317] mostrou-se inadequada para este tipo de eléctrodos de filme de carbono. O voltamograma apresentado na Figura 4.2 mostra que mesmo após o pré-tratamento em ácido perclórico, as correntes de base dos eléctrodos permanecem muito altas, apresentando alguns picos atribuídos a processos oxidativos do filme de carbono, podendo eventualmente levar à sua destruição. Por estas razões, esta solução de electrólito não foi utilizada em estudos posteriores.

4.2.2.2 Espectroscopia de impedância electroquímica

Na presença de oxigénio dissolvido

Os eléctrodos de filme de carbono de 2Ω foram caracterizados por EIS na solução tampão acetato 0,1 M pH 4,4, estudando-se a influência do pré-tratamento electroquímico em ácido perclórico na superfície dos eléctrodos. Os espectros foram registados em diferentes valores de potencial escolhidos de modo a cobrir toda a janela de potencial observada na Figura 4.1. Os espectros em plano complexo obtidos para as duas situações estudadas, sem e com pré-tratamento electroquímico, encontram-se representados na Figura 4.3.

De uma primeira análise dos espectros da Figura 4.3 observa-se que a forma dos espectros não é alterada após PT, excepto para o potencial aplicado de $-1,0 \text{ V vs. SCE}$. A este potencial o semi-circulo obtido nos eléctrodos após PT, indica uma maior facilidade da redução dos óxidos da superfície do eléctrodo e do oxigénio dissolvido. Nos potenciais limite e a $-0,5 \text{ V}$ a evolução de hidrogénio e/ou oxigénio é responsável pelo semicírculo observado nos espectros, nas duas situações estudadas.

A modelação dos espectros de impedância da Figura 4.3 foi efectuada utilizando o circuito equivalente da Figura 4.4. Este circuito eléctrico é constituído por uma resistência R_Ω , a resistência da célula electroquímica em série com uma combinação em paralelo de um elemento de fase constante, CPE, com uma resistência associada à transferência de carga R_1 .

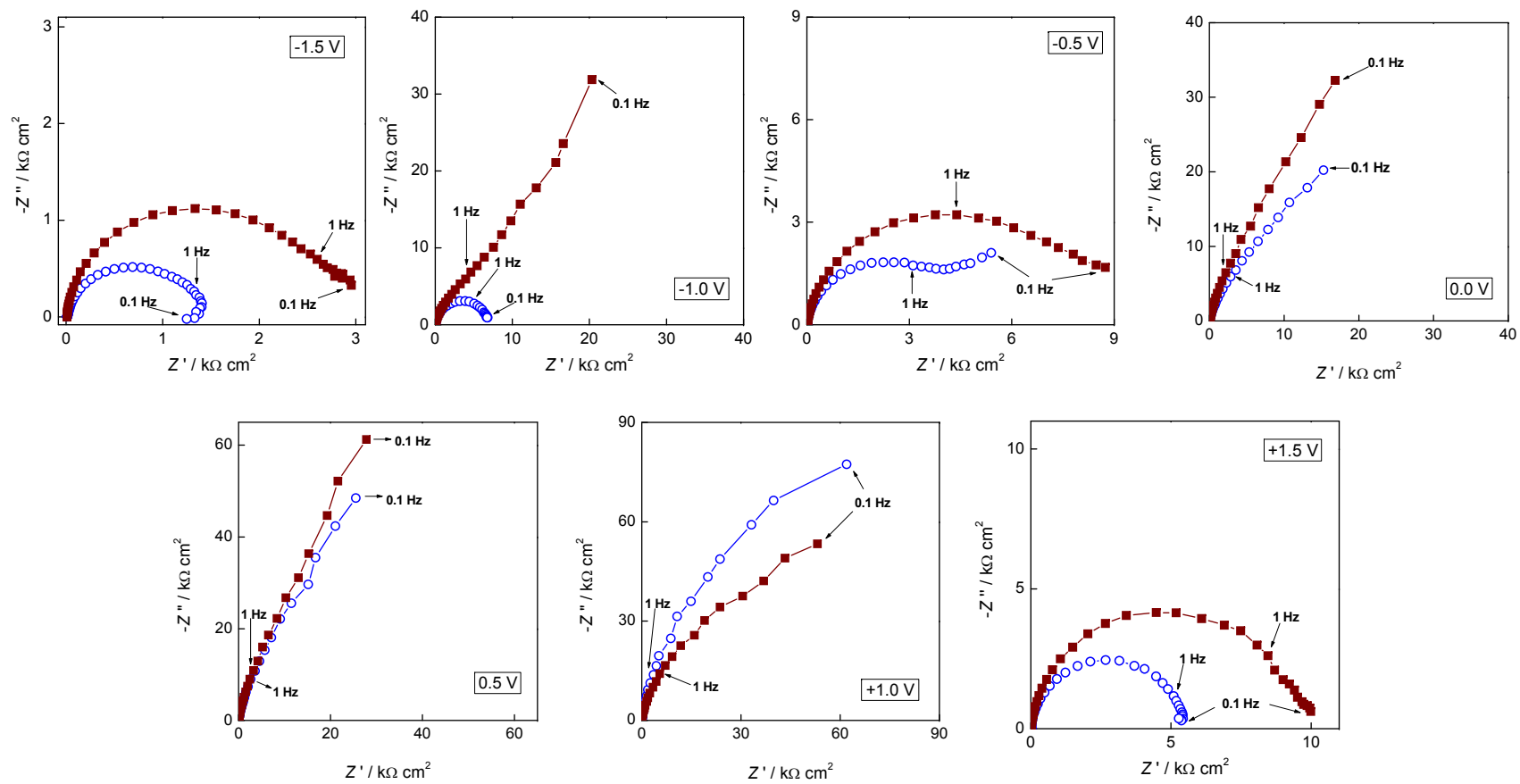


Figura 4.3 – Espectros de impedância no plano complexo obtidos com eléctrodos de filme de carbono 2Ω em solução tampão acetato sódio 0, 1 M pH 4,4 (■) antes e (○) após o pré-tratamento electroquímico em HClO_4 1,0 M.

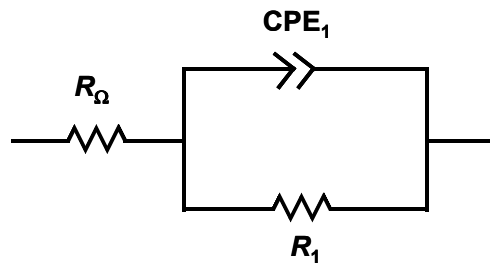


Figura 4.4 – Circuito eléctrico equivalente utilizado para a modelação dos espectros de EIS obtidos com os eléctrodos de filme de carbono de 2 Ω com e sem pré-tratamento.

O CPE encontra-se relacionado com a rugosidade e porosidade dos eléctrodos (veja-se o Capítulo 2), e é modelado como um condensador não-ideal de capacidade C_1 e um factor de rugosidade α de acordo com a expressão:

$$Z = -\frac{1}{C_1(i\omega)^\alpha} \quad (4.1)$$

O factor α encontra-se no intervalo de 0,5 a 1, sendo que $\alpha = 0,5$ para eléctrodos porosos e $\alpha = 1$ para eléctrodos perfeitamente lisos [1].

Devido à baixa reprodutibilidade entre ensaios observada nos espectros para frequências inferiores a 1 Hz, bem como, à forma dos espectros estar dependente do potencial aplicado, estes foram ajustados com o circuito da Figura 4.4. para frequências superiores a 1 Hz. Este circuito equivalente foi o mesmo que o utilizado no estudo da influência do pré-tratamento electroquímico em ácido perclórico de eléctrodos cilíndricos de filme de carbono [307].

Os valores obtidos nos ajustes estão sumariados na Tabela 4.1. Os erros máximos em cada parâmetro foram de 5% para R_1 , 3% para C_1 e inferiores a 0,5% para o factor α . A resistência da célula electroquímica, R_Ω , permaneceu inalterada após o pré-tratamento, sendo de $9,5 \pm 0,2 \Omega \text{ cm}^2$ ($N = 25$) e $9,3 \pm 0,3 \Omega \text{ cm}^2$ ($N = 18$) para os eléctrodos sem e com pré-tratamento, respectivamente, com N o número de espectros considerados.

Analisando a Tabela 4.1 pode observar-se que a resistência à transferência de carga apresenta valores mais altos na zona dos potenciais positivos, valores que aumentam com o pré-tratamento electroquímico. No entanto, R_1 diminuí com o pré-tratamento para

Tabela 4.1 – Dados obtidos do ajuste dos espectros de impedância dos eléctrodos de filme de carbono de 2 Ω ao circuito eléctrico equivalente.

| Tipo de eléctrodo | $E /$ V vs. SCE | $R_1 /$ $k\Omega \text{ cm}^2$ | $C_1 /$ $\mu\text{F cm}^{-2} \text{ s}^{\alpha-1}$ | α |
|-------------------|--------------------|-----------------------------------|---|----------|
| Sem PT | -1,5 | 2,6 | 8,4 | 0,94 |
| | -1,0 | 10,4 | 14,1 | 0,91 |
| | -0,5 | 7,2 | 19,1 | 0,91 |
| | 0,0 | 47,9 | 27,7 | 0,88 |
| | +0,5 | 77,6 | 15,2 | 0,91 |
| | +1,0 | 54,9 | 10,1 | 0,93 |
| | +1,5 | 9,5 | 5,1 | 0,96 |
| Com PT | -1,5 | 4,0 | 11,2 | 0,94 |
| | -1,0 | 6,5 | 13,4 | 0,94 |
| | -0,5 | 3,8 | 18,1 | 0,92 |
| | 0,0 | 20,4 | 31,0 | 0,88 |
| | +0,5 | 123 | 16,3 | 0,93 |
| | +1,0 | 126 | 10,4 | 0,92 |
| | +1,5 | 5,6 | 7,01 | 0,95 |

potenciais negativos, o que pode ser devido à maior facilidade da redução dos óxidos da superfície do eléctrodo e do oxigénio dissolvido, situação evidente para $-0,5$ V. Os valores mais baixos foram obtidos aos potenciais aplicados de $-1,5$ V e $+1,5$ V, devidos à evolução de hidrogénio e oxigénio, respectivamente. Os valores da capacitância aumentam com o pré-tratamento em todos os potenciais estudados, o que está de acordo com uma superfície mais reactiva e maior eficiência na separação de cargas. Da mesma forma que R_1 , quando ocorre evolução de hidrogénio ou oxigénio, a capacitância C_1 apresenta os valores mais baixos. O factor α permanece inalterado com o pré-tratamento.

Na ausência de oxigénio dissolvido

A presença de oxigénio dissolvido pode influenciar as reacções de eléctrodo, conforme foi verificado para o potencial de $-1,0$ V. Desta forma, foram efectuados ensaios

de EIS na ausência de oxigénio dissolvido. Os potenciais aplicados foram $-1,5\text{ V}$, $-1,0\text{ V}$ e $-0,5\text{ V}$, *i.e.*, potenciais onde o oxigénio pode ser reduzido. Na Figura 4.5 apresentam-se os espectros obtidos para os eléctrodos após o pré-tratamento na presença e na ausência de oxigénio dissolvido, para frequências de 65,5 kHz a 1,0 Hz. Os parâmetros obtidos por modelação dos espectros obtidos com os eléctrodos sem e com PT na ausência de oxigénio dissolvido ao circuito equivalente da Figura 4.4 estão sumariados na Tabela 4.2. Os erros associados a cada parâmetro são da mesma ordem de grandeza que os observados anteriormente para os espectros na presença de oxigénio dissolvido.

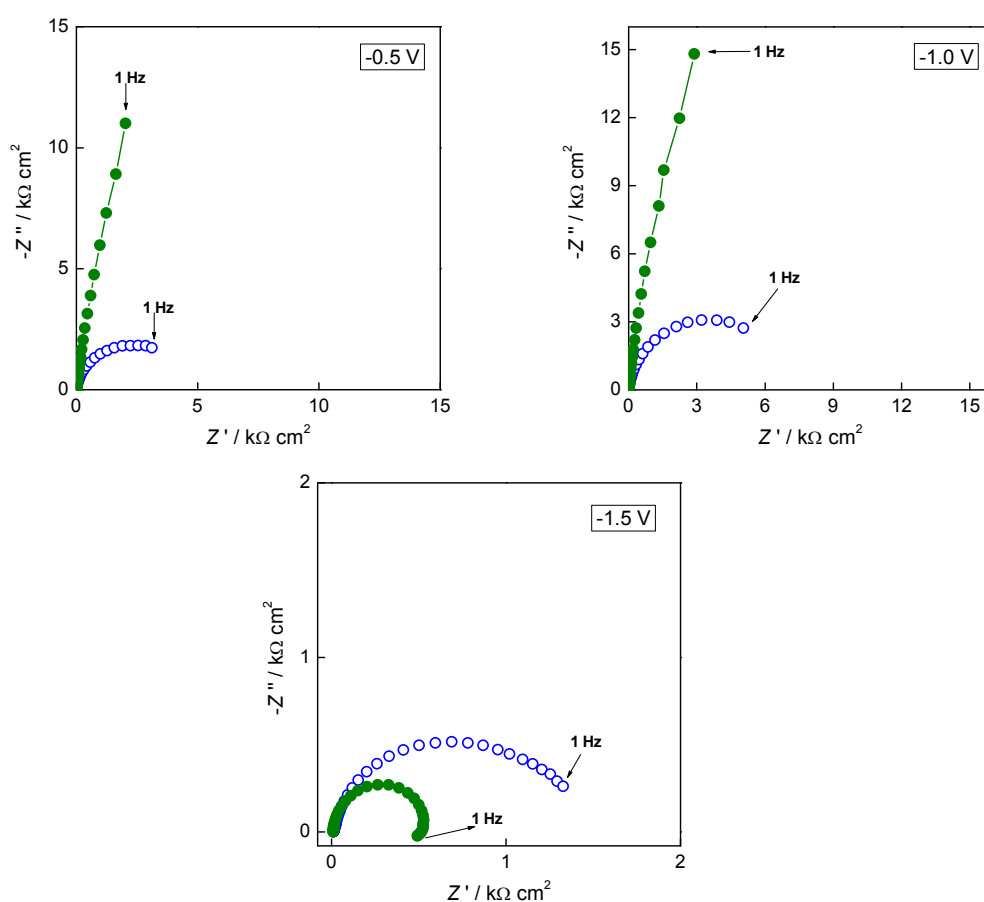


Figura 4.5 – Espectros de impedância no plano complexo obtidos em solução tampão acetato 0,1 M pH 4,4 com eléctrodos de filme de carbono $2\ \Omega$ com pré-tratamento (○) na presença e (●) na ausência de oxigénio dissolvido.

Tabela 4.2 – Dados obtidos do ajuste dos espectros de impedância da Figura 4.5.

| Tipo de eléctrodo | $E /$ V vs. SCE | $R_1 /$ $\text{k}\Omega \text{ cm}^2$ | $C_1 /$ $\mu\text{F cm}^{-2} \text{ s}^{\alpha-1}$ | α_1 |
|-------------------|--------------------|--|---|------------|
| Sem PT | -1,5 | 0,5 | 6,2 | 0,98 |
| | -1,0 | 112 | 9,8 | 0,96 |
| | -0,5 | 85,8 | 17,2 | 0,93 |
| Com PT | -1,5 | 0,4 | 7,2 | 0,97 |
| | -1,0 | 137 | 10,1 | 0,95 |
| | -0,5 | 159 | 16,5 | 0,93 |

Observa-se nestes casos um grande aumento na magnitude de impedância após a remoção de oxigénio aos potenciais de -0,5 e -1,0 V, comportamento já observado anteriormente para eléctrodos de carbono vítreo [317]. A estes dois potenciais, comparando os resultados da Tabela 4.1 com os da Tabela 4.2, verifica-se um aumento drástico de R_1 para os dois tipos de superfícies na ausência de oxigénio, acompanhado da diminuição da capacitância das interfaces. Estes aumentos da magnitude de impedância e de R_1 podem ser atribuídos à dificuldade do processo de transferência de carga, redução de oxigénio, proveniente sobretudo da redução dos óxidos da superfície dos eléctrodos. Ocorre também um ligeiro aumento do valor de α , *i.e.*, a superfície torna-se mais lisa.

As conclusões retiradas com os eléctrodos de filme de carbono de 2 Ω em forma de disco no que diz respeito à janela de potencial e EIS em solução tampão acetato 0,1 M estão de acordo com as anteriormente retiradas para os eléctrodos em forma de cilindro [307].

4.2.2 Resistências de 1,5 Ω , 15 Ω , 140 Ω e 2 $\text{k}\Omega$

4.2.2.1 Voltametria Cíclica

Janela de potencial

A janela de potencial dos diferentes eléctrodos de resistências de filme de carbono de forma cilíndrica foi estudada em duas soluções tampão: acetato 0,1 M pH 4,2 e PBS 0,1 M pH 7,0. Na Figura 4.6 mostram-se as respostas típicas obtidas para os eléctrodos

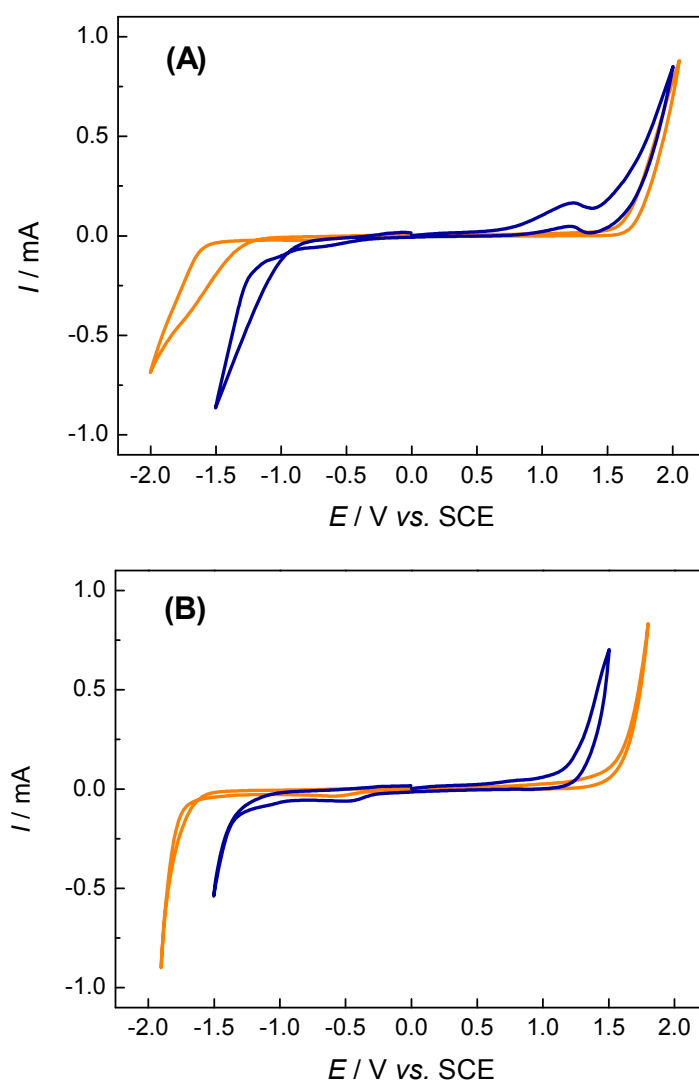


Figura 4.6 – Voltamogramas cíclicos em (A) tampão acetato 0,1 M pH 4,2 e (B) tampão PBS 0,1 M pH 7,0 de eléctrodos de filme de carbono de resistência nominal $1,5 \Omega$, área $0,20 \text{ cm}^2$, antes (—) e após (—) aplicação de pré-tratamento. Pré-tratamento: $+0,9 \text{ V vs. SCE}$ durante 4 min na mesma solução de electrólito.

de $1,5 \Omega$ nas duas soluções utilizadas, antes e após a aplicação de um pré-tratamento electroquímico. Este consistiu na aplicação de um potencial fixo positivo, $+0,9 \text{ vs. SCE}$ durante 4 min na solução de electrólito em estudo. A aplicação do potencial fixo positivo como pré-tratamento promove a oxidação dos grupos da superfície do eléctrodo, influenciando as características e o comportamento electroquímico do sensor. Um pré-tratamento semelhante foi utilizado em [297], quando eléctrodos de resistência nominal de 2Ω foram empregues como substrato para o desenvolvimento de biossensores enzimáticos

de glucose com a enzima glucose oxidase obtendo-se uma melhor reprodutibilidade para a detecção de H_2O_2 produzido.

Nas duas soluções de electrólito observou-se uma diminuição da corrente de fundo e um aumento da janela de potencial após a aplicação do pré-tratamento. Estudaram-se vários intervalos de tempo de aplicação do potencial de 1 a 6 minutos, tendo sido verificado que para pré-tratamentos superiores a 4 minutos não ocorriam mais variações na sobretensão e na corrente capacitiva [11]. Por esta razão, optou-se por aplicar o potencial $+0,9 \text{ V vs. SCE}$ durante apenas 4 minutos, quando utilizado este tipo de pré-tratamento

Foram observadas alterações mais significativas na janela de potencial dos eléctrodos em solução tampão PBS após a aplicação do pré-tratamento, com um aumento de $\sim 300\text{-}400 \text{ mV}$ nos limites de potencial negativo e positivo. Em tampão acetato estas não foram tão acentuadas após o pré-tratamento. O limite de potencial negativo aumentou entre 200 a 400 mV , enquanto que o positivo apresentou um aumento inferior a 200 mV .

O comportamento típico apresentado para as resistências de $1,5 \Omega$ foi também obtido para as resistências de 15Ω e 140Ω . Uma excepção ocorre com eléctrodos feitos a partir das resistências de $2 \text{ k}\Omega$, Figura 4.7.

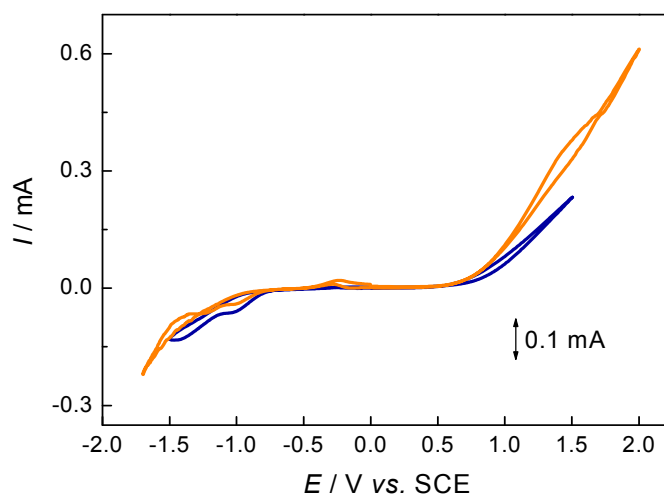


Figura 4.7 – Voltamogramas cíclicos em tampão acetato $0,1 \text{ M}$ $\text{pH } 4,2$ de eléctrodos de filme de carbono de resistência nominal $2,0 \text{ k}\Omega$, área $0,20 \text{ cm}^2$, antes (—) e após (—) aplicação de pré-tratamento. Pré-tratamento: $+0,9 \text{ V vs. SCE}$ durante 4 min na mesma solução tampão.

Neste caso, na solução tampão acetato não ocorreram alterações nos voltamogramas cíclicos obtidos antes e após a aplicação do pré-tratamento, sendo a janela de potencial muito estreita para a utilização destes eléctrodos em sensores electroquímicos. Em solução tampão PBS os perfis voltamétricos destes eléctrodos apresentaram as mesmas características das observadas na Figura 4.7.

Uma melhor comparação das janelas de potencial obtidas com os eléctrodos de menores resistências nominais após o pré-tratamento electroquímico pode ser visualizada na Figura 4.8.

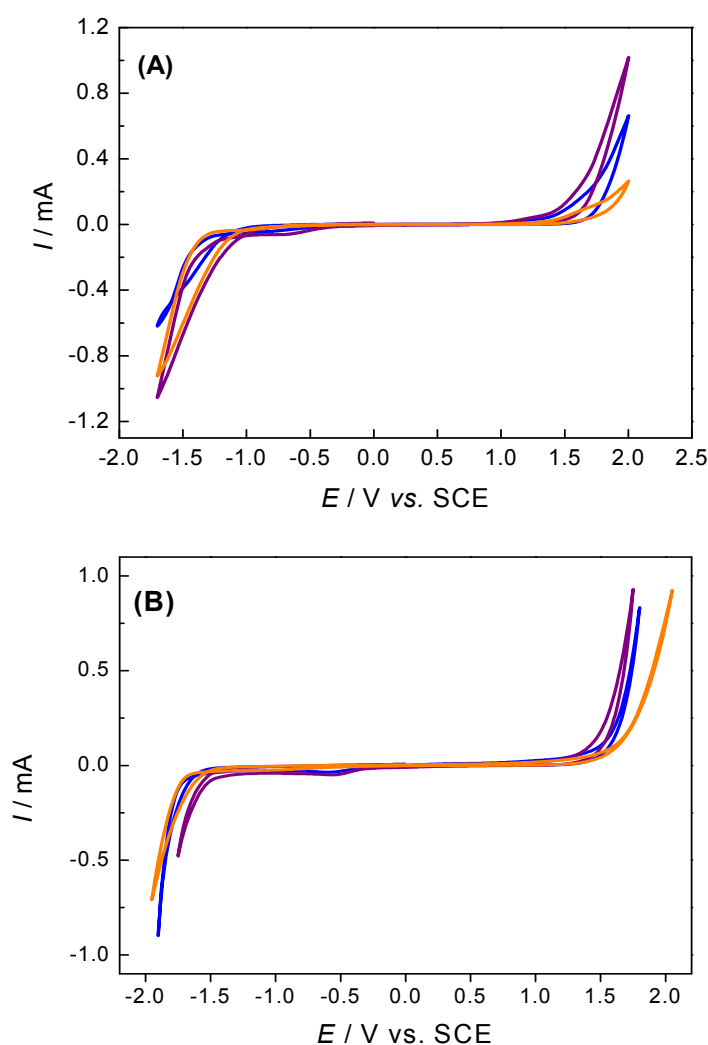


Figura 4.8 – Voltamogramas cíclicos em (A) tampão acetato 0,1 M pH 4,2 e (B) tampão PBS 0,1 M pH 7,0 de eléctrodos de filme de carbono de resistência nominal (—) 1,5 Ω (—) 15 Ω e (—) 140 Ω, área 0,2 cm², após aplicação de pré-tratamento. Pré-tratamento: +0,9 V vs. SCE durante 4 min na mesma solução de electrólito.

De um modo geral, pode concluir-se que as janelas de potencial destas resistências são semelhantes às obtidas com as resistências de 2 Ω (Figura 4.1) [7,296] e às de 2 Ω e 20 Ω obtidas em [307]. A repetição destas experiências com diferentes eléctrodos com a mesma resistencia nominal mostrou uma excelente reprodutibilidade nos voltamogramas cíclicos obtidos após o pré-tratamento.

Oxidação de hexacianoferrato (II) de potássio

A oxidação do hexacianoferrato (II) de potássio foi estudada por voltametria cíclica nos eléctrodos de filme de carbono de resistências nominais de 1,5 Ω , 15 Ω e 140 Ω com e sem pré-tratamento. Este sistema redox é habitualmente utilizado para a caracterização de eléctrodos uma vez que a sua cinética é tipicamente reversível, tornando possível a comparação do comportamento dos eléctrodos de filme de carbono com os eléctrodos de carbono vítreo, dado que este está bem documentado na literatura. Na Figura 4.9 apresentam-se os voltamogramas cíclicos obtidos com as resistências de 1,5 Ω de uma solução $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 1,0 mM em Na_2SO_4 0,4 M a diferentes velocidades de varrimento após subtracção da linha de base obtida no electrólito suporte. Observa-se uma melhoria na definição dos picos de oxidação e redução, bem como um aumento da sua intensidade, nos eléctrodos sujeitos a pré-tratamento. Neste caso os eléctrodos foram pré-tratados em tampão acetato, mas os perfis voltamétricos obtidos em eléctrodos pré-tratados em PBS foram semelhantes aos da Figura 4.9(B).

Na Tabela 4.3 encontram-se sumariados os parâmetros obtidos da análise dos voltamogramas do sistema redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ em eléctrodos de 1,5 Ω com e sem pré-tratamento electroquímico. De forma a estudar a reprodutibilidade dos parâmetros, utilizaram-se 3 eléctrodos diferentes com a mesma resistência nominal.

A constante de velocidade padrão, k_0 , foi determinada através do método de Nicholson [270]. Partindo da separação entre os picos anódico e catódico, ΔE_p , obtém-se um parâmetro Ψ que está relacionado com a constante de velocidade pela equação:

$$\Psi = \frac{(D_O / D_R)^{\alpha/2} k_0}{[D_O \pi \nu (nF / RT)]^{1/2}} = 36,3276 \frac{k_0}{\sqrt{\nu}} \quad (4.2)$$

com ν a velocidade de varrimento (V s^{-1}), $D_O = D_R = 6,2 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ [318] os coeficientes de difusão das formas oxidadas e reduzidas do hexacianoferrato (II) e $\alpha = 0,5$.

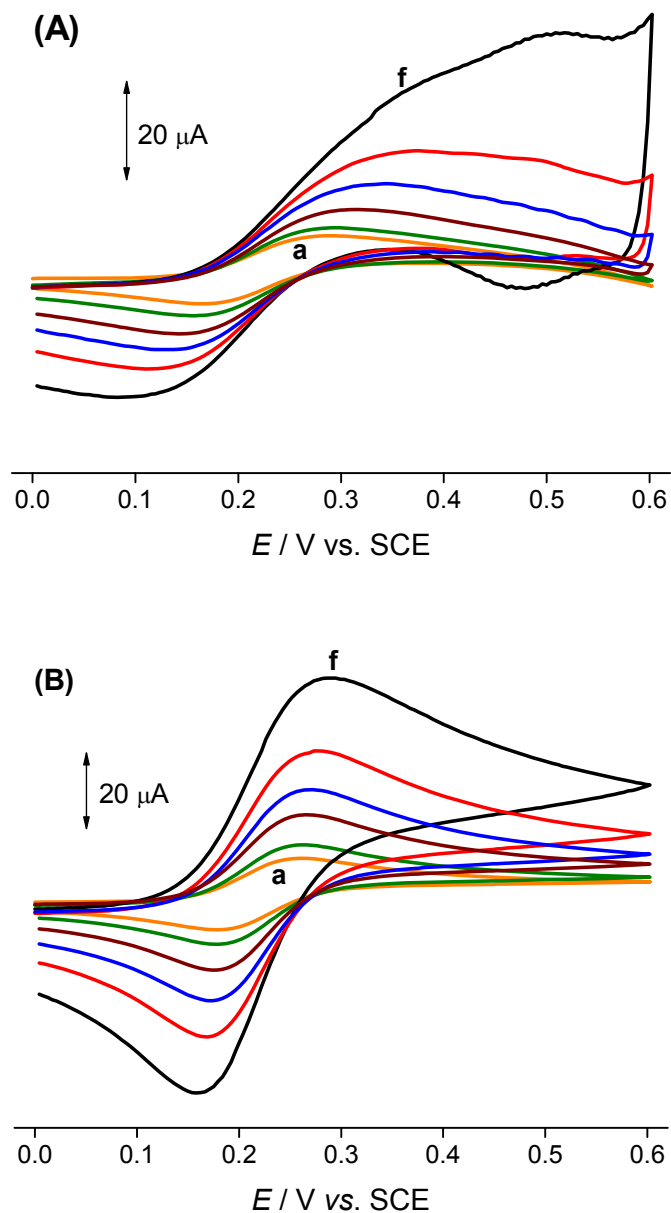


Figura 4.9 – Voltamogramas cíclicos de uma solução $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 1 mM em K_2SO_4 0,4 M registados a diferentes velocidades de varrimento de 10 a 500 mV s^{-1} (a-f), obtidos para eléctrodos de resistência $1,5 \Omega$. (A) sem pré-tratamento electroquímico e (B) com pré-tratamento electroquímico.

Tabela 4.3 – Parâmetros obtidos através dos voltamogramas cíclicos de 1 mM de $K_4Fe(CN)_6$ em K_2SO_4 0,4 M com eléctrodos de $1,5 \Omega$ com e sem pré-tratamento (PT). (Valor médio e desvio padrão de 3 eléctrodos).

| Tipo de eléctrodo | $\nu / V s^{-1}$ | $ I_{pc} / I_{pa} $ | $\Delta E_p / V$ | $k_0 \times 10^3 / cm s^{-1}$ |
|-------------------|------------------|---------------------|-------------------|-------------------------------|
| Sem PT | 0,010 | $0,61 \pm 0,01$ | $0,111 \pm 0,005$ | $1,20 \pm 0,14$ |
| | 0,020 | $0,62 \pm 0,01$ | $0,120 \pm 0,003$ | $1,42 \pm 0,09$ |
| | 0,050 | $0,63 \pm 0,05$ | $0,146 \pm 0,005$ | $1,43 \pm 0,05$ |
| | 0,100 | $0,64 \pm 0,03$ | $0,165 \pm 0,005$ | $1,57 \pm 0,03$ |
| | 0,200 | -- | -- | -- |
| | 0,500 | -- | -- | -- |
| Com PT | 0,010 | $0,85 \pm 0,01$ | $0,074 \pm 0,002$ | $4,80 \pm 0,65$ |
| | 0,020 | $0,88 \pm 0,02$ | $0,075 \pm 0,002$ | $6,31 \pm 0,81$ |
| | 0,050 | $0,90 \pm 0,03$ | $0,076 \pm 0,002$ | $9,70 \pm 0,15$ |
| | 0,100 | $0,91 \pm 0,04$ | $0,085 \pm 0,003$ | $8,39 \pm 0,13$ |
| | 0,200 | $0,92 \pm 0,04$ | $0,097 \pm 0,003$ | $7,55 \pm 0,67$ |
| | 0,500 | $0,93 \pm 0,05$ | $0,108 \pm 0,004$ | $9,25 \pm 0,11$ |

Verifica-se uma melhoria na cinética da electro-oxidação após pré-tratamento, com valores e tendências características de um sistema *quasi*-reversível. Os valores de k_0 obtidos com os eléctrodos com pré-tratamento (entre $4,8$ e $9,7 \times 10^{-3} cm s^{-1}$) revelam uma cinética mais rápida nos eléctrodos com o pré-tratamento quando comparados com os eléctrodos sem pré-tratamento (k_0 entre $1,2$ e $1,6 \times 10^{-3} cm s^{-1}$). Foram obtidos resultados semelhantes para k_0 em eléctrodos de filme de carbono de 2Ω [296] após pré-tratamento em ácido perclórico, e em boa concordância com resultados em eléctrodos de carbono vítreo [318].

Os eléctrodos de 15Ω antes do pré-tratamento apresentaram voltamogramas cíclicos análogos aos da Figura 4.9A, no entanto, após o pré-tratamento não foram detectados nos voltamogramas os picos característicos do sistema redox $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$. A constante de velocidade padrão obtida para este sistema redox com eléctrodos de 15Ω antes do pré-tratamento foi de $\sim 3.0 \times 10^{-3} cm s^{-1}$.

A oxidação do hexacianoferrato (II) de potássio foi também estudada em eléctrodos de resistência de 140 Ω , no entanto os voltamogramas não apresentaram qualquer pico de oxidação e redução mesmo após o pré-tratamento, pelo que não foi possível retirar informações acerca da cinética neste tipo de eléctrodos.

4.2.2.2 Espectroscopia de impedância electroquímica

Os eléctrodos de resistência 1,5 Ω , 15 Ω e 140 Ω com pré-tratamento electroquímico foram caracterizados através de EIS nas soluções tampão acetato 0,1 M pH 4,2 e PBS 0,1 M pH 7,0 [11]. Os espectros foram registados em diferentes valores de potencial de modo a cobrir toda a janela de potencial, *i.e.*, entre +1,5 e -1,5 V *vs.* SCE. Como ilustração dos resultados obtidos, na Figura 4.10 estão representados os espectros de impedância em plano complexo obtidos aos potenciais de -1,0 V e -0,5 V nas duas soluções utilizadas.

De um modo geral as magnitudes de impedância foram mais elevadas na solução de PBS em relação à solução tampão acetato. A forma dos espectros obtidos em potenciais negativos com os eléctrodos de 1,5 e 15 Ω é de uma maneira geral a mesma, apesar a impedância apresentar maiores valores com os eléctrodos de 1,5 Ω . No caso destas últimas, os valores obtidos são da mesma ordem de grandeza que os anteriormente discutidos para as resistências de 2 Ω [7,307]. Uma excepção ocorre a -1,0 V (ver Figura 4.3), onde o espectro com os eléctrodos de 2,0 Ω apresenta um semi-círculo mais fechado explicado pela evolução de hidrogénio à superfície deste eléctrodo. O comportamento diferente a este potencial pode ser atribuído ao pré-tratamento utilizado nas duas situações (ácido perclórico para os eléctrodos de 2 Ω e potencial fixo +0,9 V durante 4 min nos eléctrodos de 1,5 Ω), produzir diferentes grupos funcionais nas superfícies.

Aos potenciais de 0,0 V e +0,5 V os espectros obtidos nos dois electrólitos estudados mostram um comportamento típico de um condensador não ideal, do mesmo modo que o mostrado com as resistências de 2 Ω em solução tampão acetato [7,307]. A potenciais superiores a +0,5 V ocorreu evolução de oxigénio de acordo com os semi-círculos e os menores valores de impedância obtidos a estes potenciais.

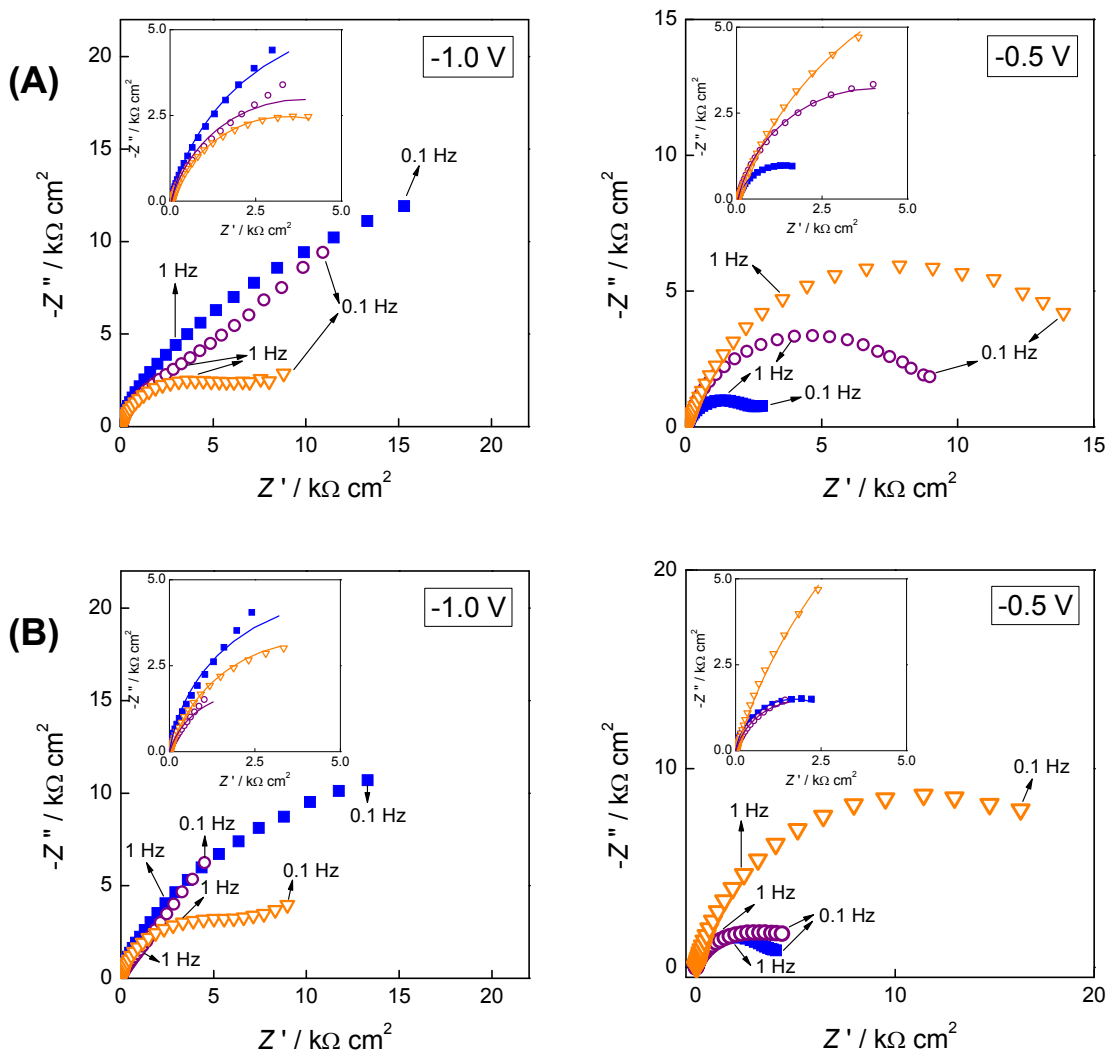


Figura 4.10 – Espectros em plano complexo obtidos a -1,0 e -0,5 V vs. SCE em eléctrodos de filme de carbono (■) 1,5, (○) 15 and (▽) 140 Ω, em tampão (A) acetato 0,1 M pH 4,2 e (B) PBS pH 7,0. No painel inserido: Espectros para $f > 1$ Hz (símbolos com o mesmo significado anterior e as linhas representam o ajuste ao circuito equivalente).

A modelação dos espectros de impedância para a zona de altas frequências, ou seja, para frequências acima de 1 Hz, foi efectuada utilizando o circuito equivalente da Figura 4.4 que inclui uma resistência da célula, R_{Ω} , em série com uma combinação em paralelo RCPE. O elemento CPE foi necessário devido ao carácter das respostas em forma de semi-círculo com depressão e a heterogeneidade da superfície dos eléctrodos. Este circuito tem sido utilizado para o ajuste dos espectros de impedância das resistências de 2 Ω [7,307] para frequências superiores a 1 Hz. Esta limitação foi imposta para que fosse possível efectuar uma comparação entre os diferentes eléctrodos e para os vários potenciais

aplicados. A comparação torna-se difícil com a colocação de mais elementos no circuito para dar conta de todos os processos que ocorrem para frequências inferiores a 1 Hz. Como pode ser observado pela Figura 4.10, obtém-se pouca reprodutibilidade nos espectros entre eléctrodos de resistências diferentes, para além de a forma dos espectros estar dependente do potencial aplicado.

No intervalo de frequências escolhido, os erros nos ajustes dos dados ao circuito equivalente são entre 1 – 10 % para a resistência R_1 , 0,8 – 3 % para a capacitância C_1 , e inferiores a 1% para o factor α_1 . Os resultados dos ajustes estão apresentados na Tabela 4.4.

A resistência da célula R_Ω foi superior na solução tampão acetato e aumenta com a resistência nominal dos eléctrodos apresentando valores de $42 \pm 1 \Omega \text{ cm}^2$, $47 \pm 1 \Omega \text{ cm}^2$ e $61 \pm 2 \Omega \text{ cm}^2$ calculados através da média de 7 espectros para os eléctrodos de 1,5 Ω , 15 Ω e 140 Ω , respectivamente. Em solução tampão PBS, R_Ω foi de $7,6 \pm 0,2 \Omega \text{ cm}^2$ para os electrodos de 1,5 Ω , $9,2 \pm 0,3 \Omega \text{ cm}^2$ para os de 15 Ω , and $26 \pm 1 \Omega \text{ cm}^2$ para os de 140 Ω , valores calculados através de 7 espectros.

Nas duas soluções, quando aplicados potenciais negativos obtiveram-se valores mais elevados para a resistência à transferência de carga e para a capacitância nos eléctrodos de 1,5 Ω , excepto para o potencial de -0,5 V onde se observaram os valores mais elevados de capacitância e menor resistência R_1 . Esta menor resistência à transferência de carga está associada á maior facilidade de oxidação da superfície e do oxigénio dissolvido nestes eléctrodos, que apresentam um filme de carbono mais espesso em comparação com os outros eléctrodos (a resistência nominal é inversamente proporcional à espessura do filme).

No caso dos parâmetros obtidos a potenciais positivos a tendência não é tão clara como a anterior, contudo para +0,5 V o comportamento é análogo ao dos potenciais negativos, *i.e.*, os eléctrodos de 1,5 Ω apresentaram os valores mais elevados para a capacitância e para a resistência R_1 .

Nos limites do intervalo de potencial utilizado para registar os espectros de impedância, ou seja, -1,5 V e +1,5 V, os menores valores de resistência à transferência de carga estão relacionados com a evolução de hidrogénio e oxigénio, respectivamente.

Tabela 4.4 – Dados obtidos através da análise dos espectros de EIS dos electrodos de filme de carbono de diferentes resistências nominais em tampão acetato 0,1 M pH 4,2 (Acet) e a tampão fosfato salino 0,1 M pH 7,0 (PBS). (*R* nom.: resistência nominal dos CFE).

| <i>R</i> nom. / Ω | <i>E</i> / V vs SCE | <i>R</i> ₁ / k Ω cm ² | | <i>C</i> ₁ / μ F cm ⁻² s ^{α-1} | | α | |
|-----------------------------|------------------------|--|------|---|------|----------|------|
| | | Acet | PBS | Acet | PBS | Acet | PBS |
| 1,5 | -1,5 | 0,53 | 1,01 | 10,8 | 17,3 | 0,95 | 0,94 |
| | -1,0 | 12,4 | 9,83 | 28,8 | 28,2 | 0,86 | 0,91 |
| | -0,5 | 2,57 | 3,45 | 59,1 | 35,9 | 0,83 | 0,91 |
| | 0,0 | 210 | — | 22,5 | 24,1 | 0,91 | 0,91 |
| | +0,5 | — | 153 | 40,7 | 19,4 | 0,88 | 0,93 |
| | +1,0 | 43,4 | 64,7 | 21,8 | 15,1 | 0,90 | 0,94 |
| | +1,5 | 5,59 | 0,41 | 8,24 | 13,2 | 0,95 | 0,94 |
| 15 | -1,5 | 0,24 | 2,76 | 17,2 | 90,7 | 0,88 | 0,83 |
| | -1,0 | 7,62 | 4,45 | 26,3 | 88,7 | 0,84 | 0,81 |
| | -0,5 | 8,03 | 3,78 | 24,9 | 70,6 | 0,86 | 0,83 |
| | 0,0 | 186 | 47,3 | 23,3 | 26,4 | 0,84 | 0,88 |
| | +0,5 | 400 | 77,6 | 20,2 | 22,8 | 0,86 | 0,89 |
| | +1,0 | 76,5 | 70,7 | 19,2 | 19,2 | 0,87 | 0,91 |
| | +1,5 | 3,66 | 0,22 | 11,3 | 25,7 | 0,92 | 0,94 |
| 140 | -1,5 | 0,25 | 0,51 | 69,1 | 33,9 | 0,70 | 0,81 |
| | -1,0 | 6,75 | 8,33 | 25,7 | 34,0 | 0,80 | 0,83 |
| | -0,5 | 20,9 | 23,7 | 35,6 | 38,7 | 0,79 | 0,83 |
| | 0,0 | — | — | 41,7 | 38,2 | 0,78 | 0,81 |
| | +0,5 | — | — | 31,9 | 27,3 | 0,81 | 0,85 |
| | +1,0 | 119 | 79,1 | 21,4 | 20,6 | 0,83 | 0,87 |
| | +1,5 | 1,24 | 0,97 | 26,5 | 25,3 | 0,78 | 0,83 |

Em relação ao expoente α este apresenta maiores valores na solução de PBS, que diminuem com o aumento da resistência nominal dos electrodos, revelando um superfície mais rugosa para os electrodos de menor resistência.

Outro aspecto interessante diz respeito aos parâmetros obtidos com as resistências de 15 Ω em solução tampão PBS. Estas resistências apresentaram os valores mais elevados de capacitância, e a potenciais negativos a resistência à transferência de carga é mais baixa, sugerindo que a reacção de transferência de carga deverá ocorrer mais facilidade nestes electrodos.

Na Figura 4.11 encontram-se representados os gráficos da parte imaginária da impedância, Z'' em função do logaritmo da frequência, Z'' vs. $\lg f$, para os diferentes tipos de eléctrodos em solução tampão acetato. Estes gráficos são bastante úteis pois permitem observar diferenças no comportamento da região interfacial em diferentes condições experimentais. Os semicírculos nos gráficos em plano complexo, devidos a uma resistência, R , em paralelo com uma capacitância, C , originam picos nos gráficos $-Z''$ vs. $\lg f$, sendo que o máximo do pico, obtido quando $\omega RC=1$ (ω em radianos), corresponde à constante de tempo do processo de transferência de carga.

Em conjunto com os espectros de plano complexo, os gráficos de $-Z''$ vs. $\lg f$, permitem retirar as seguintes conclusões:

- ❑ A forma dos espectros não está dependente da solução de electrólito utilizada;
- ❑ O pico obtido nos gráficos $-Z''$ vs. $\lg f$ ao potencial de -0,5 V desloca-se para valores mais pequenos, com o aumento da resistência nominal dos eléctrodos, o que pode ser atribuído a uma maior dificuldade de redução dos óxidos da superfície e do oxigénio dissolvido nos eléctrodos de 140 Ω ;
- ❑ A potenciais positivos, não há evidência de processos de transferência de carga. Esta situação também é verificada para o potencial de -1,0 V quando utilizados eléctrodos de 1,5 Ω e 15 Ω . Contudo, com os eléctrodos de 140 Ω a -1,0 V e em frequências inferiores a 1 Hz, observa-se o aparecimento de uma outra característica, que pode ser relacionada com a ocorrência de um outro processo, provavelmente devido à presença de materiais não condutores introduzidos na produção do filme carbono por forma a aumentar a sua resistência nominal.

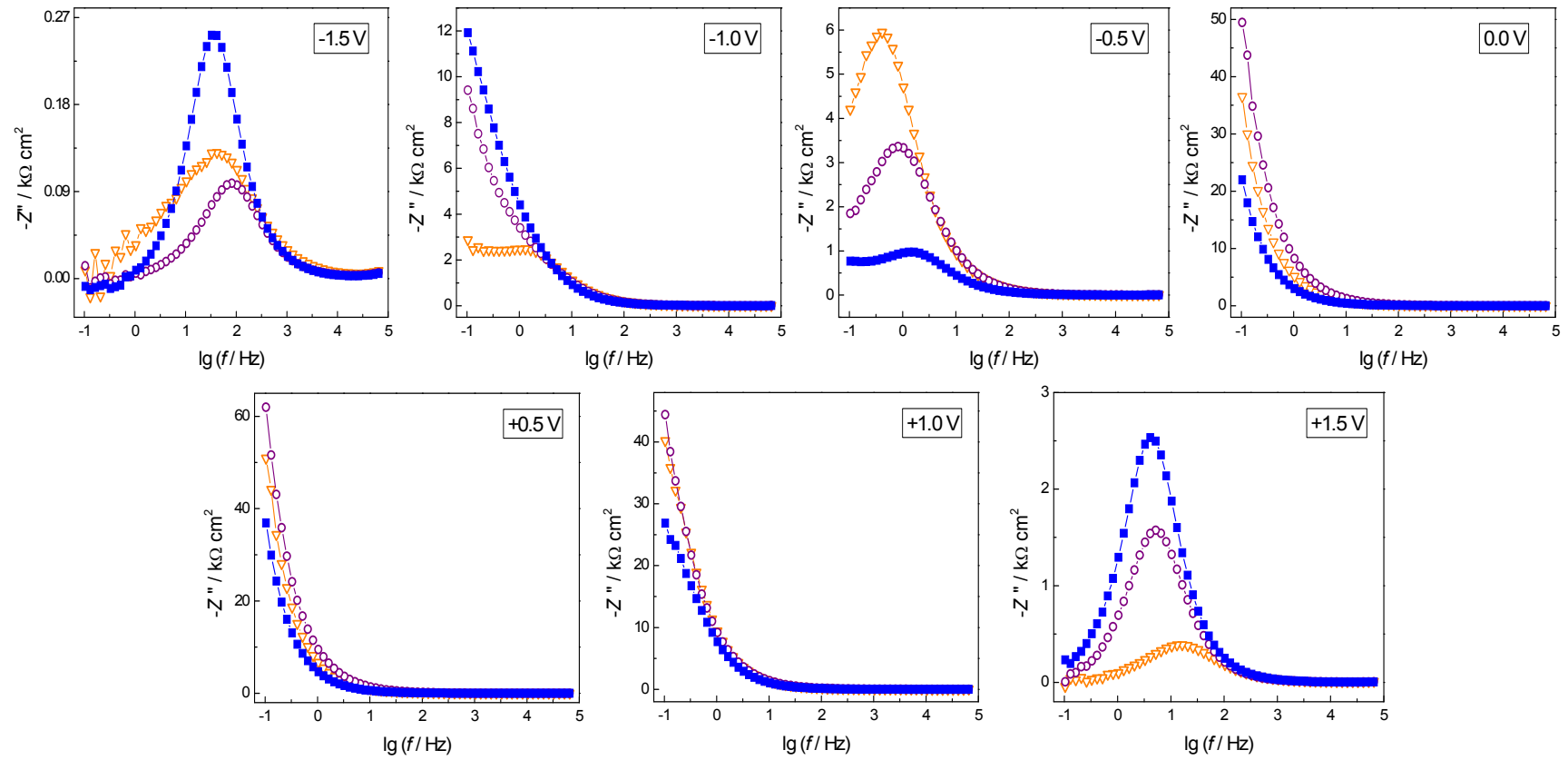


Figura 4.11 – Gráficos de $-Z''$ vs $\lg f$ de eléctrodos de filme de carbono de resistência nominal (■) 1,5 Ω ; (○) 15 Ω e (▽) 140 Ω em solução tampão acetato 0,1 M pH 4,2.

4.3. Análise de superfície

4.3.1. Microscopia de força atômica

A microscopia de força atômica em modo de contacto (c-AFM) foi utilizada para caracterizar a morfologia local dos eléctrodos de filme de carbono de várias resistências nominais. Não foi possível efectuar esta análise com as resistências de 2 Ω , devido à pequena dimensão destas. O c-AFM foi executado em filmes de carbono depositados em superfícies cilíndricas de cerâmica de maior dimensão que foram mais tarde cortadas com lâmina de diamante para um tamanho adequado, analisando-se a superfície do topo do cilindro. As imagens obtidas com as resistências de 1,5 Ω e 140 Ω sem qualquer tipo de pré-tratamento encontram-se nas Figura 4.12, respectivamente. Estas imagens revelam a nanoestrutura dos filmes de carbono. As resistências de 15 Ω apresentaram uma morfologia semelhante às de 1,5 Ω , e as de 2,0 k Ω semelhantes às de 140 Ω .

As análises de rugosidade foram efectuadas em imagens de 25 $\mu\text{m} \times 25 \mu\text{m}$, que revelaram algumas diferenças nos parâmetros morfológicos com o tipo de resistência. Definindo rugosidade média, R_a , como o desvio médio absoluto das irregularidades na altura ao longo de uma linha de amostragem [319]

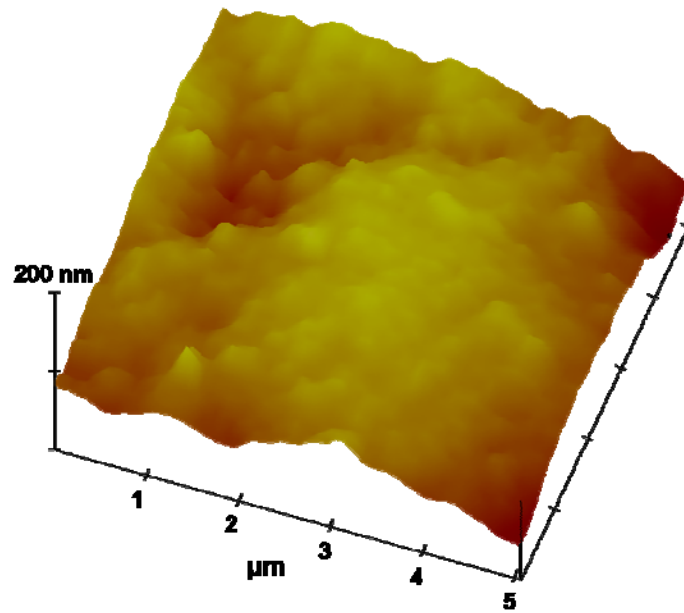
$$R_a = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |y_i| \quad (4.3)$$

verifica-se que esta aumenta com o aumento na resistência nominal dos eléctrodos, com valores típicos de ~ 88 nm para as resistências de 1,5 Ω e ~ 270 nm para as de 140 Ω . Pode ainda definir-se outro parâmetro de rugosidade R_q , rugosidade média quadrática, como o desvio padrão da distribuição das alturas da superfície [319]

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i^2} \quad (4.4)$$

parâmetro que é mais sensível que R_a a maiores desvios da linha média. Neste caso, R_q segue as mesmas tendências que R_a , ou seja, aumenta com o aumento na resistência nominal dos eléctrodos.

(A)



(B)

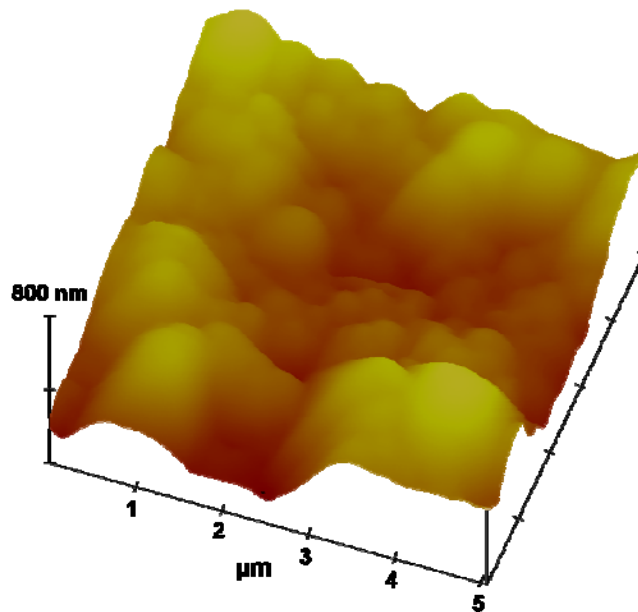


Figura 4.12 – Imagens topográficas 3D de eléctrodos de filme de carbono de resistências (A) 1,5 Ω e (B) 140 Ω .

A principal conclusão que se pode retirar através das imagens de AFM é que com a diminuição da resistência nominal do eléctrodo, a rugosidade da superfície do filme de carbono diminui aumentando também a sua uniformidade. A resistência eléctrica é inversamente proporcional à espessura do filme (assumindo resistividade constante), esperando-se deste modo que o filme de carbono inicialmente ao ser depositado na superfície do substrato cilíndrico de cerâmica seguia os seus contornos. À medida que o filme vai crescendo torna-se mais espesso, pelo que a influência do substrato é menor. Os parâmetros de rugosidade calculados a partir das imagens de AFM estão em total acordo com o parâmetro α obtidos por EIS. No caso dos eléctrodos de 1,5 Ω o valor de α das experiências de EIS é próximo de 1 e a rugosidade calculada através das imagens de AFM é mais baixa, significando uma superfície mais lisa. Os filmes de carbono mais planos ao nível da nanoescala e mais espessos estão associados às melhores características electroquímicas observadas nas secções anteriores.

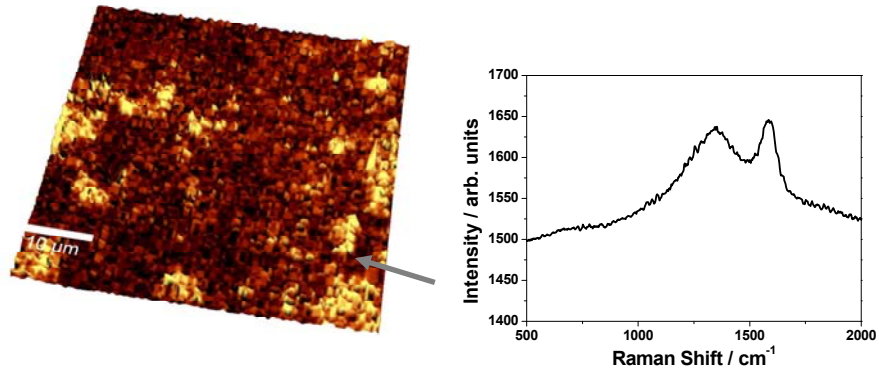
4.3.2. Microscopia de Raman confocal e difracção de raios-X

Os espectros de deslocamento e espalhamento de Raman confocal dos filmes de carbono de resistências nominais 1,5 Ω , 2 Ω e 140 Ω estão representados na Figura 4.13. Estes espectros foram obtidos nos filmes sem pré-tratamento.

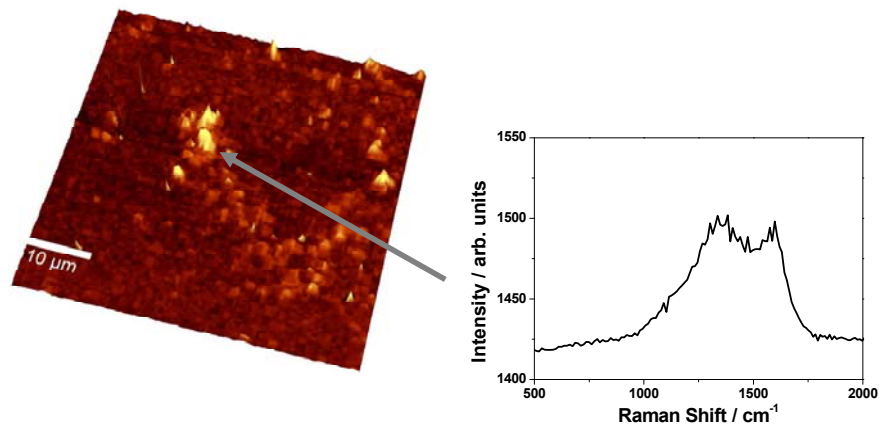
A análise dos espectros mostra a existência de duas bandas de Raman: uma banda G a $\sim 1594 \text{ cm}^{-1}$ e uma banda D a $\sim 1345 \text{ cm}^{-1}$. Estas bandas foram obtidas para todos os filmes de carbono, incluindo os de resistências de 15 Ω e 2,0 k Ω (não mostrados), e são consistentes com a estrutura gráfica destes filmes.

Os espectros de Raman de materiais de carbono são usualmente discutidos com base nas estruturas de diamante vs grafite, uma vez que os filmes de carbono são compostos ordenados por ligações de curto alcance de hibridizações sp^3 e sp^2 . As diferenças existentes entre os filmes de diamante e os filmes de carbono podem ser atribuídas à microestrutura da superfície. Os filmes de diamante são produzidos através de pirólise de misturas diluídas de um gás de um hidrocarboneto em hidrogénio utilizando-se na uma deposição de vapor químico de alta energia (por descarga de filamentos ou de microondas) o que origina uma estrutura hibridizada sp^3 . Para a produção dos filmes de

(A)



(B)



(C)

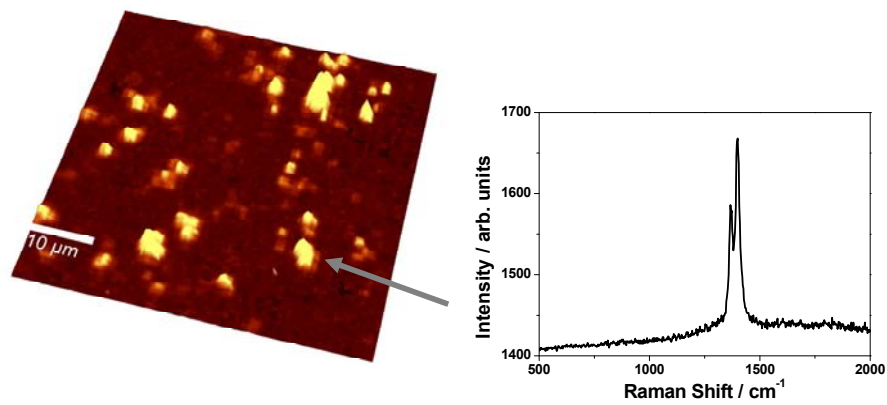


Figura 4.13 – Espectros de Raman confocal de eléctrodos de filme de carbono de resistências nominais (A) 1,5 Ω; (B) 2,0 Ω e (C) 140 Ω.

carbono utilizados neste trabalho é utilizado azoto como gás principal com aquecimento que impede a formação de radicais metil e hidrogénio atómico, conduzindo a uma microestrutura hibridizada sp^2 do tipo da grafite [296,320,321]. O diamante apresenta um único modo de Raman a 1332 cm^{-1} e uma outra linha 1575 cm^{-1} , designada por banda G, que reflecte o modo de vibração uma grafite perfeita [322-324].

A grafite multi-cristalina apresenta uma banda adicional acentuada a 1355 cm^{-1} , designada por banda D, que reflecte o grau de desordem neste tipo de estrutura [322,325]. Na grafite pirolítica altamente orientada (HOPG) a criação de desordem por activação com laser ou através de pré-tratamento electroquímico promove a nucleação e crescimento de defeitos [326-328], ou seja o aparecimento da banda D, atribuída às microcristalites de grafite na superfície terminal.

A confirmação da estrutura dos filmes de carbono foi efectuada através de difracção de raios-X, que se mostram na Figura 4.14. Os padrões de difracção de raios-X apresentam uma linha de difracção a $\sim 31,0^\circ$ para 2θ , indicando a presença de uma estrutura gráfitica nos filmes de carbono em todos os eléctrodos estudados.

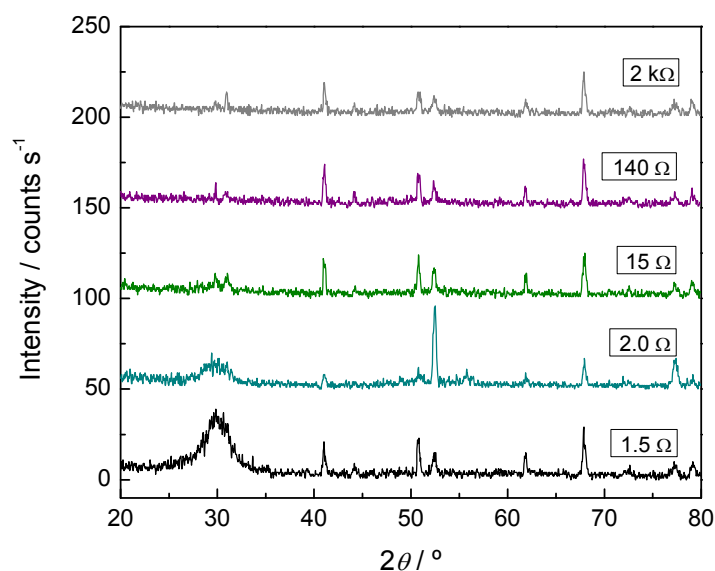


Figura 4.14 – Padrão de difracção de raios-X para os filmes de carbono de várias resistências nominais.

4.4. Conclusões

Neste capítulo caracterizaram-se eléctrodos de filme de carbono construídos a partir de resistências de filmes de carbono de resistências nominais entre 1,5 Ω e 2 k Ω com o intuito da sua aplicação em sensores e biossensores electroquímicos.

Apresentaram-se inicialmente os resultados obtidos com eléctrodos de resistência de 2 Ω em forma de disco, estudando-se a influência do pré-tratamento electroquímico em ácido perclórico 1,0 M, comparando-se os resultados obtidos com os de eléctrodos de resistência de 2 Ω de forma cilíndrica. Este estudo teve como objectivo facilitar a comparação destes eléctrodos de filme de carbono de 2 Ω , já caracterizados electroquimicamente em várias soluções de electrólito suporte e muito aplicados em sensores e biossensores electroquímicos, com eléctrodos de resistências de filme de carbono de outros valores de resistência nominal, com e sem pré-tratamento por aplicação de um potencial fixo positivo. Observou-se que a janela de potencial é influenciada pela solução de electrólito bem como pelo tipo de pré-tratamento utilizado.

As resistências de 1,5 Ω mostraram as melhores propriedades electroquímicas para o desenvolvimento de sensores com janelas potencial largas, semelhante às obtidas com as resistências de 2 Ω , e com um comportamento cinético para o sistema redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ próximo do reversível após pré-tratamento electroquímico. Embora com janelas de potencial mais largas, as resistências de 15 Ω e 140 Ω apresentaram uma cinética mais lenta para o mesmo sistema redox. As resistências de 2,0 k Ω mesmo após o pré-tratamento mostram perfis voltamétricos pouco definidos com correntes de fundo elevadas. A utilização da técnica de EIS permitiu observar as diferenças nas interfaces após o pré-tratamento dos eléctrodos de diversas resistências nominais.

A análise morfológica realizada através de AFM de contacto permitiu concluir que as melhores propriedades electroquímicas estão relacionadas com uma maior uniformidade e menor rugosidade dos filmes de carbono, observadas nos eléctrodos de menor resistência nominal.

Através da técnica de Raman confocal obtiveram-se as bandas G, a $\sim 1594 \text{ cm}^{-1}$, e D, a $\sim 1345 \text{ cm}^{-1}$, consistentes com uma estrutura grafítica dos filmes de carbono em todos eléctrodos de resistências. Esta estrutura foi comprovada através da análise de difracção de raios-X.

CAPÍTULO 5

ELÉCTRODOS DE FILME DE CARBONO MODIFICADOS COM NAFION

Neste capítulo apresenta-se a caracterização de eléctrodos de filme de carbono modificados com Nafion [7,9] tendo em vista a sua aplicação em determinação de metais pesados por voltametria de redissolução anódica. Estuda-se a influência do filme de Nafion nas características electroquímicas e morfológicas da superfície dos eléctrodos de filme de carbono. A influência do tensioactivo Triton X-100 em solução nas propriedades da região interfacial dos eléctrodos modificados é investigada através de EIS com particular ênfase para a determinação dos iões cádmio e chumbo por voltametria de redissolução anódica testando a eficiência e viabilidade destes eléctrodos nestas determinações [8,9].

5.1 Introdução

As amostras naturais são muitas vezes matrizes complexas que podem incluir quantidades significativas de matéria orgânica. A adsorção irreversível na superfície dos eléctrodos sólidos de diversos compostos activos, tais como matéria orgânica ou colóides inorgânicos naturais presentes nesses meios, origina um decréscimo ou até mesmo a supressão da resposta de ASV. A redução ou a eliminação da adsorção dessas substâncias nas superfícies dos eléctrodos é portanto de importância crucial para a análise de metais pesados por ASV em amostras ambientais, clínicas ou biológicas [102].

Os problemas de adsorção e bloqueamento dos eléctrodos podem ser minimizados modificando e/ou protegendo a superfície do eléctrodo com um filme de polímero semipermeável que permita a passagem do analito pretendido e impeça a passagem de substâncias/compostos que possam adsorver na superfície do eléctrodo ou sofrer reacções de eléctrodo.

Vários têm sido os polímeros testados para esta função [4], desde polímeros condutores, *p.e.*, [329], a membranas inertes celulósicas porosas [330]. Em análises de

ASV por BIA, a utilização de polímeros trocadores catiónicos como o Nafion [145,331], mostrou-se eficaz quando utilizadas compostos modelos de proteínas e tensoactivos.

O desenvolvimento de eléctrodos modificados com um filme fino de mercúrio protegidos com Nafion, normalmente tendo como suporte o carbono vítreo, em aplicações de electroanálise de amostras naturais permitiu não só a minimização do bloqueamento da superfície dos eléctrodos, como a possibilidade de serem realizados ensaios na presença de correntes de convecção, por exemplo, em análise por BIA [154] ou quando utilizados ultrassons [147]. Esta vantagem advém de uma superfície mais robusta do eléctrodo modificado. Outros polímeros trocadores catiónicos foram também testados e comparados com o Nafion [152,332].

Um tensoactivo modelo muito utilizado para estudo dos efeitos de adsorção na superfície dos eléctrodos é o detergente não-iónico Triton X-100. O Triton X-100 é um composto anfifílico solúvel em água, não iónico, com a parte hidrofílica constituída por uma cadeia de polioxietileno com um número médio de 10 unidades de óxido de etileno, e com a hidrofóbica formada pelo grupo p-t-octilfenil. Os átomos de oxigénio da componente hidrofílica (poliéter) tornam-na solúvel em água devido à possibilidade de formação de ligações de hidrogénio. Quimicamente, o Triton X-100 é o éter p-t-octilfenil polioxietileno, com um número médio de grupos etóxi de 9,5 [333], massa molecular de ~625, e concentração crítica micelar de 0,30 mM a 20 °C [334].

Este tensoactivo tem uma grande tendência para adsorver nas superfícies [335-339], influenciando a transferência de massa e energia ao longo da interface modificada. Em relação às determinações por ASV, a adsorção de Triton, reduz a área electroactiva do eléctrodo, podendo também originar picos mais largos bem como desvios no potencial de pico característico [110].

5.2 Modificação com Nafion

5.2.1 Caracterização morfológica e estrutural

A caracterização morfológica e estrutural de eléctrodos de resistência de filme de carbono modificados com Nafion foi efectuada através das técnicas de AFM e de Raman

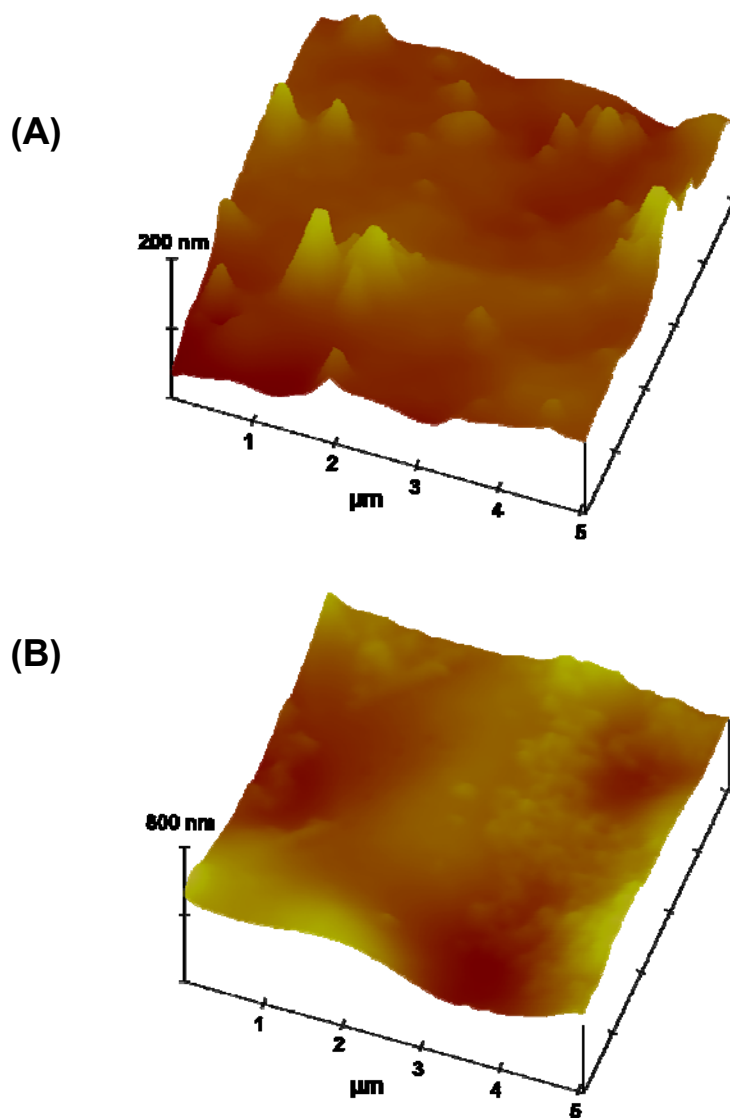


Figura 5.1 – Imagens topográficas 3D de eléctrodos de filme de carbono de resistência (A) 1,5 Ω e (B) 140 Ω modificados com Nafion.

confocal [11]. Nas Figuras 5.1 apresenta-se o perfil 3D de AFM em modo de contacto de filmes de carbono de resistência 1,5 Ω e de 140 Ω modificados com Nafion.

Comparando as imagens da Figura 5.1 com as obtidas em eléctrodos de filme de carbono sem modificação, Figura 4.12, observa-se que a nanoestrutura do filme de carbono permanece mesmo com o filme de Nafion. Analisaram-se as imagens de dimensão 25 $\mu\text{m} \times 25 \mu\text{m}$ de forma a determinar a rugosidade média, R_a , e rugosidade média quadrática, R_q , bem como o perfil de alturas. No caso das rugosidades, estes parâmetros

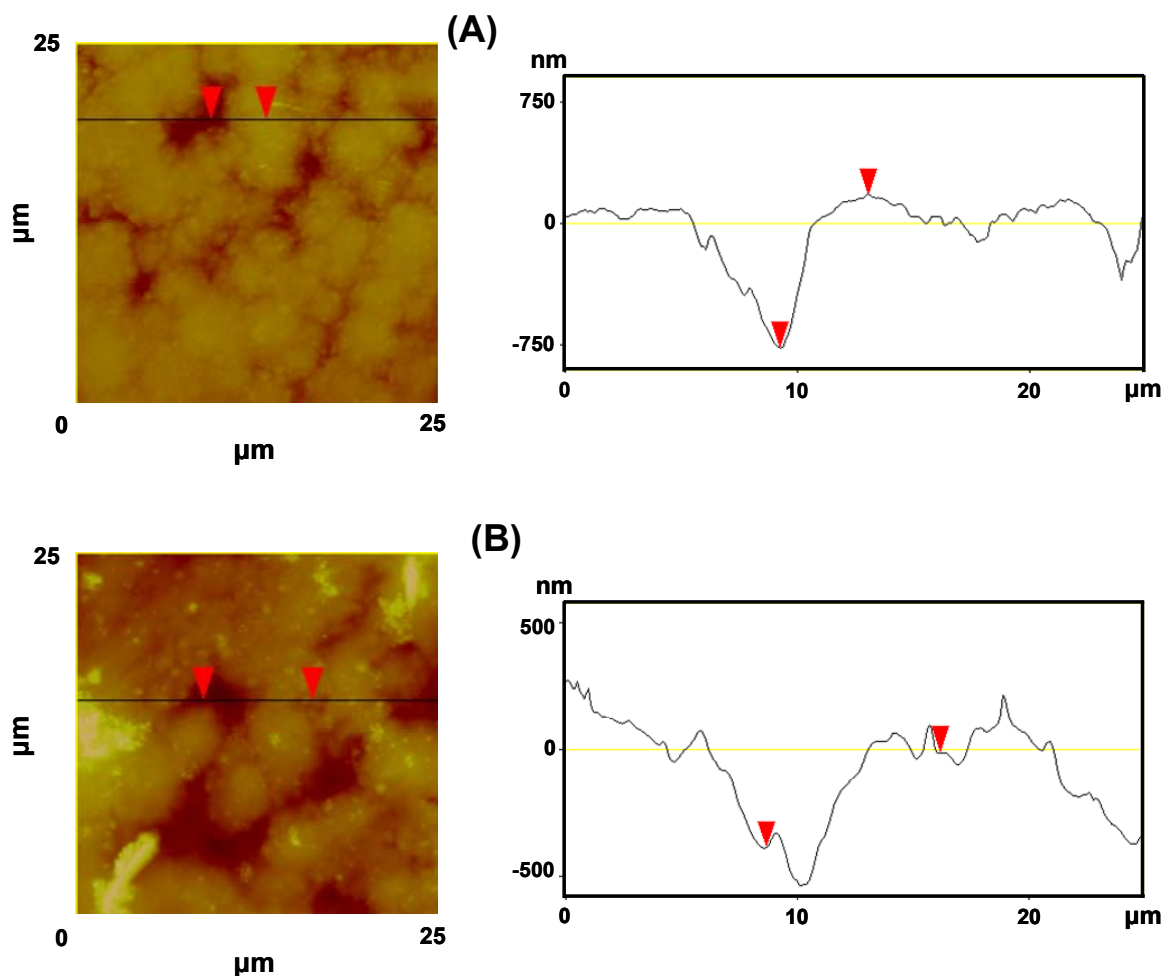


Figura 5.2 – Perfil 2D e análise de uma secção para um eléctrodo de filme de carbono de $1,5 \Omega$ (A) sem modificação e (B) modificado com Nafion.

diminuem após a modificação com Nafion para todos os eléctrodos, sendo a diferença menor para o caso da resistência de $1,5 \Omega$ onde $R_a \sim 88 \text{ nm}$ e $R_q \sim 122 \text{ nm}$ para os eléctrodos sem modificação e $R_a \sim 86 \text{ nm}$ e $R_q \sim 118 \text{ nm}$ para os eléctrodos modificados. Estas pequenas diferenças são também perceptíveis no perfil mostrado na Figura 5.2. Na Tabela 5.1 apresentam-se os valores das rugosidades determinadas para os vários eléctrodos com e sem modificação com filme de Nafion.

Os espectros de Raman confocal de eléctrodos de resistências nominais de $1,5 \Omega$ e $2,0 \Omega$ modificados com Nafion estão representados na Figura 5.3. Espectros de Raman semelhantes foram obtidos com os eléctrodos de resistências 15Ω , 140Ω e $2,0 \text{ k}\Omega$.

Tabela 5.1 – Parâmetros de rugosidade calculados através de imagens AFM de $25\ \mu\text{m} \times 25\ \mu\text{m}$

| Tipo de eléctrodo | Sem Nafion | | Com Nafion | |
|-------------------|------------|------------|------------|------------|
| | R_a / nm | R_q / nm | R_a / nm | R_q / nm |
| 1,5 Ω | 88 | 122 | 86 | 118 |
| 15 Ω | 150 | 187 | 110 | 140 |
| 140 Ω | 270 | 340 | 200 | 147 |
| 2 k Ω | 192 | 240 | 194 | 277 |

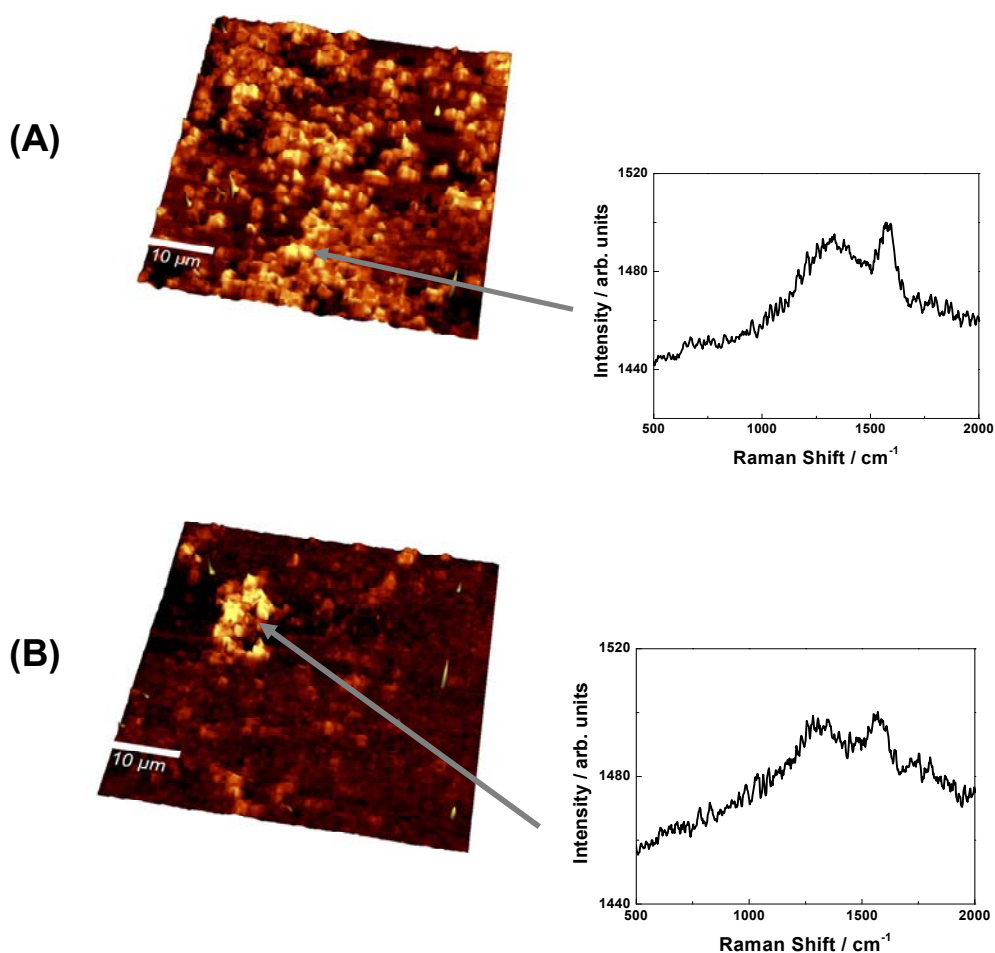


Figura 5.3 – Espectros de Raman confocal de eléctrodos de filme de carbono modificados com Nafion de resistências nominais (A) 1,5 Ω ; (B) 2,0 Ω .

A análise dos espectros mostra a existência de duas bandas de Raman, como as obtidas para o caso de eléctrodos sem modificação na Figura 4.13: a banda G a $\sim 1594\text{ cm}^{-1}$ e uma banda D a $\sim 1345\text{ cm}^{-1}$. A obtenção destas bandas nos eléctrodos modificados, mostra que o Nafion não altera o perfil espectroscópico de Raman do filme de carbono, sugerindo que não ocorre uma interacção química forte deste com o filme de carbono.

5.2.2 Caracterização electroquímica

Embora as resistências de $1,5\ \Omega$, $15\ \Omega$ e de $140\ \Omega$ tenham apresentado após pré-tratamento electroquímico um largo intervalo de potencial com baixas correntes residuais em solução tampão acetato e PBS, a aplicação destas em sensores electroquímicos de metais pesados revelou-se sem sucesso. Foram testados vários parâmetros experimentais, como tempo e potencial de deposição, não se conseguindo obter qualquer resposta. Desta forma, o estudo e caracterização electroquímica de eléctrodos modificados para sensores electroquímicos apenas foi levado a cabo em eléctrodos de filme de carbono de $2\ \Omega$, que por simplificação se designam doravante apenas por eléctrodos de filme de carbono (CFE), já anteriormente utilizados em sensores e biossensores electroquímicos.

5.2.2.1 Janela de potencial

A janela de potencial dos eléctrodos de filme de carbono com e sem a modificação com um filme fino de Nafion ($\sim 1\ \mu\text{m}$) foi determinada em solução tampão acetato [7]. Atendendo a que a janela de potencial foi melhorada com o pré-tratamento em ácido perclórico optou-se por efectuar sempre este procedimento antes de modificar os eléctrodos com Nafion (veja-se o Capítulo 4, Secção 4.2.2.1).

Como pode ser observado nos voltamogramas da Figura 5.4, a modificação dos eléctrodos com Nafion não promove alterações ao intervalo útil de potencial dos eléctrodos pré-tratados, sendo por isso possível utilizar a modificação com Nafion no mesmo intervalo de potencial que os eléctrodos não modificados.

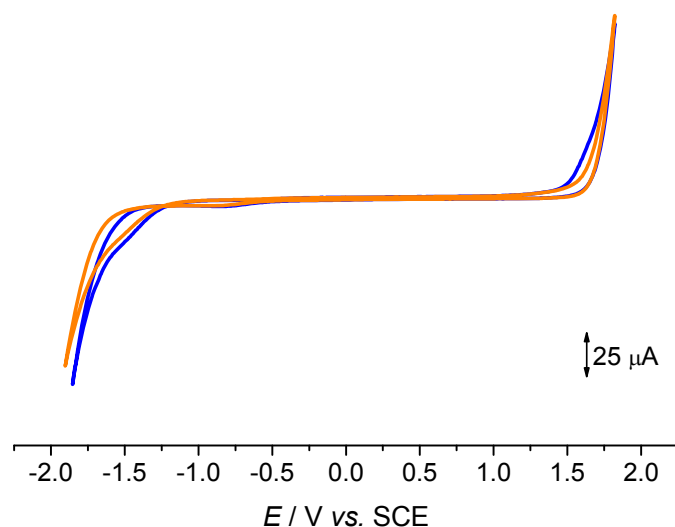


Figura 5.4 – Voltamogramas cíclicos em tampão acetato 0,1 M pH 4,4 obtidos com eléctrodos de disco filme de carbono, área 0,02 cm², (—) com pré-tratamento e (—) modificados com Nafion

5.2.2.2 Espectroscopia de impedância electroquímica

A técnica de espectroscopia de impedância electroquímica foi utilizada para investigar a influência do filme de Nafion e da presença dos iões metálicos em solução nas características interfaciais dos eléctrodos de filme de carbono.

Na presença de oxigénio dissolvido

Os espectros de impedância de eléctrodos não modificados com pré-tratamento electroquímico e modificados com Nafion foram registados para potenciais no intervalo de -1,5 a + 1,5 V vs. SCE. Este intervalo foi escolhido de forma a cobrir toda a janela de potencial útil, entre os limites onde ocorre evolução de hidrogénio e de oxigénio (Figura 5.4). Os espectros obtidos em solução tampão acetato 0,1 M pH 4,4 encontram-se na Figura 5.5.

De uma maneira geral observa-se que a forma dos espectros não é alterada pela presença do filme de Nafion. Uma excepção a este comportamento ocorre para o potencial de -1,0 V. Nos eléctrodos modificados, a forma do espectro a este potencial evidencia a

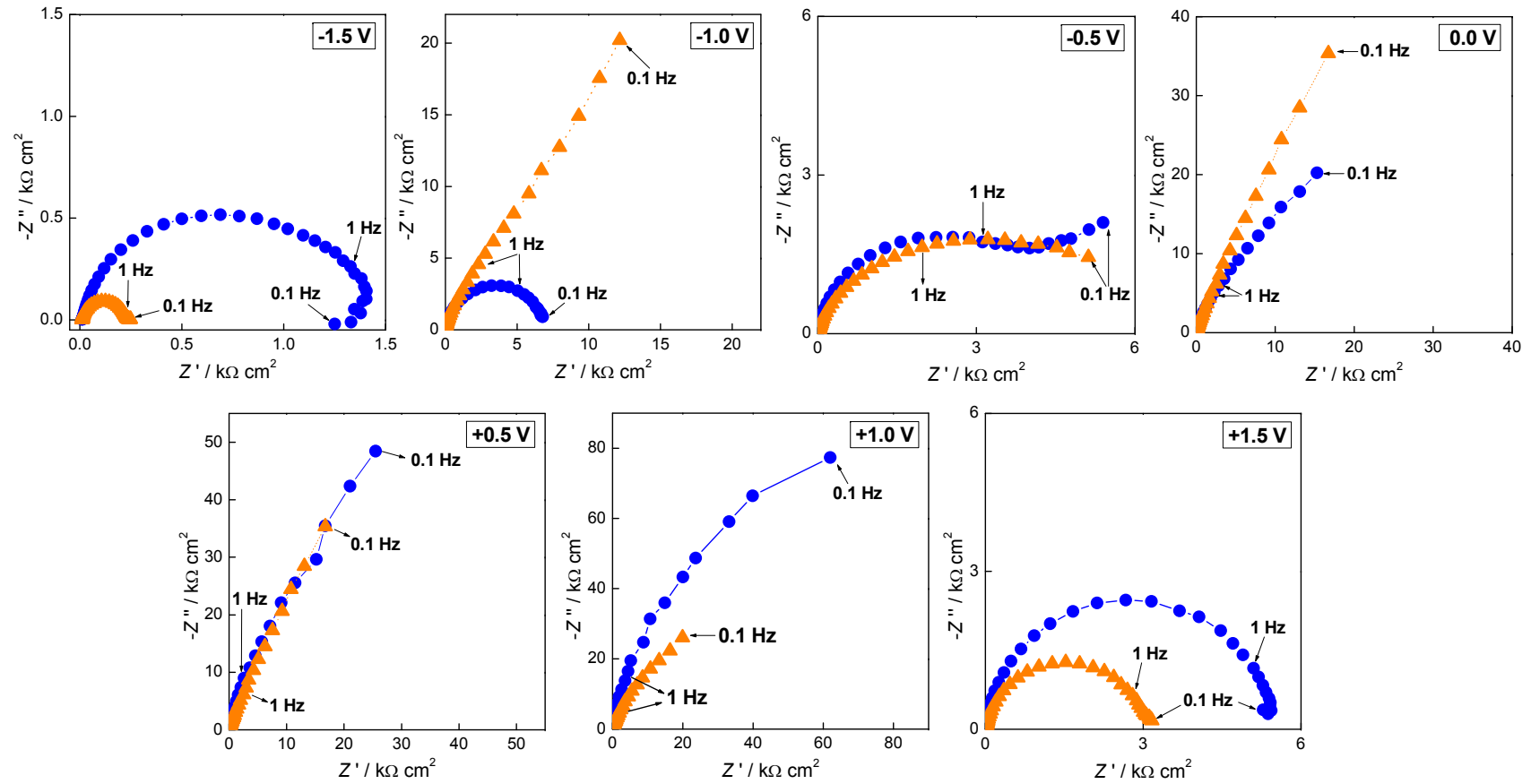


Figura 5.5 – Espectros de impedância no plano complexo obtidos com eléctrodos de filme de carbono (●) após pré-tratamento electroquímico e (▲) modificados com Nafion em solução tampão ácido acético/acetato de sódio 0,1 M pH 4,4.

separação de carga na interface Nafion/filme de carbono. Para além disso, já ocorria uma alteração dos espectros em eléctrodos com e sem pré-tratamento, sendo atribuída à maior facilidade de redução dos óxidos da superfície em eléctrodos pré-tratados. A potenciais positivos a magnitude de impedância obtida é mais baixa com os eléctrodos modificados, verificando-se uma situação oposta para potenciais negativos. A evolução de hidrogénio e/ou oxigénio é observada para os potenciais de -1,5 V e +1,5 V, de acordo com o semi-círculo obtido nos espectros.

Os espectros da Figura 5.5 foram modelados através do circuito eléctrico equivalente (Figura 5.6) constituído por uma resistência R_{Ω} , que representa a resistência da célula electroquímica, ligada em série a conjunto em paralelo de um elemento de fase constante e uma resistência R_1 . A resistência R_1 representa a resistência à transferência de carga, e o CPE está relacionado com condensador não-ideal com uma capacitância C_1 e um expoente de ângulo de fase α_1 .

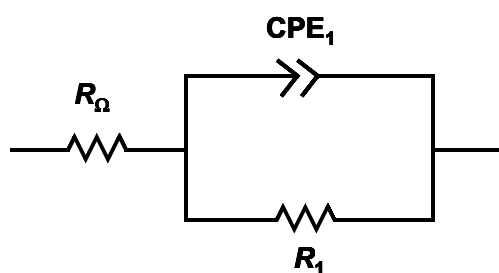


Figura 5.6 – Circuito eléctrico equivalente utilizado para a modelação dos espectros de impedância electroquímica obtidos com os eléctrodos de filme de carbono de 2 Ω .

Este circuito é o mesmo que o utilizado na modelação dos espectros obtidos com os eléctrodos de filme de carbono com e sem pré-tratamento [7,307]. Da mesma forma que anteriormente, os espectros da Figura 5.5 foram ajustados para frequências superiores a 1 Hz, uma vez para frequências inferiores a forma dos espectros depende do potencial aplicado e do tipo de eléctrodo utilizado, o que dificultada a comparação entre eléctrodos modificados e não modificados. Na Tabela 5.2 encontram-se os parâmetros obtidos da modelação dos espectros. Os erros máximos nos ajustes de cada parâmetro da Tabela 5.2

Tabela 5.2 – Dados obtidos do ajuste dos espectros de impedância dos eléctrodos de filme de carbono de 2 Ω com pré-tratamento (PT) e modificados com Nafion.

| Tipo de eléctrodo | E / V vs. SCE | R_1 / $k\Omega\text{ cm}^2$ | C_1 / $\mu\text{F cm}^{-2}\text{ s}^{\alpha-1}$ | α |
|-------------------|--------------------|----------------------------------|--|----------|
| Com PT | -1,5 | 4,0 | 11,2 | 0,94 |
| | -1,0 | 6,5 | 13,4 | 0,94 |
| | -0,5 | 3,8 | 18,1 | 0,92 |
| | 0,0 | 20,4 | 31,0 | 0,88 |
| | +0,5 | 123 | 16,3 | 0,93 |
| | +1,0 | 126 | 10,4 | 0,92 |
| | +1,5 | 5,6 | 7,01 | 0,95 |
| + Nafion | -1,5 | 0,2 | 27,9 | 0,87 |
| | -1,0 | 8,9 | 35,9 | 0,85 |
| | -0,5 | 3,8 | 46,4 | 0,84 |
| | 0,0 | 9,7 | 58,4 | 0,83 |
| | 0,5 | 28,4 | 38,0 | 0,85 |
| | 1,0 | 29,3 | 29,5 | 0,86 |
| | 1,5 | 2,7 | 15,2 | 0,90 |

foram de 5% para R_1 , 3% para C_1 e inferiores a 0,5% para α . Por uma questão de comparação, voltam a apresentar-se os valores obtidos com os eléctrodos de filme de carbono com pré-tratamento.

A modificação com Nafion produz um aumento na resistência da célula R_Ω em cerca de $1\text{ }\Omega\text{ cm}^2$ sendo de $10,5 \pm 0,4\text{ }\Omega\text{ cm}^2$ ($N = 27$), em comparação com o valor de $9,3 \pm 0,3\text{ }\Omega\text{ cm}^2$ ($N = 18$) obtido para os eléctrodos com pré-tratamento.

Devido ao carácter trocador catiónico do Nafion, a capacitância C_1 aumenta significativamente em comparação com os eléctrodos sem Nafion, observando-se ainda um aumento da rugosidade da superfície do eléctrodo, de acordo com a diminuição do valor de α . A potenciais negativos a resistência à transferência de carga aumenta devido a limitações à transferência electrónica impostas pelo próprio polímero. Este comportamento já tinha sido observado em eléctrodos de carbono vítreo modificado com Nafion [317].

No entanto, a potenciais positivos, R_1 diminuí em relação aos eléctrodos não-modificados, ou seja, a transferência electrónica é mais facilitada.

Observou-se, ainda, que nos eléctrodos modificados com Nafion, a linha de base de corrente era mais estável com o tempo, mesmo após os ensaios de EIS a $-1,5$ V e $+1,5$ V. Por outro lado, os eléctrodos não modificados necessitavam de ser condicionados por varrimento de potencial entre $-1,5$ V e $+1,5$ V vs. SCE de modo a que a corrente de fundo diminuísse e estabilizasse.

Na ausência de oxigénio dissolvido

Na Figura 5.6 mostram-se os espectros de EIS obtidos com os eléctrodos de filme de carbono modificados com Nafion na presença e na ausência de oxigénio para os potenciais onde o oxigénio pode ser reduzido. Na Tabela 5.3 estão sumariados os valores dos parâmetros obtidos através da modelação ao circuito equivalente da Figura 4.4.

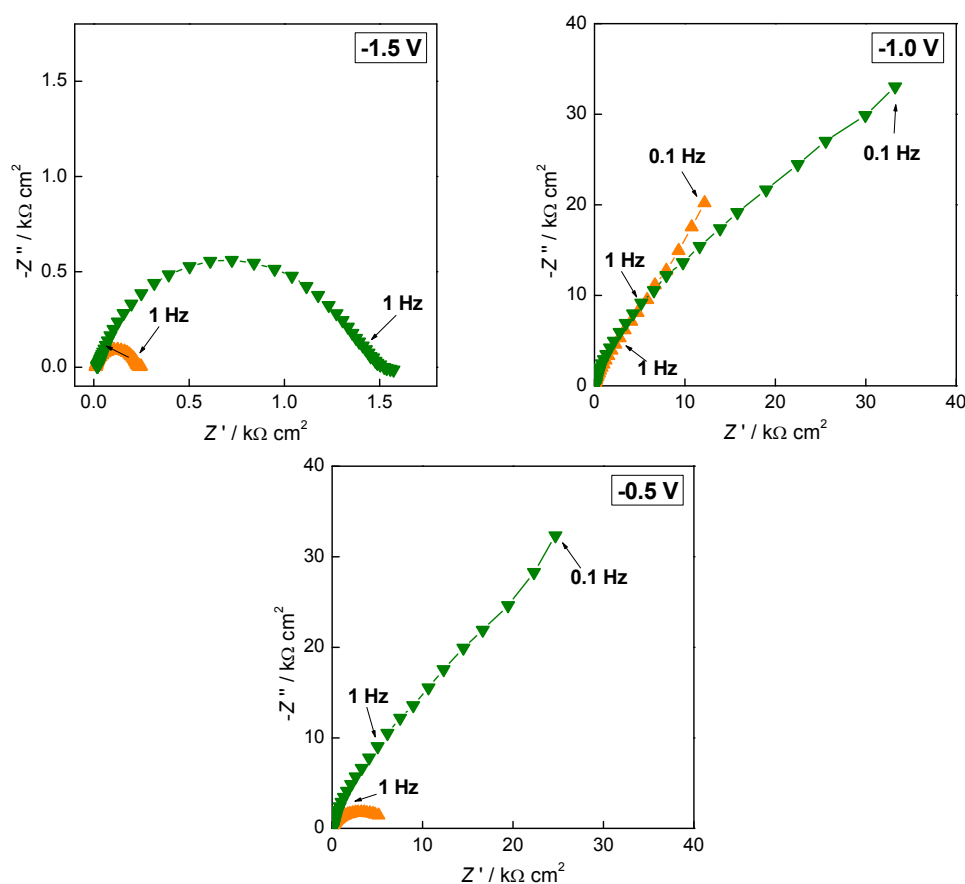


Figura 5.6 – Espectros de impedância no plano complexo obtidos com eléctrodos de filme de carbono modificados com Nafion (\blacktriangle) na presença e (\blacktriangledown) na ausência de oxigénio dissolvido em solução tampão ácido acético/acetato de sódio 0,1 M pH 4,4.

Tabela 5.3 – Dados obtidos do ajuste dos espectros de EIS da Figura 5.6.

| Tipo de eléctrodo | E / V vs. SCE | $R_1 / k\Omega \text{ cm}^2$ | $C_1 / \mu\text{F cm}^{-2} \text{ s}^{\alpha-1}$ | α_1 |
|-------------------|-----------------|------------------------------|--|------------|
| Com PT | -1,5 | 0,4 | 7,2 | 0,97 |
| | -1,0 | 137 | 10,1 | 0,95 |
| | -0,5 | 159 | 16,5 | 0,93 |
| + Nafion | -1,5 | 3,4 | 11,9 | 0,82 |
| | -1,0 | 54,1 | 16,3 | 0,82 |
| | -0,5 | 57,4 | 20,3 | 0,80 |

Os erros associados a cada parâmetro da Tabela 5.3 são da mesma ordem de grandeza que os observados anteriormente para os espectros na presença de oxigénio dissolvido, *i.e.*, 5% para R_1 , 3% para C_1 e inferiores a 0,5% para α .

Analisando os espectros obtidos a $-0,5 \text{ V}$ e $-1,5 \text{ V}$ observa-se um grande aumento da magnitude de impedância nas soluções após remoção do oxigénio da solução, comportamento já observado anteriormente para eléctrodos de carbono vítreo modificados com Nafion [317]. O grande aumento a $-0,5 \text{ V}$, pode ser atribuído à dificuldade do processo de transferência de carga, redução de oxigénio, proveniente sobretudo da redução dos óxidos da superfície dos eléctrodos.

Comparando os resultados obtidos a potenciais negativos da Tabela 5.2 com os da Tabela 5.3, observa-se que a $-1,0 \text{ V}$ e $-0,5 \text{ V vs. SCE}$ ocorre um grande aumento de R_1 com uma diminuição da capacitância da interface dos eléctrodos modificados após a remoção de oxigénio. A superfície dos eléctrodos modificados torna-se mais rugosa na ausência de oxigénio dissolvido na solução.

Na presença de iões metálicos

A presença de iões metálicos em concentração semelhante à utilizada em voltametria de redissolução anódica foi também testada nos eléctrodos modificados com Nafion, de forma a investigar o comportamento destes eléctrodos nestas determinações analíticas.

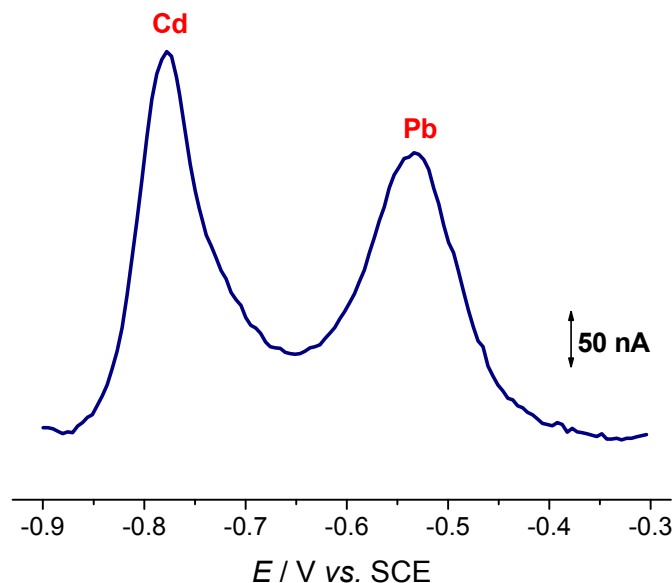


Figura 5.7 – Voltamograma redissolução de anódica de onda quadrada iões Cd(II) e Pb(II) em tampão acetato 0,1 M pH 4,4. $[Cd^{2+}] = [Pb^{2+}] = 10^{-7}$ M, $E_{dep} = -1,0$ V (vs. SCE); t_{dep} 120 s. Condições da onda quadrada: amplitude 20 mV; frequência 20 Hz; incremento de potencial 1 mV.

O voltamograma ASV obtido com os eléctrodos de disco de filme de carbono modificados com Nafion na presença de 10^{-7} M de iões cádmio e chumbo em solução tampão acetato 0,1 M pH 4,4, Figura 5.7, prova que é possível determinar estes dois iões simultaneamente com boa separação dos picos característicos. Os potenciais de pico foram de $-0,78$ V e $-0,55$ V (vs SCE) para o Cd(II) e para o Pb(II), respectivamente.

Os ensaios de EIS foram realizados na presença de 10^{-7} M de Cd(II) e Pb(II) em tampão acetato. A deposição dos iões no eléctrodo foi efectuada aplicando um potencial de $-1,0$ V vs. SCE com agitação da solução, registando-se em seguida o espectro a esse potencial. Após este passo, o eléctrodo foi deixado em potencial de circuito aberto durante 10 minutos para que ocorresse a reoxidação dos metais. Decorrido este período de tempo registou-se um outro espectro a $-0,5$ V. Os espectros obtidos são mostrados na Figura 5.8 e os resultados dos ajustes ao circuito da Figura 5.6 encontram-se na Tabela 5.4.

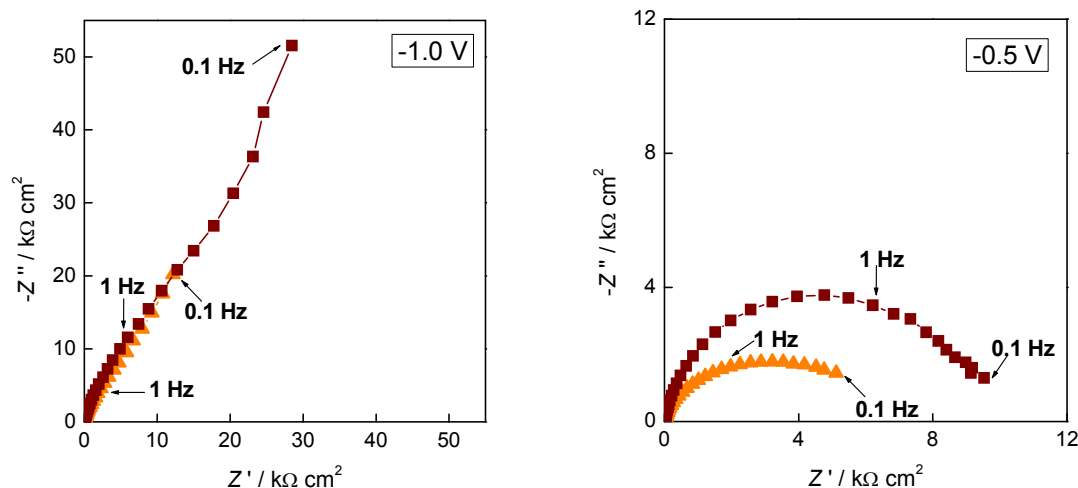


Figura 5.8 – Espectros de impedância no plano complexo obtidos com eléctrodos de filme de carbono modificados com Nafion (▲) em solução tampão ácido acético/acetato de sódio 0,1 M pH 4,4 (■) na mesma solução com 10^{-7} M de Cd(II) e Pb(II).

Tabela 5.4 – Dados obtidos através do ajuste ao circuito equivalente dos espectros da Figura 5.8.

| E / V vs. SCE | $R_1 / k\Omega cm^2$ | $C_1 / \mu F cm^{-2} s^{a-1}$ | α_1 |
|-----------------|----------------------|-------------------------------|------------|
| -1,0 | 38,1 | 11,6 | 0,88 |
| -0,5 | 9,0 | 12,4 | 0,90 |

A magnitude de impedância é superior após a deposição dos iões, apesar da forma dos espectros não ser alterada. Ao potencial de $-1,0$ V, as componentes da impedância (real e imaginária) são superiores após a deposição, reflectindo uma maior resistência à transferência de carga e uma capacitância mais baixa, comparando as Tabelas 5.2 e 5.4. O aumento da resistência R_1 pode ser devido ao bloqueamento parcial do filme de polímero próximo da superfície do eléctrodo pelos metais depositados. A $-0,5$ V, potencial a que os metais já foram removidos da superfície, observa-se que a resistência R_1 permanece mais alta do que o valor inicial sem a deposição dos metais e a capacitância decresce irreversivelmente.

Estas observações estão de acordo com a distorção física do filme de Nafion, causada pela formação de pequenos depósitos de metal entre os poros de Nafion e a

superfície do eléctrodo. A repetição do processo de re-deposição e de re-oxidação dos iões metálicos com o mesmo eléctrodo de filme de carbono modificado com Nafion, não promoveu qualquer alteração ao comportamento observado anteriormente. Concluí-se assim, que ocorreu uma alteração irreversível na estrutura do filme de Nafion, sugerindo que a deposição excessiva de metais pode reduzir a capacidade de serem obtidos resultados precisos e reprodutíveis.

5.3 Influência de tensoactivos

Nesta secção examina-se a influência do tensoactivo Triton X-100 na propriedades da região interfacial eléctrodo de filme de carbono/Nafion, através de EIS com particular realce na determinação dos iões cádmio e chumbo por voltametria de onda quadrada de ASV, testando a eficiência e viabilidade destes eléctrodos nestas determinações [8]. Os resultados obtidos permitem um melhor entendimento da técnica de SWASV na determinação de outros iões metálicos em meio natural.

5.3.1 Espectroscopia de impedância electroquímica

Os ensaios de EIS foram sequenciais e sistemáticos, pelo que se torna necessário descrever nesta parte do trabalho o procedimento experimental levado a cabo para a obtenção dos espectros de impedância. Os eléctrodos de disco de filme de carbono modificados com Nafion foram preparados segundo o procedimento descrito no Capítulo 3. A sequência de registo dos espectros de EIS foi a seguinte para o estudo da influencia de Triton X-100 nas propriedades interfaciais dos eléctrodos foi a seguinte:

- 1) Registo de EIS dos eléctrodos modificados em solução tampão acetato 0,1 M pH 4,3 aos potenciais aplicados de $-1,0$ V e $-0,5$ V vs. SCE, verificando-se a eficiência do filme de polímero;
- 2) Foram adicionados à solução de electrólito 10^{-7} M de iões Cd(II) e Pb(II), e aplicado o potencial de $-1,0$ V vs. SCE ao eléctrodo modificado durante 2 minutos com agitação da solução. Este passo levou à deposição dos iões metálicos na superfície do eléctrodo;

- 3) Registo do espectro a $-1,0$ V;
- 4) Passados 2 minutos, por forma ocorrer a reoxidação dos metais no eléctrodo, findo os quais se registou um espectro a $-0,5$ V.
- 5) O eléctrodo foi colocado numa nova solução de electrólito, executando-se um ensaio de SWASV por forma a ser verificada a ausência de metais depositados. Registaram-se os espectros a $-1,0$ V e $-0,5$ V noutra solução de electrólito. Estes espectros permitem observar se ocorreram alterações permanentes no filme polimérico devido à deposição dos metais;
- 6) Adicionou-se Triton à solução de electrólito contendo 10^{-7} M de Cd(II) e Pb(II), seguindo-se o registo de espectros na mesma sequência iniciada no passo 2. Foram estudadas várias concentrações de Triton, no intervalo de $1 - 500$ mg L⁻¹, sendo utilizando um novo eléctrodo para cada ensaio.

Os espectros de impedância obtidos a $-1,0$ V e $-0,5$ V vs. SCE pelo procedimento descrito com as concentrações de 2, 50 e 500 mg L⁻¹ de Triton estão representados nas Figuras 5.9 e 5.10, respectivamente.

Na Subsecção 5.2.2.2, demonstrou-se que na presença de iões Cd(II) e Pb(II) em solução não altera a forma dos espectros de EIS no plano complexo obtidos com os eléctrodos de filme de carbono modificados com Nafion (CFE/Nafion). No entanto, a magnitude de impedância é superior após a deposição destes iões no eléctrodo [7]. Observaram-se alterações irreversíveis no filme polimérico, atribuídas à formação de depósitos de metais entre os poros de Nafion e a superfície do eléctrodo. O mesmo comportamento foi observado nos espectros das Figuras 5.9 e 5.10.

Os espectros foram modelados através do mesmo circuito da Figura 5.6. Da mesma forma que em [7] este circuito foi utilizado apenas para modelação dos espectros para frequências acima de 1 Hz. Os valores obtidos para os parâmetros nas várias situações experimentais estudadas variam entre $15 - 25$ Ω cm² para a resistência da célula, $8 - 17$ k Ω cm² para R_1 , $15 - 30$ μ F cm⁻² para C_1 e $0,82 - 0,94$ para o factor α_1 . Os erros nos ajustes são da ordem de 3 e 8% para R_1 , 0,8% e 3% para C_1 e inferiores a 1% para α_1 .

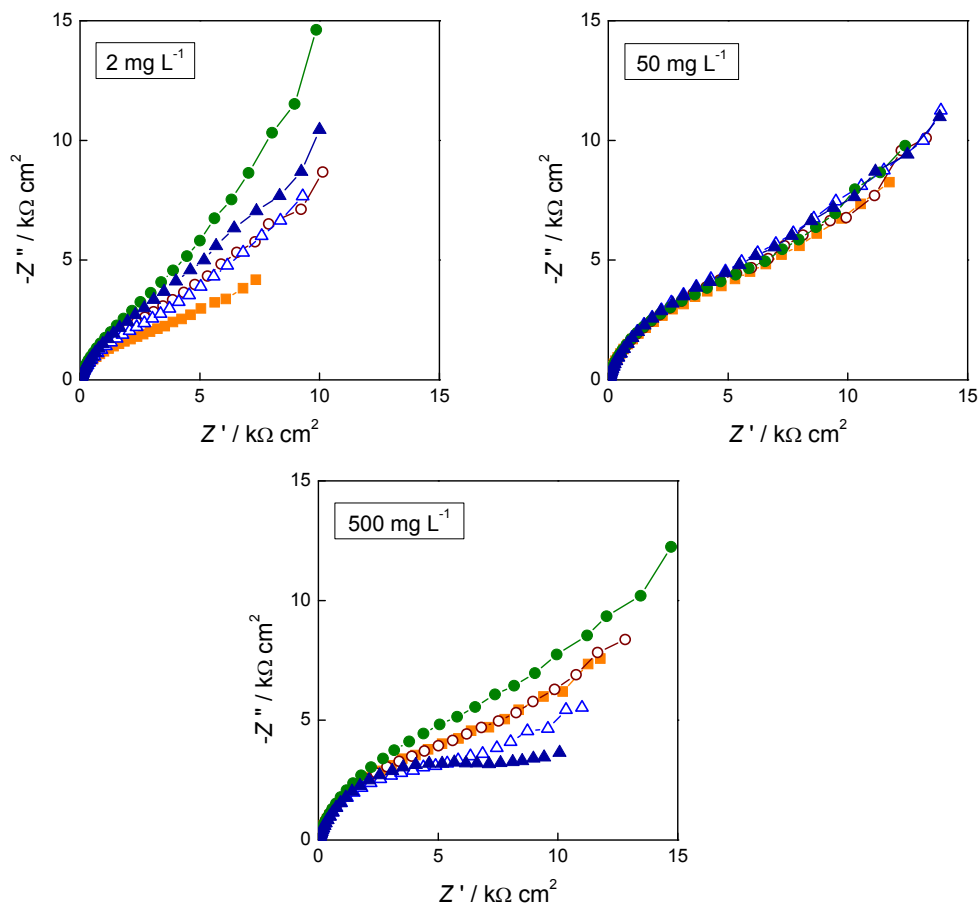


Figura 5.9 – Espectros de impedância no plano complexo obtidos a $-1,0$ V (vs. SCE) com eléctrodos C Filme/Nafion em tampão acetato $0,1$ M pH $4,3$ com várias concentrações de Triton. Sequência de espectros: (■) solução de electrólito; (●) após deposição de Pb(II) e Cd(II); (○) após SWASV; (▲) com Triton; e, (△) após limpeza electroquímica.

Uma análise mais detalhada pode ser obtida através dos gráficos da componente imaginária da impedância em função do $\lg f$ das Figuras 5.11 e 5.12. Estes gráficos permitem observar as diferenças na adsorção e separação de cargas na região interfacial. Os semi-círculos dos gráficos de impedância em plano complexo originam picos em Z'' vs. $\lg f$, sendo que o valor máximo do pico corresponde à constante de tempo RC . A $-0,5$ V, observam-se algumas diferenças na constante de tempo, em particular quando a concentração de Triton utilizada é mais baixa do que a concentração micelar crítica (cmc). Quando as concentrações de Triton são superiores à cmc, as alterações são menos significativas. Este comportamento evidencia que a adsorção de Triton na superfície do eléctrodo modificado é muito superior para concentrações inferiores à cmc, o que bloqueia

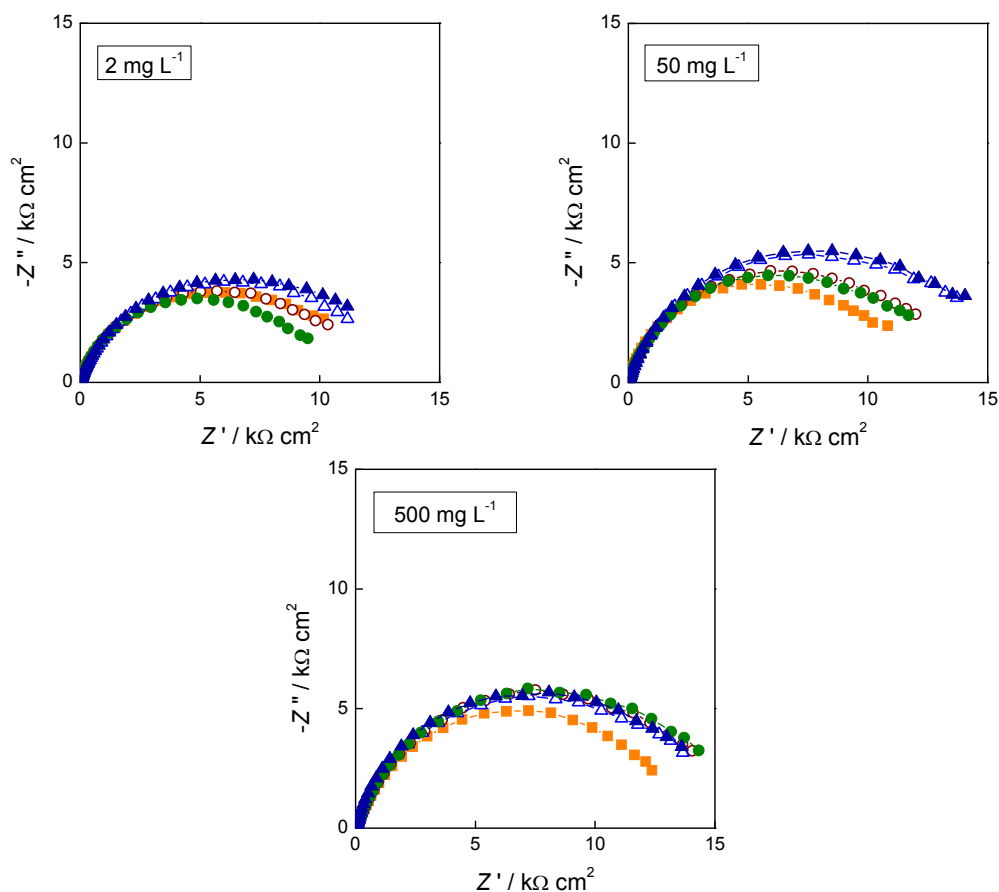


Figura 5.10 – Espectros de impedância no plano complexo obtidos a $-0,5$ V (vs. SCE) com eléctrodos de C Filme/Nafion em tampão acetato $0,1$ M pH $4,3$ com várias concentrações de Triton. (Significado dos símbolos na Figura 5.9).

a superfície do polímero Considerando que para concentrações superiores à cmc são formadas, preferencialmente, micelas, a área superficial do eléctrodo afectada pela adsorção é menor, este processo parece ser reversível (veja-se, por exemplo, a Figura 5.12 para 100 mg L⁻¹ de Triton).

Um estudo recente [339] utilizando superfícies recobertas com celulose expostas a Triton mostra uma curva de adsorção isotérmica muito complexa com quatro regiões de adsorção, formação de micelas e um decréscimo na adsorção para concentrações superiores à cmc. Os resultados obtidos com os eléctrodos de filme de carbono e Nafion apresentam um comportamento semelhante. Em qualquer das situações, este resultado deve ser entendido como uma excepção à regra geral que indica que na presença de superfícies

hidrofóbicas a saturação de adsorção é atingida abaixo da cmc e não decresce por aumento da concentração do tensioactivo [340].

Os gráficos de impedância em plano complexo e da parte imaginária das Figuras 5.11 a 5.12 mostram as seguintes tendências:

- A adição de Triton à solução em concentração inferior à concentração crítica micelar (cmc $\sim 200 \text{ mg L}^{-1}$ em H_2O), não promove a alteração da forma dos espectros nos dois potenciais aplicados, $-1,0 \text{ V}$ e $-0,5 \text{ V vs. SCE}$.

- Considerando o potencial $-1,0 \text{ V vs. SCE}$, a adição do tensioactivo leva a um aumento da resistência da célula, que pode ser explicado pela adsorção de Triton na superfície recoberta com Nafion. Nesta situação ocorre também um aumento da capacitância e, uma vez que o processo de transferência de carga é dificultado pela camada adsorvida, ocorre também um aumento da resistência à transferência de carga.

- A limpeza electroquímica dos eléctrodos não conduz a mais modificações nos espectros obtidos em tampão acetato, reflectindo alterações permanentes no filme de Nafion. A resistência à transferência de carga é maior a $-1,0 \text{ V}$ após este passo de limpeza, enquanto que a $-0,5 \text{ V}$ é menor.

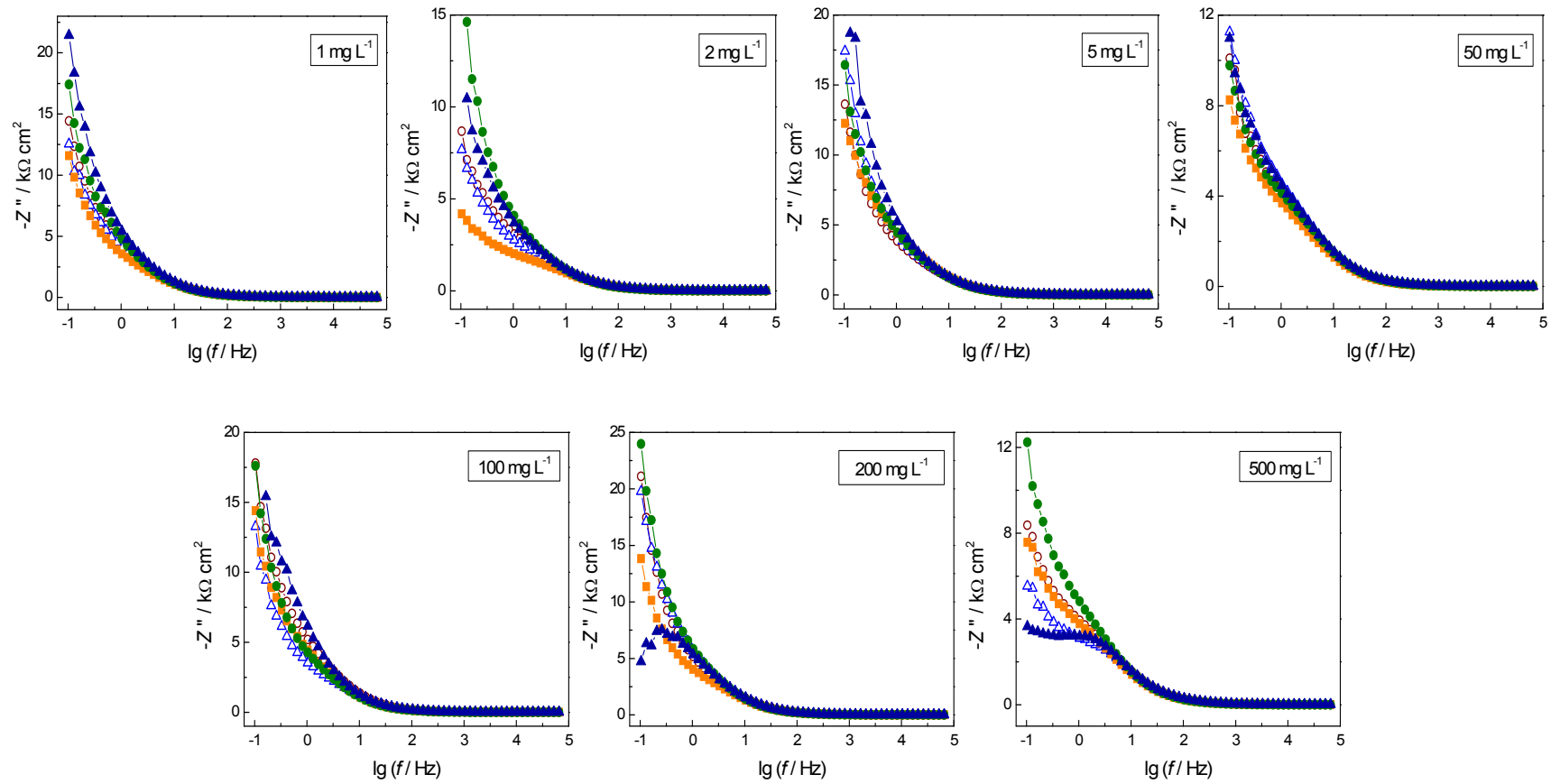


Figura 5.11 – Representação de $-Z''$ vs $\lg f$ para $-1,0$ V (vs. SCE) com eléctrodos de filme de carbono modificados com Nafion em tampão acetato $0,1$ M pH $4,3$ com diferentes concentrações de Triton X-100. (Significado dos símbolos na Figura 5.9).

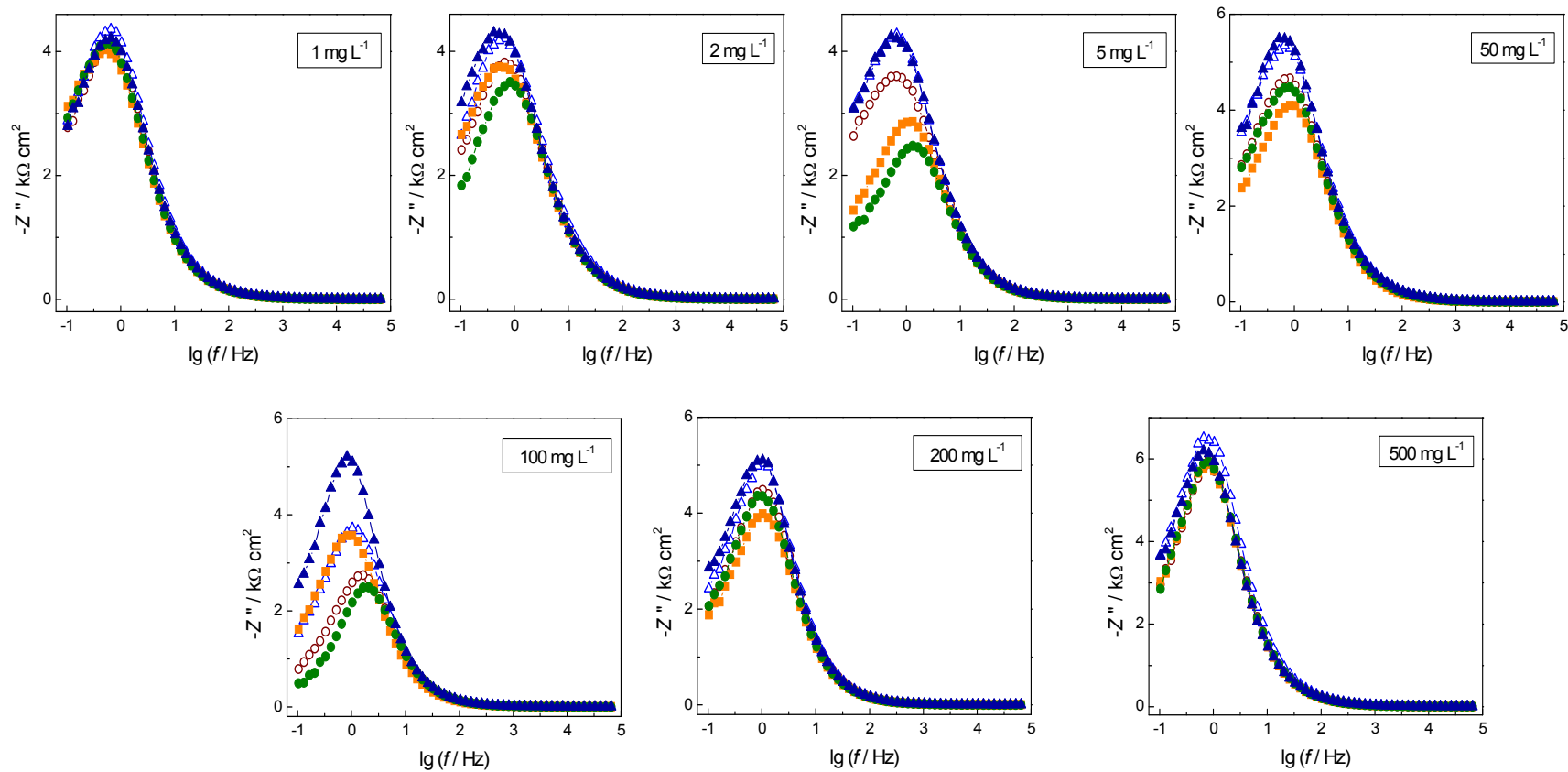


Figura 5.12 – Representação de $-Z''$ vs $\lg f$ para $-0,5$ V (vs. SCE) com eléctrodos de filme de carbono modificados com Nafion em tampão acetato $0,1$ M pH $4,3$ com diferentes concentrações de Triton X-100. (Significado dos símbolos na Figura 5.9).

5.3.2 Voltametria de redissolução anódica

A determinação dos iões cádmio e chumbo na presença de Triton foi realizada através de voltametria de redissolução anódica de onda quadrada com eléctrodos de filme de carbono modificados com Nafion. A Figura 5.13 mostra os voltamogramas obtidos para igual concentração dos dois iões, com adições sucessivas de Triton.

Na ausência do tensioactivo, o voltamograma apresenta dois picos bem definidos, com o potencial de pico a $-0,75$ V para o cádmio e a $-0,55$ V para o chumbo, com maior intensidade de corrente de pico para o Pb(II). Tendo em conta que as concentrações dos dois iões em solução são iguais, esta intensidade de pico maior sugere uma maior tendência de incorporação com e/ou transporte através do filme de Nafion.

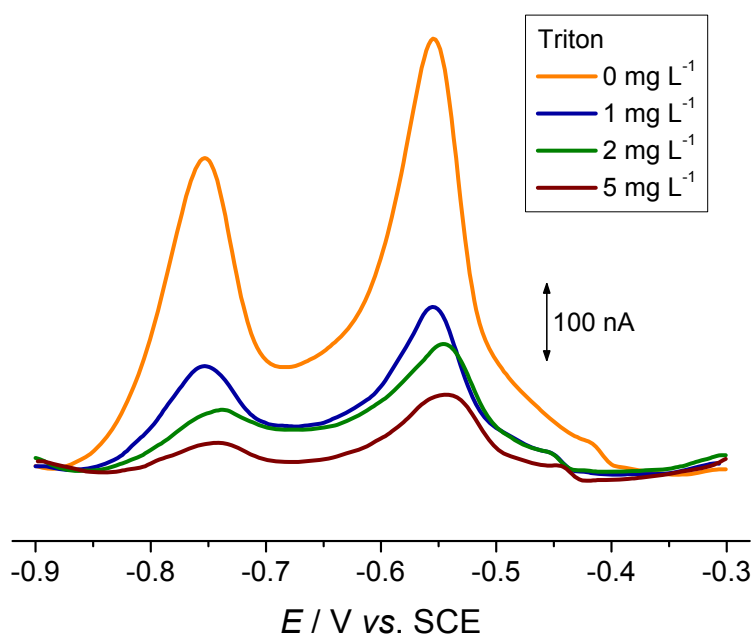


Figura 5.13 –SWASV de 10^{-1} M de Cd(II) e Pb(II) em tampão acetato 0,1 M pH 4.3 em eléctrodo de filme de carbono modificado com Nafion na presença de adições sucessivas de Triton. Condições experimentais: $t_{\text{dep}}=120$ s a $-1,0$ V (vs. SCE) e 25 mV de amplitude de onda quadrada a uma frequência de 100 Hz e incremento de potencial de 2 mV.

Esta situação também já tinha sido detectada em análises de ASV por BIA quando utilizados polímeros trocadores catiónicos [145,331]. Nestes estudos observou-se um aumento do sinal de corrente de re-oxidação de iões chumbo quando utilizados eléctrodos modificados com Nafion, em particular quando utilizada solução tampão acetato. Nesta solução, os iões Pb(II) estão presentes na forma de complexo, enquanto que o cádmio permanece como Cd^{2+} (aq.). Desta forma, seria de esperar que, com a utilização de uma barreira polimérica trocadora de catiões, os iões cádmio dessem origem a uma maior resposta que os iões complexos chumbo-acetato, cuja difusão para o eléctrodo seria dificultada pela presença da membrana de Nafion. No entanto, esta situação não foi observada, pelo que a corrente de pico destes iões poderá ser influenciada por outro factor dominante.

Dam *et al.* [145] demonstraram que os iões chumbo estão envolvidos numa reacção de troca de ligando na interface polímero-solução, formando deste modo ligações com o polímero. Devido à baixa afinidade com ligandos de oxigénio, os iões cádmio não são tão extensamente incorporados no polímero como o chumbo. Este efeito de pré-concentração é manifestado na maior intensidade do pico de ASV para o chumbo, mesmo em presença de tensioactivos.

De modo a comprovar esta suposição de que os iões chumbo apresentam maior tendência para se incorporar e/ou passar a barreira de Nafion foram determinados os coeficientes de difusão aparente (D_{app}) de cada ião através do filme polimérico. O D_{app} pode ser determinado através de voltametria cíclica como descrito em [341] considerando que a reacção de oxidação/redução dos iões metálicos é reversível, e utilizando a equação de Randles-Sevick [276]:

$$I_p = 2,69 \times 10^5 n^{3/2} A D_{\text{app}}^{1/2} [\text{O}]_{\infty} v^{1/2} \quad (5.1)$$

com I_p intensidade do pico anódico ou catódico em A, n o número de electrões envolvidos na reacção de transferência de carga, A área geométrica do eléctrodo em cm^2 , $[\text{O}]_{\infty}$ a concentração da espécie oxidada no interior da solução em mol cm^{-3} e $v^{1/2}$ a raiz quadrada da velocidade de varrimento em V s^{-1} . Uma representação de I_p vs. $v^{1/2}$ permite calcular o coeficiente D_{app} dos iões em estudo através do declive da recta obtida nesse tipo de gráfico.

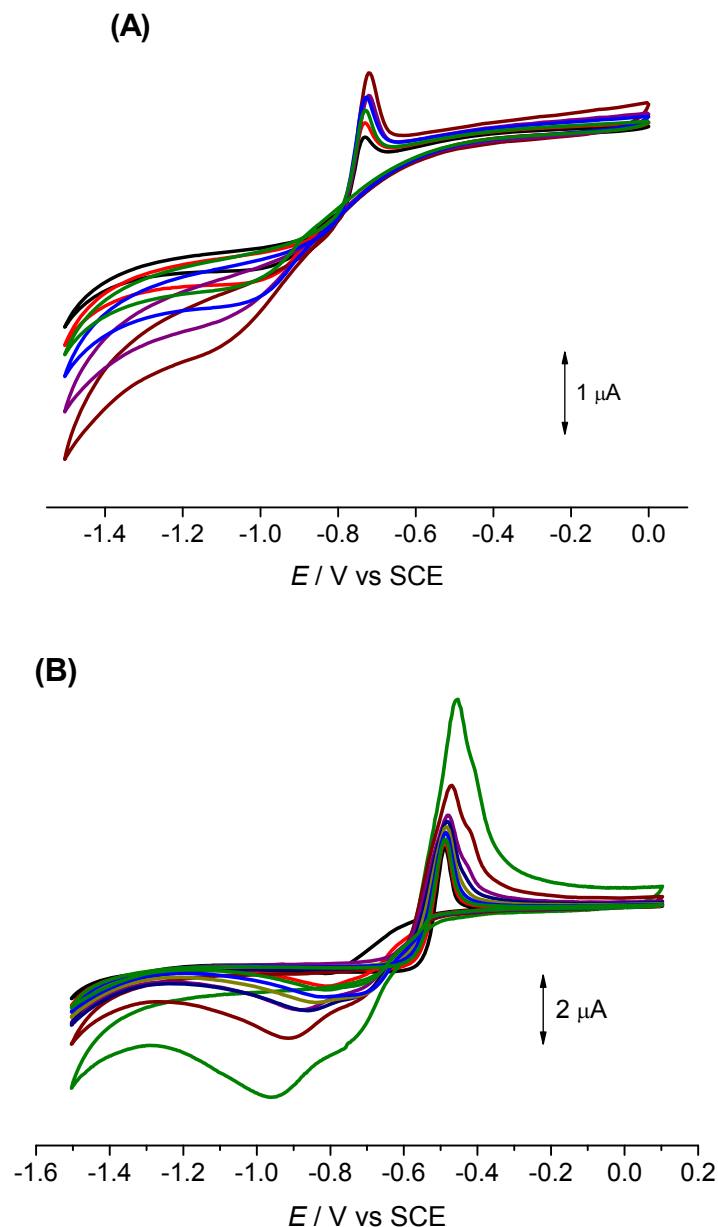


Figura 5.14 – Voltamogramas cíclicos obtidos para várias velocidades de varrimento de eléctrodos de filme de carbono modificados com Nafion, em solução em (A) 0,2 mM Cd²⁺ e (B) 0,2 mM de Pb²⁺. Electrólito de suporte: tampão acetato 0,1 M pH 4,3.

Na Figura 5.14 representam-se os voltamogramas cíclicos obtidos com os eléctrodos de filme de carbono modificados com Nafion na presença de (A) 0,2 mM de Cd(II) e (B) 0,2 mM de Pb(II) em solução tampão acetato 0,1 M pH 4,3, após subtracção da linha de base. Os gráficos de I_p vs. $v^{1/2}$ para o pico anódico correspondentes encontram-se na Figura 5.15.

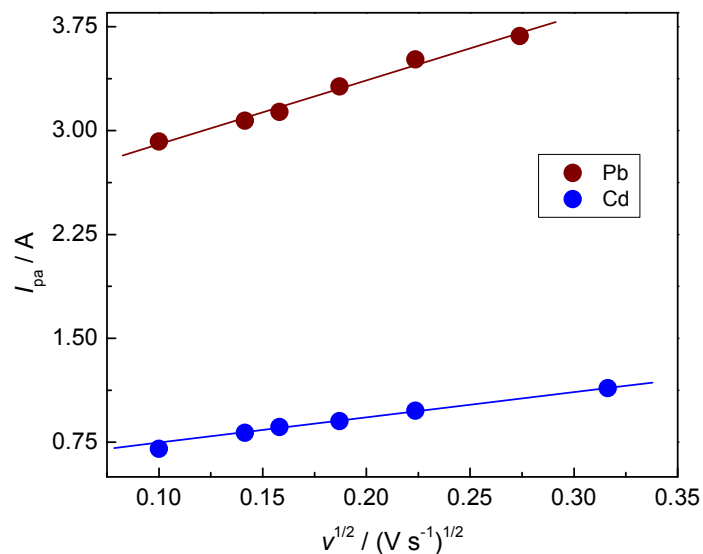


Figura 5.15 – Gráfico de I_p vs. $v^{1/2}$ para os picos anódicos dos voltamogramas cíclicos da Figura 5.14. As linhas representam a regressão linear.

O coeficiente de difusão aparente obtido para os iões chumbo $D_{app}(Pb^{2+})=2,5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ é cerca de 10 vezes superior ao dos iões cádmio $D_{app}(Cd^{2+})=3,3 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, o que pode justificar a maior intensidade de pico em ASV dos ião chumbo mesmo na presença de Triton.

A adição de tensoactivo promove um desvio nos picos de potencial das respostas de SWASV na Figura 5.13 para os dois iões metálicos, ocorrendo também uma diminuição da intensidade de corrente de pico. Estas características são normalmente referidas como envenenamento do eléctrodo. Na Tabela 5.5 estão sumariadas as correntes de pico normalizadas obtidas por SWASV dos iões chumbo e cádmio na presença de várias concentrações de Triton. A intensidade de pico referente ao cádmio diminuiu mesmo quando adicionadas pequenas concentrações de Triton, com uma redução de $\sim 90\%$ quando estão presentes 5 mg L^{-1} de Triton. A presença de concentrações mais elevadas deste tensoactivo suprime o pico característico para o cádmio nos voltamogramas SWASV. O mesmo tipo de comportamento foi obtido anteriormente em eléctrodos de carbono vítreo modificados com um filme fino de mercúrio e recobertos com Nafion (Nafion-MTFE) [152].

Tabela 5.5 – Intensidades de pico de corrente normalizadas dos voltamogramas SWASV de 10^{-7} M de Cd(II) e Pb(II) obtidas com os eléctrodos de filme de carbono modificados com Nafion em função da concentração de Triton X-100.

| | [Triton] / mg L ⁻¹ | | | | | | | |
|------------------|-------------------------------|------|------|------|----|-----|-----|-----|
| | 0 | 1 | 2 | 5 | 50 | 100 | 200 | 500 |
| Cd ²⁺ | 1,00 | 0,33 | 0,16 | 0,11 | -- | -- | -- | -- |
| Pb ²⁺ | 1,00 | 0,39 | 0,29 | 0,20 | -- | -- | -- | -- |

Em relação aos iões Pb(II), observa-se que a intensidade de corrente de pico também diminui na presença do tensoactivo, sendo que este decréscimo não é tão significativo para baixas concentrações de Triton como para o caso do cádmio. No entanto, a presença de maiores concentrações de Triton promove também a supressão do pico característico para este ião. A resposta obtida é um ligeiramente diferente da do eléctrodo Nafion-MTFE em carbono vítreo, onde pequenas concentrações de Triton aumentam a intensidade de pico de corrente para o Pb(II), permanecendo inalterada quando adicionadas maiores concentrações de Triton [152]. Este efeito pode ser explicado atendendo a que o Triton pode promover a formação da amálgama Pb-Hg no filme de mercúrio.

Normalmente, o sistema contendo os iões cádmio e/ou chumbo recupera totalmente da adsorção de Triton. No entanto, quando o eléctrodo modificado foi exposto a uma concentração de 500 mg L⁻¹, mesmo após a limpeza electroquímica por aplicação de potencial $-0,3$ V vs. SCE durante 10 minutos numa solução nova de tampão acetato 0,1 M pH 4,3, o registo do SWASV na solução demonstrou evidências de alterações irreversíveis ao eléctrodo, *i.e.*, efeitos de memória. Estes efeitos estão de acordo com os resultados obtidos por EIS representados nas Figura 5.9 e 5.10 para a concentração de Triton mais elevada.

Foram efectuados outros ensaios de EIS com a presença de Triton na solução juntamente com outros catiões, como o Fe³⁺, que não são reduzidos a metal, embora possam ser incorporados na camada de Nafion. Estes ensaios demonstraram que ocorrem alterações nas propriedades na interface Nafion-filme de carbono mesmo na presença de catiões que não formam depósitos metálicos.

No caso de amostras naturais, a situação de altas concentrações de tensioactivos não é muito usual, sendo esperada uma concentração máxima de cerca de 2 mg L^{-1} . Deste modo, é possível utilizar os eléctrodos de filme de carbono modificados com Nafion em determinações por SWASV de cádmio e chumbo em amostras naturais.

5.4 Conclusões

Neste capítulo investigou-se a influência da modificação de eléctrodos de filme de carbono com Nafion nas propriedades electroquímicas e morfológicas dos eléctrodos.

Os eléctrodos modificados com Nafion apresentam de um modo geral menores valores para os parâmetros de rugosidade de AFM quando comparados com os eléctrodos não modificados. Esta diminuição de rugosidade é mais perceptível para eléctrodos de resistência nominal de 15 e 140 Ω . Os espectros de Raman confocal mostram que não há alteração na estrutura grafítica após a modificação, sugerindo que não ocorrem interações químicas fortes entre os filmes de carbono e o Nafion.

Os eléctrodos de 2 Ω foram caracterizados através de voltametria cíclica e de EIS investigando-se a influência da modificação dos eléctrodos com Nafion, bem como da presença em solução do tensioactivo Triton X-100 na determinação de metais pesados por voltametria de redissolução de onda quadrada.

Através da voltametria cíclica verificou-se que a janela de potencial não é alterada pela modificação dos eléctrodos com Nafion. Os espectros de impedância mostram claramente as diferenças entre os eléctrodos sem e com modificação. A presença dos iões metálicos cádmio e chumbo em solução promove alterações irreversíveis na superfície dos eléctrodos modificados observadas por EIS. Estas diferenças são causadas pelo passo de deposição em determinações dos iões de metais pesados por voltametria de redissolução de onda quadrada.

A adsorção do tensioactivo Triton X-100 nos eléctrodos de filme de carbono modificados com Nafion promove alterações nos espectros de impedância, no entanto, para baixas concentrações do tensioactivo os eléctrodos retomam as suas características iniciais.

CAPÍTULO 6

ELÉCTRODOS DE FILME DE CARBONO MODIFICADOS COM FILMES DE BISMUTO

Neste capítulo estuda-se a influência da modificação dos eléctrodos de filmes de eléctrodos de filme de carbono com filmes de bismuto, e a sua possível utilização em determinações de metais pesados por voltametria de redissolução anódica [10]. As características electroquímicas dos eléctrodos modificados são analisadas através de voltametria cíclica e EIS. Estuda-se também a influência do Nafion e do tensioactivo Triton X-100 na determinação dos iões zinco, cádmio e chumbo por voltametria de redissolução anódica testando a eficiência e viabilidade destes eléctrodos modificados para estas determinações.

6.1 Introdução

O bismuto é um elemento de baixa toxicidade considerado como um elemento *amigo do ambiente* [5], vastamente utilizado na indústria farmacêutica e cosmética [342]. Desde o ano 2000, os filmes de bismuto têm sido utilizados em eléctrodos, sendo desde essa altura um tema de investigação atractivo em electroanálise, devido a serem uma boa possibilidade para substituição de eléctrodos à base de mercúrio [95].

Ao longo dos últimos anos foram utilizados vários tipos de eléctrodos de bismuto na determinação de metais pesados utilizando voltametria de redissolução [5,106]. Os filmes de bismuto têm sido depositados em diferentes substratos de carbono, em particular, carbono vítreo [95,109-121], fibra de carbono [95,114], carbono impresso [131,132], pasta de carbono [135-137,142], pasta de carbono aquecida electricamente [343] e eléctrodos de diamante dopados com boro [344], apresentando excelentes vantagens em relação aos eléctrodos de mercúrio. Eléctrodos sólidos de bismuto foram também estudados e as suas propriedades comparadas com os eléctrodos de filme de bismuto [345].

A formação de filmes de bismuto em substrato de eléctrodos de resistências de filme de carbono foi desenvolvida em [141]. Estes filmes foram depositados de diferentes formas: a potencial constante *in situ* e *ex situ*, a corrente constante *ex situ* e por varrimento de potencial. Os eléctrodos de filme de bismuto foram caracterizados por voltametria cíclica e espectroscopia de impedância electroquímica, concluindo-se que o filme de Bi depositado a potencial constante quer seja *in situ* ou *ex situ* apresenta as melhores características para aplicação em electroanálise. Demonstrou-se ainda que os eléctrodos de filme de carbono são substratos úteis para a deposição de bismuto, obtendo-se uma sensibilidade analítica para a determinação de vários metais pesados, como o Zn, Cd e Pb, semelhante ou superior à de filmes de Bi depositados noutros substratos de carbono [141].

A maioria das análises de metais pesados ocorre em amostras naturais, usualmente contendo algumas substâncias que reagem com a superfície dos eléctrodos sólidos, sendo por isso importante investigar a influência dessas espécies quando utilizados os filmes de bismuto para determinações nesses meios. Estas substâncias normalmente adsorvem na superfície do eléctrodo bloqueando-o e perturbando a deposição do analito [110]. Este problema pode ser minimizado por aplicação de um filme polimérico, *p.e.*, de Nafion, como utilizado nos eléctrodos de filme de carbono [7], de filmes de mercúrio [346] e em eléctrodos de filme de Bi depositado em carbono vítreo [159].

No trabalho anterior [8,9] descrito no Capítulo 5, estudou-se a influência de tensioactivos na determinação de Cd e Pb em eléctrodos de filme de carbono modificados com Nafion utilizando-se EIS. Neste capítulo apresenta-se o estudo da influência do filme de Nafion e do tensioactivo Triton na determinação de Zn, Cd e Pb, com eléctrodos de filme de carbono modificados com filme de Bi. Os filmes de Bi foram depositados *ex situ* para a determinação de Zn e *in situ* para a determinação de Cd e Pb. A caracterização electroquímica dos filmes de Bi foi efectuada através de voltametria cíclica e de EIS. A utilização dos eléctrodos de filme de Bi modificados com Nafion na determinação de Zn, Cd e Pb por voltametria de redissolução, foi investigada e demonstrada com sucesso.

6.2 Eléctrodos modificados com filme de bismuto

Os filmes de bismuto foram depositados nos eléctrodos de filme de carbono através da aplicação de um potencial constante. A deposição foi levada a cabo de duas maneiras

distintas: *ex situ*, *i.e.*, numa solução separada e antes da caracterização electroquímica; *in situ* na mesma solução, conforme descrito no Capítulo 3.

6.2.1. Influência de Triton na determinação de zinco

Num trabalho anterior [141] foi obtida uma melhor resposta para a determinação de iões Zn com filmes de Bi formados *ex situ*. Este processo de deposição *ex situ*, que foi realizado aplicando o potencial de $-1,4$ V vs. SCE, permitiu obter uma maior eficácia na electrodeposição em relação à deposição *in situ*, uma vez que a este potencial ocorre uma pequena evolução de hidrogénio. Após a deposição do filme, a determinação de Zn foi efectuada por SWASV. Os voltamogramas de redissolução típicos obtidos com os eléctrodos modificados para uma concentração de Zn de $400 \mu\text{g L}^{-1}$ na ausência e na presença de Triton adicionado em quantidades sucessivas são mostrados na Figura 6.1 [10].

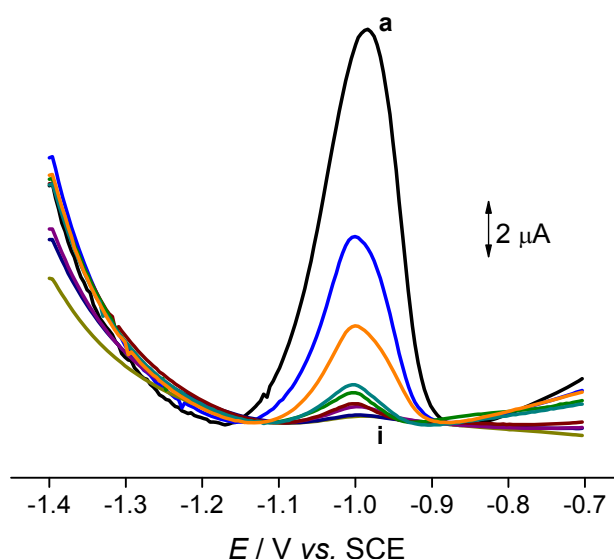


Figura 6.1 – Voltamogramas de SWASV de $400 \mu\text{g L}^{-1}$ de Zn em tampão acetato $0,1$ M pH $4,45$ com eléctrodos de filme de carbono modificados com um filme de bismuto produzido em *ex situ* na presença de: a) 0, b) 1, c) 2, d) 3, e) 4, f) 5, g) 8, h) 10 e i) 20 ppm de Triton X-100. Condições experimentais: $t_{\text{dep}} = 120$ s a $-1,4$ V vs. SCE, onda quadrada $f = 25$ Hz, $\Delta E = 2$ mV, amplitude 25 mV, tempo de equilíbrio 15 s.

O eléctrodo modificado com filme de bismuto apresenta um pico de redissolução bem definido para o Zn na ausência do tensioactivo, sendo o potencial de pico de $-1,00$ V vs. SCE. A presença de Triton não promove o desvio do potencial de pico para este ião, no entanto a presença de pequenas quantidades do tensioactivo produz uma alteração significativa na intensidade de corrente de pico: com a adição de 1 mg L^{-1} de Triton a resposta para o Zn decresce em mais de 50% do valor inicial e em concentrações superiores a 8 mg L^{-1} de Triton o sinal para o Zn é totalmente suprimido. Este comportamento foi também observado em eléctrodos de carbono vítreo modificados com filme de bismuto por Kefala *et al.* [159].

6.2.2. Influência de Triton na determinação de cádmio e chumbo

Em [141] foi observada uma excelente resposta analítica para os iões Cd e Pb com eléctrodos de filme de carbono modificados com filme de bismuto produzidos por deposição *in situ*. Estes eléctrodos modificados *in situ* apresentaram ainda maior reprodutibilidade para a determinação destes iões do que os eléctrodos modificados *ex situ* com filme de bismuto. Atendendo a estes factores, o estudo da influência de Triton na determinação de iões Cd e Pb foi efectuado com eléctrodos de filme de carbono modificados *in situ* com filme de bismuto [10]. Os voltamogramas SWASV representativos obtidos em soluções contendo $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd(II) e Pb(II) na presença de concentrações crescentes de Triton estão ilustrados na Figura 6.2.

Na ausência de tensioactivo, o eléctrodo origina dois picos bem definidos a $-0,80$ V e a $-0,58$ V vs SCE para os iões Cd e para o Pb, respectivamente. Nos voltamogramas da Figura 6.2 é também observado um pico a $-0,17$ V que corresponde ao Bi(III). A adição de Triton causa uma redução severa na corrente de pico devido ao bloqueamento parcial da superfície do eléctrodo por adsorção do tensioactivo. O decréscimo para o sinal de Cd na presença de a 1 mg L^{-1} de Triton foi de cerca de 70% do valor na ausência deste tensioactivo.

Pode também ser observado que, após a adição de Triton, o pico do bismuto desloca-se cerca de 30 – 40 mV para potenciais mais negativos, para além de a intensidade de pico diminuir com o aumento da quantidade de tensioactivo presente na solução, sendo completamente suprimido com a adição de 8 mg L^{-1} .

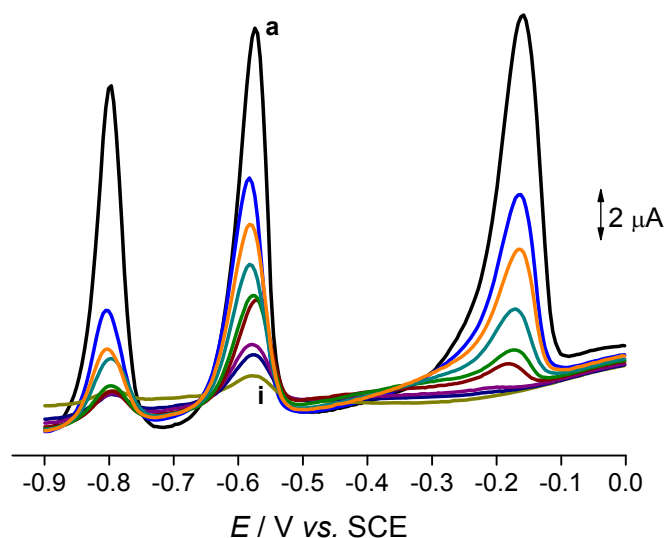


Figura 6.2 – Voltamogramas de SWASV de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd e Pb em tampão acetato $0,1 \text{ M}$ pH 4,45 com eléctrodos de filme de carbono modificados com um filme de bismuto produzido em *in situ* na presença de: a) 0, b) 1, c) 2, d) 3, e) 4, f) 5, g) 8, h) 10 e i) 20 ppm de Triton X-100. Condições experimentais: $t_{\text{dep}} = 120 \text{ s}$ a $-1,2 \text{ V vs. SCE}$, onda quadrada $f = 25 \text{ Hz}$, $\Delta E = 2 \text{ mV}$, amplitude 25 mV , tempo de equilíbrio 15 s .

6.3. Eléctrodos filme de bismuto com Nafion

O efeito provocado pelas moléculas de tensoactivo na resposta de um sensor electroquímico pode ser diminuído por aplicação de um filme/membrana protectora [4,7,8,159]. Estes filmes são muitas das vezes de polímeros, sendo trocador catiónico Nafion o mais utilizado para a modificação de eléctrodos para determinação de metais vestigiais. O filme de Nafion é fácil de preparar, e o seu efeito protector é significativo [332].

A modificação com Nafion foi realizada nos eléctrodos de filme de carbono conforme os detalhes apresentados no Capítulo experimental. Após esta modificação foram depositados os filmes de bismuto *in situ* e *ex-situ*.

6.3.1. Janela de potencial

Os eléctrodos de filme de bismuto com e sem o filme de Nafion foram caracterizados através de voltametria cíclica por forma a examinar a janela de potencial e as correntes de fundo obtidas. Estes eléctrodos podem apenas ser utilizados na região de

potenciais negativos devido à oxidação do próprio Bi a $-0,2$ V [95]. Embora os eléctrodos de filme de bismuto apresentem propriedades comparáveis às dos seus homólogos de mercúrio existem algumas diferenças fundamentais que devem ser consideradas quando estes são utilizados [5,106]. O principal inconveniente dos eléctrodos bismuto em comparação com os eléctrodos mercúrio é o seu limite de potencial anódico dado que o bismuto é um metal mais facilmente oxidável do que o mercúrio [95].

Os perfis de corrente-potencial para os eléctrodos de filme de Bi e para os de Nafion-Bi são mostrados na Figura 6.3. Neste caso, o filme de bismuto foi produzido *ex situ*, mas um comportamento semelhante foi obtido para os filmes *in situ*.

Os eléctrodos de filme de Bi sem Nafion apresentaram um comportamento semelhante ao anteriormente obtido [141]: a formação do filme de bismuto nos eléctrodos de filme de carbono não altera de uma forma significativa a janela de potencial acessível na região dos potenciais negativos. A modificação dos eléctrodos de filme de bismuto com um filme de Nafion promove um pequeno aumento da janela de potencial e uma diminuição das correntes de fundo. Esta alteração pode ser atribuída às características

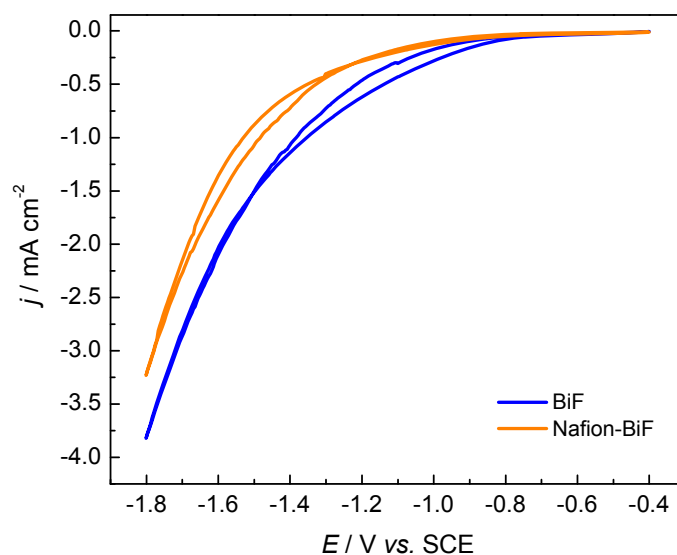


Figura 6.3 – Voltamogramas cíclicos obtidos para eléctrodos de filme de bismuto sem Nafion (BiF) e com Nafion (Nafion-BiF) em tampão acetato 0,1 M pH 4,45. Velocidade de varrimento 50 mV s^{-1} . Filme de bismuto produzido *ex situ* a potencial constante de $-1,4$ V vs. SCE.

químicas do Nafion, que permitem uma maior eficiência na electrodeposição do filme de Bi e conferindo uma maior estabilidade física do filme formado. Estas características foram apresentadas para os dois tipos de formação do filme de Bi.

6.3.2. Determinação de metais por voltametria de redissolução de onda quadrada

Os eléctrodos modificados Nafion-BiF foram utilizados para a determinação por voltametria de redissolução anódica de Zn, Cd e Pb. Na Figura 6.4 mostram-se os voltamogramas típicos SWASV obtidos com (A) 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ de zinco e (B) 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cádmio e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de chumbo na presença de Triton.

Do mesmo modo que no caso dos eléctrodos não modificados de Bi, a deposição de Bi foi feita do modo *ex situ* para a determinação de Zn e *in situ* para a determinação de Cd e Pb. Comparando os voltamogramas da Figura 6.4 com os das Figuras 6.1 e 6.2, obtidos com os eléctrodos sem Nafion, observa-se que as correntes de pico são menores quando utilizados os eléctrodos com Nafion. O decréscimo no sinal, que é provocado pela limitação à difusão devido ao filme de Nafion, é de 75% para o Zn, mas apenas de 4% para o Cd e para o Pb. Esta observação contrasta com o decréscimo de 15% obtido em eléctrodos de filme de mercúrio [332]. O facto do sinal para o Zn ter um decréscimo tão significativo, pode ser devido à evolução de hidrogénio ocorrida durante o passo de deposição deste metal nos eléctrodos Nafion-BiF, também observada na deposição *in situ* dos filmes de Bi a este potencial [141].

A sensibilidade dos eléctrodos Nafion-BiF no SWASV dos iões metálicos estudados foi de 2,7 $\text{A cm}^{-2} \text{M}^{-1}$ para o Zn e, 57,8 e 116 $\text{A cm}^{-2} \text{M}^{-1}$ para os iões Cd e Pb, respectivamente, com erros relativos entre 3 eléctrodos diferentes de 13,6%, 1,9% e 2,1%; com repetibilidade superior a 2% em todos os casos. A baixa sensibilidade e reprodutibilidade para as determinações de Zn são atribuídas à evolução de hidrogénio que ocorre durante o passo de deposição.

Para uma visualização mais fácil da diminuição da corrente de pico com o aumento da concentração de Triton nos eléctrodos de Bi com e sem modificação com Nafion, representam-se na Figura 6.5 as intensidades de pico de corrente normalizadas para a corrente na ausência de tensioactivo.

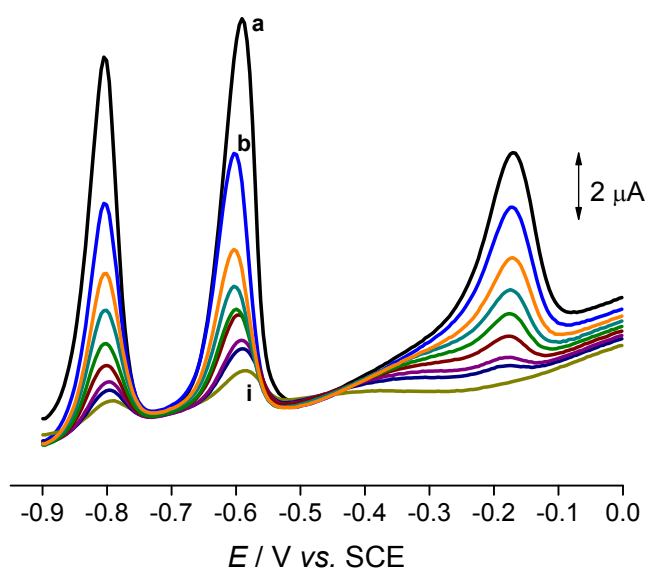
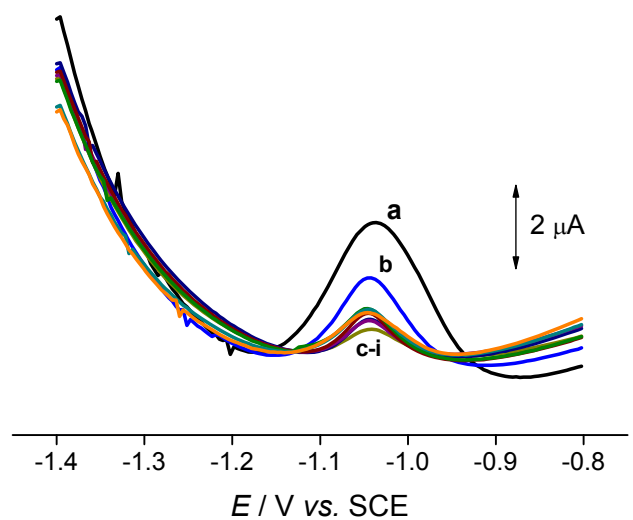


Figura 6.4 – Voltamogramas SWASV de (A) $400 \mu\text{g L}^{-1}$ de Zn e (B) $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd e $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb obtidos com os eléctrodos de Nafion-BiF, na presença de adições sucessivas de Triton. Outras condições experimentais nas Figuras 6.1 e 6.2.

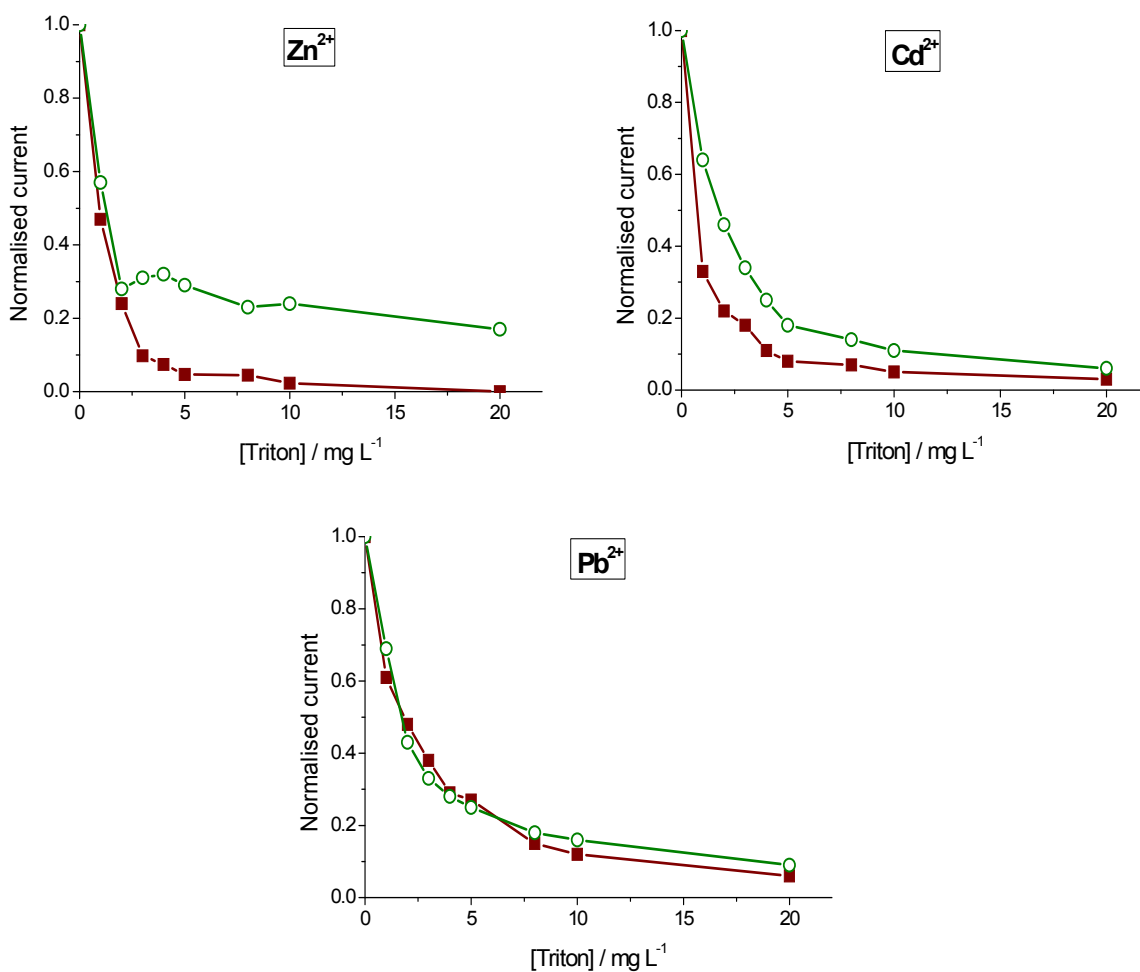


Figura 6.5 – Resposta de SWASV normalizada de 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Zn e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cd e de Pb na presença de quantidades crescentes de Triton com os eléctrodos (■) filme de Bi e (○) Nafion-BiF. Outras condições experimentais nas Figuras 6.1 e 6.2.

Como pode ser observado na Figura 6.5, a adição de 1 mg L^{-1} de Triton promove um decréscimo no sinal obtido para Zn nos eléctrodos Nafion-BiF mas esta diminuição é menor do que quando utilizados os eléctrodos de Bi sem o filme de Nafion. Após adições consecutivas de tensioactivo o pico de corrente é praticamente independente da concentração de Triton entre 2 e 10 mg L^{-1} deste composto. Desta forma é possível concluir que o eléctrodo Nafion-BiF é útil para a determinação de iões Zn por SWASV na presença de Triton em concentrações relativamente elevadas.

Um comportamento semelhante ao do Zn foi obtido para o sinal de Cd e de Pb após a adição de 1 mg L^{-1} de Triton. Contudo, um aumento da concentração de Triton promove

um decréscimo mais rápido no sinal, ou seja, o filme de Nafion é aparentemente menos eficiente para a determinação de Cd e Pb. Apesar da concentração de Zn ser 4 vezes superior ($400 \mu\text{g L}^{-1}$) à de Cd e de Pb ($100 \mu\text{g L}^{-1}$), a sensibilidade para o Zn é menor, o que pode justificar a menor corrente de pico obtida e a menor interferência por parte do Triton. Para além disso, o Zn é determinado com filmes de bismuto formados *ex situ* [141], enquanto que o Cd e o Pb são determinados com formação do filme de Bi *in situ* (em filmes formados *ex situ* a resposta para estes dois iões é pequena [141]).

Do mesmo modo que nos eléctrodos de filme de carbono modificados com Nafion (Capítulo 5) [8], observa-se que o pico do Pb é superior ao do Cd, apesar da concentração molar de Cd(II) ser quase o dobro da de Pb(II). A mesma justificação dada nessa altura é válida para o comportamento observado com estes eléctrodos de filme de bismuto modificados com Nafion. Resumidamente, o facto de os iões Pb (II) estarem presentes em solução tampão acetato na forma de complexos acetato-Pb deveria ser responsável por um sinal menor para este ião, quando comparado com os iões Cd que permanecem sob a forma $\text{Cd}^{2+}(\text{aq.})$. No entanto, esta situação não é verificada, uma vez que os iões Pb ao estarem envolvidos numa reacção de troca de ligando na interface polímero/solução ficam ligados ao polímero [145], o que equivale a um efeito de pré-concentração adicional para o Pb, manifestado no maior sinal SWASV obtido. Os iões cádmio apresentam uma menor tendência à formação de complexos com o acetato, bem como, uma menor afinidade para com ligandos de oxigénio, e, desta forma, não são incorporados no polímero na mesma extensão que os iões chumbo, o que origina o menor pico obtido em SWASV.

Na Figura 6.4(B) é também mostrado o pico de redissolução para o bismuto. Observa-se que este ião é mais sensível à presença de Triton, uma vez que a deposição *in situ* de Bi é dificultada devido à adsorção do tensioactivo na superfície do eléctrodo de filme de carbono. Apesar deste facto, a resposta SWASV demonstra que é depositada uma quantidade suficiente de metal Bi entre a superfície do CFE e o filme de Nafion, sendo possível obter limites de detecção da ordem dos nanomolares como em [141] em eléctrodos de filme de carbono modificados com filme de bismuto.

6.3.3. Espectroscopia de impedância electroquímica de eléctrodos de Nafion-BiF

A influência do filme de Nafion e de Triton X-100 na análise SWASV de cádmio e chumbo nos eléctrodos de filme de Bi produzidos *in situ* foi estudada através da técnica de espectroscopia de impedância electroquímica. Investigaram-se as características dos eléctrodos antes e após as várias modificações, bem como o comportamento em soluções na ausência e na presença de Triton. Por forma a simular as condições actuais dos ensaios electroanalíticos, as soluções não foram desoxigenadas, sendo que o efeito da desoxigenação em eléctrodos de filme de carbono foi discutido no Capítulo 4 [7]. Foram realizados ensaios semelhantes com iões zinco mas devido à evolução de hidrogénio na deposição de Zn a $-1,4$ V, tornou-se difícil retirar algumas conclusões e as deduções obtidas têm pouco significado, pelo que não serão apresentadas.

Os potenciais aplicados para o registo dos espectros de impedância foram escolhidos de acordo com os potenciais de deposição do filme de bismuto *in-situ* ($-1,2$ V vs. SCE) e os de redissolução dos iões metálicos considerados: $-0,8$ V (Cd); $-0,6$ V (Pb) e $-0,2$ V (Bi).

Os ensaios de EIS foram sequenciais e sistemáticos, pelo que, para uma melhor compreensão dos resultados que serão apresentados em seguida, torna-se necessário descrever o procedimento experimental realizado para a obtenção destes espectros:

- 1) Registo dos espectros de impedância em solução tampão acetato $0,1$ M pH $4,45$ dos eléctrodos de filme de carbono modificados com Nafion.
- 2) Deposição do filme de bismuto, e EIS efectuada nestes eléctrodos Nafion-BiF.
- 3) Deposição dos iões cádmio e chumbo a partir de soluções contendo as mesmas concentrações que as usadas nos ensaios de SWASV nas secções anteriores, *i.e.*, $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd e Pb. Neste passo foi depositado também o filme de Bi, dado que o processo de deposição é *in situ*. Registo de novos espectros de impedância.
- 4) Adição de Triton à solução, seguida do passo de deposição dos metais (passo 3) e novo registo de EIS.

Os espectros em plano complexo e da componente imaginária em função do logaritmo da frequência estão representados na Figura 6.6. Os gráficos de $-Z''$ vs. $\lg f$

permitem determinar a constante de tempo do processo de transferência de carga uma vez que o máximo nesses gráficos é obtido quando $\omega RC=1$ (ω em radianos), para o caso de um espectro que em plano complexo apresente um semicírculo descrito por uma resistência (R) em paralelo com uma capacitância (C).

Os espectros da Figura 6.6 foram modelados através de um circuito equivalente, constituído pela resistência da célula electroquímica, R_{Ω} , em série com uma combinação RCPE em paralelo, Figura 6.7(A). O elemento de fase constante foi necessário devido à não homogeneidade da superfície do eléctrodo e é modelado, como nos outros casos já apresentados, como um condensador não-ideal de capacitância C e um factor de rugosidade α , onde um valor de 1 corresponde a uma superfície perfeitamente lisa. Em alguns casos, foi necessário recorrer a um circuito composto por dois elementos RCPE em série para modelar os espectros em toda a gama de frequências estudada, Figura 6.7(B). De qualquer modo, atendendo que para uma comparação mais fácil entre as várias modificações de eléctrodo efectuadas, na Tabela 6.1 apresentam-se os resultados obtidos da modelação dos espectros na gama de “altas” frequências, ou seja, para frequências superiores a 1 Hz, região onde o espectro e o circuito eléctrico revelam os processos que ocorrem na interface eléctrodo-solução, e onde se utilizou o circuito equivalente da Figura 6.7(A).

A resistência da célula, R_{Ω} , nos eléctrodos modificados com Nafion de filmes de carbono e de bismuto foi de $\sim 7,0 \Omega \text{ cm}^2$. O factor de rugosidade foi o mesmo em todas as situações estudadas, um pouco maior do que 0,90 e superior ao obtido para os eléctrodos de filme de carbono, $\sim 0,85$ [7]. A resistência à transferência de carga, R_1 , tende a aumentar quando o potencial aplicado é menos negativo. Isto deve-se ao facto de que para potenciais mais negativos podem ocorrer na superfície do eléctrodo processos secundários como a redução de óxidos da superfície e a deposição/re-oxidação de metais.

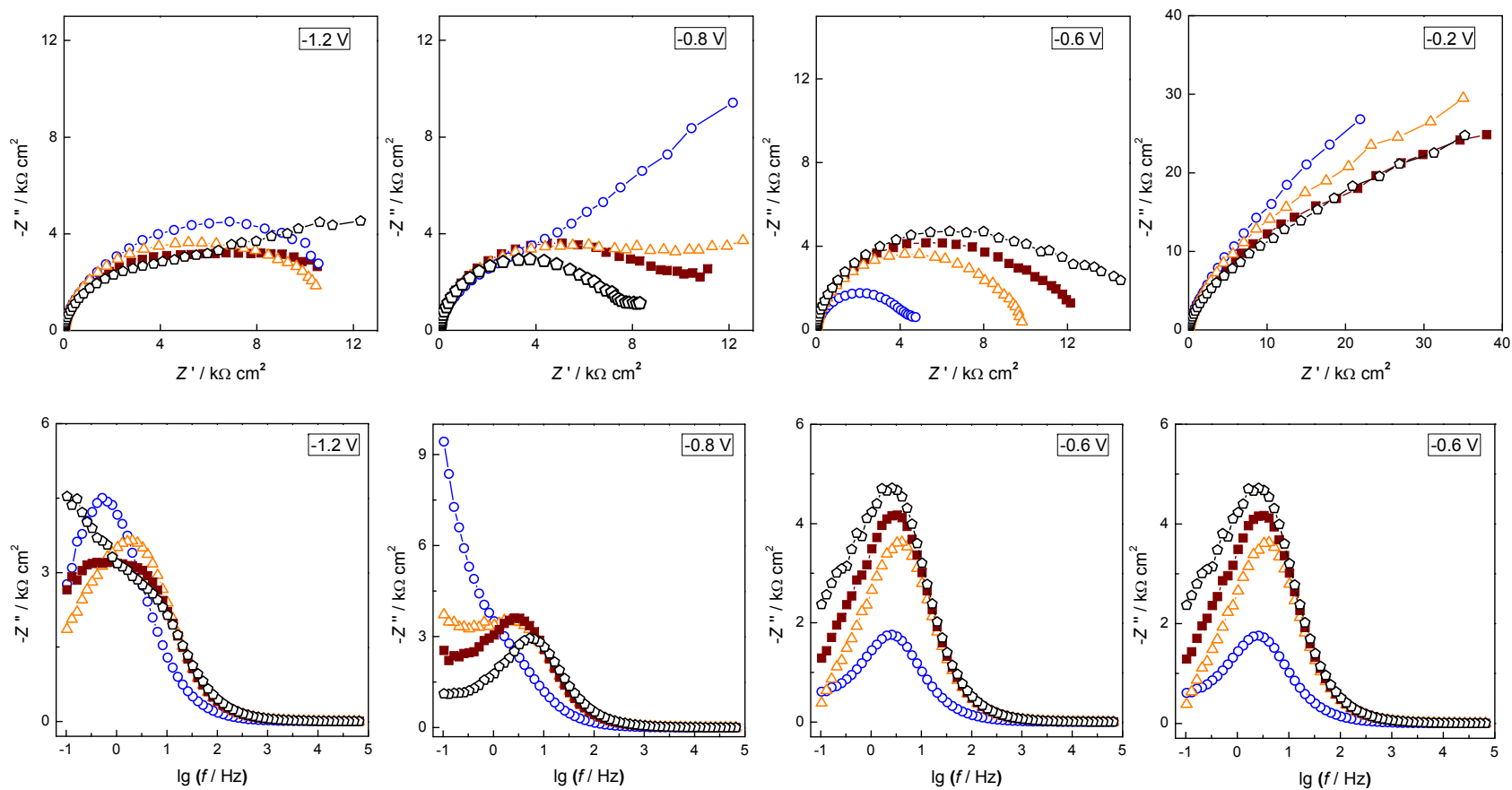
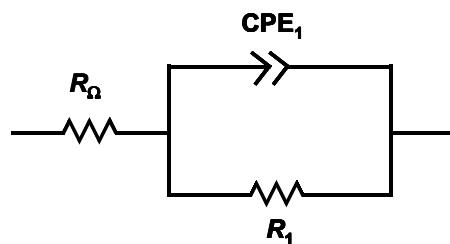


Figura 6.6 – Espectros de impedância electroquímica no plano complexo e gráficos $-Z''$ vs. $\lg(f/\text{Hz})$ para vários potenciais aplicados em solução tampão acetato 0,1 M, pH 4,45 em eléctrodos modificados com Nafion (○) filme de carbono e (△) filme de bismuto e, este último com (■) 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cd(II) e Pb(II) e (○) com 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cd(II) e Pb(II) na presença de 1 mg L^{-1} de Triton.

(A)



(B)

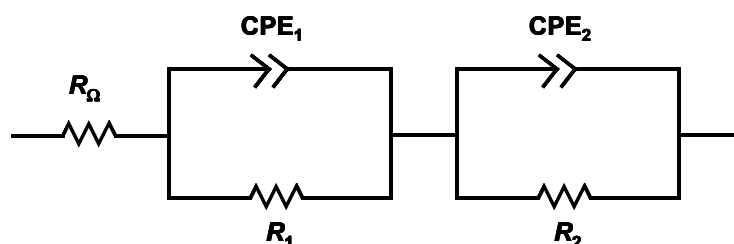


Figura 6.7 – Circuitos eléctricos equivalentes utilizados na modelação dos espectros de EIS.

Tabela 6.1 – Dados obtidos da modelação dos espectros da Figura 6.6 para frequências superiores a 1 Hz. R_1 : resistência à transferência de carga; C_1 capacitância; α : factor rugosidade (CFE: filme de carbono e BiF: filme de bismuto).

| Eléctrodo / solução | E / V vs. SCE | $R_1 / k\Omega \text{ cm}^2$ | $C_1 / \mu F \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{\alpha-1}$ | α_1 |
|--------------------------------|-----------------|------------------------------|--|------------|
| Nafion-CFE | -1,20 | 8,31 | 15,7 | 0,92 |
| | -0,80 | 6,68 | 17,5 | 0,91 |
| | -0,60 | 4,01 | 17,9 | 0,92 |
| | -0,20 | 23,9 | 21,4 | 0,90 |
| Nafion-BiF-CFE | -1,20 | 8,26 | 7,16 | 0,91 |
| | -0,80 | 8,17 | 6,02 | 0,92 |
| | -0,60 | 8,36 | 5,42 | 0,93 |
| | -0,20 | 26,5 | 10,1 | 0,91 |
| + Pb^{2+} and Cd^{2+} | -1,20 | 7,29 | 7,47 | 0,90 |
| | -0,80 | 8,41 | 6,39 | 0,91 |
| | -0,60 | 9,63 | 5,25 | 0,93 |
| | -0,20 | 24,7 | 7,06 | 0,91 |
| + 1 mg L^{-1} Triton | -1,20 | 6,72 | 7,06 | 0,90 |
| | -0,80 | 6,88 | 4,88 | 0,92 |
| | -0,60 | 10,9 | 5,15 | 0,92 |
| | -0,20 | 21,0 | 7,58 | 0,90 |

Os espectros mostram as seguintes tendências:

- A $-1,2$ V, os espectros em plano complexo de todos os filmes sem Triton em solução apresentam um semicírculo comprimido. A presença de Triton causa algumas alterações a baixas frequências, devido provavelmente à adsorção na superfície dos eléctrodos deste composto. O pico no gráfico $-Z''$ vs. $\lg f$ ocorre a $\lg f = -0,4$ para os filmes de carbono, que com a adição de bismuto (ou seja, formação do filme de bismuto) é desviado para um valor superior. Este volta a sofrer nova alteração com a adição dos iões Cd e Pb, e é suprimido quando adicionado Triton à solução, devido à sua adsorção.

- O espectro no plano complexo a $-0,8$ V mostra maiores diferenças entre as várias situações experimentais, em particular na presença de Triton. O efeito da re-oxidação do Cd é observado a baixas frequências, e a adição de Triton promove uma diminuição nos valores da magnitude de impedância, devido à adsorção e bloqueamento parcial da reacção de re-oxidação do Cd. Observa-se também que o pico no gráfico $-Z''$ vs. $\lg f$ é suprimido quando adicionado Triton à solução.

- Como em [7], ocorre redução de óxidos da superfície do eléctrodo a $-0,6$ V nos filmes de carbono modificados com Nafion, originando menores magnitudes de impedância e uma forma de semicírculo mais perfeita no espectro em plano complexo. A impedância aumenta após a deposição do filme de Bi através dos poros de Nafion. A adição dos metais Cd e Pb promove uma pequena alteração nestes valores, que são novamente aumentados por adição de Triton à solução. Não ocorrem desvios significativos à constante de tempo obtida através dos gráficos $-Z''$ vs. $\lg f$.

- Comparando com os outros potenciais, a $-0,2$ V foram obtidos os maiores valores de impedância. A este potencial ocorre a re-oxidação do bismuto, e por este motivo o espectro obtido é o dos eléctrodos de filme de carbono modificados com Nafion com alteração morfológicas do polímero. Estas alterações são irreversíveis e foram descritas anteriormente para os eléctrodos de filme de carbono modificados com Nafion [7] e, para eléctrodos de filme de mercúrio [332] afectando grandemente as análises por voltametria de redissolução anódica.

As diferenças observadas a $-0,8$ V e $-0,6$ V com os eléctrodos Nafion-BiF podem estar relacionadas com a maior tendência para formação de complexos de catiões Pb com aniões acetato na solução tampão (veja-se a secção anterior). Os espectros mostram claramente que as características da região interfacial em todos os potenciais estudados são significativamente modificadas pela presença de Triton. No entanto, os ensaios de SWASV mostram que essas alterações não bloqueiam totalmente a passagem dos iões metálicos.

Um outro aspecto mais importante está relacionado com a resistência à transferência de carga nos eléctrodos Nafion-BiF com a adição de Cd(II) e Pb(II) ser significativamente menor do que a obtida nas mesmas condições com eléctrodos Nafion-filme de carbono ($38,1 \text{ k}\Omega \text{ cm}^{-2}$ [7]), demonstrando que os filmes de Bi têm maior facilidade para a deposição de metais pesados. Esta evidência sugere que os eléctrodos Nafion-BiF são melhores para a electroanálise de Cd e Pb do que os eléctrodos de Nafion-filme de carbono.

6.4. Conclusões

Neste capítulo foram investigadas as características electroquímicas de filmes de bismuto depositados sobre eléctrodos de resistência de filme de carbono através das técnicas de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância electroquímica. Os filmes de bismuto foram electrodepositados a potencial constante *ex-situ* e *in-situ*. A forma de deposição *ex-situ* revelou-se mais apropriada para a determinação de zinco por SWASV, enquanto que a deposição *in-situ* foi utilizada para a análise de chumbo e cádmio por SWASV.

A influência do tensioactivo Triton X-100 na determinação por SWASV dos metais pesados foi investigada nos eléctrodos de filme de Bi com e sem modificação com Nafion. Os resultados obtidos demonstraram a capacidade do Nafion em proteger os eléctrodos de filme de bismuto da adsorção irreversível de Triton, apesar de a espectroscopia de impedância electroquímica mostrar que o Triton promove alterações na interface dos eléctrodos. De qualquer modo, é possível determinar os metais pesados Zn, Cd e Pb na presença de concentrações elevadas de Triton com os eléctrodos de bismuto modificados com Nafion, situação que não era viável com os eléctrodos sem Nafion.

Os eléctrodos Nafion-filme de bismuto depositados sobre eléctrodos de resistências de filmes de carbono podem ser utilizados com sucesso na determinação de metais pesados em amostras naturais.

CAPÍTULO 7

ELÉCTRODOS DE FILME DE CARBONO MODIFICADOS COM NANOTUBOS DE CARBONO EM BIOSSENSORES

Neste capítulo apresentam-se eléctrodos de filme de carbono modificados com nanotubos de carbono para utilização em biossensores electroquímicos [12]. Os biossensores investigados são baseados nas enzimas glucose oxidase e álcool oxidase, otimizando-se a forma de imobilização dos nanotubos de carbono nos eléctrodos bem como os parâmetros de operacionalidade dos biossensores para a determinação de etanol.

7.1 Introdução

O desenvolvimento de nanotubos de carbono para aplicações electroanalíticas é um campo de pesquisa multidisciplinar em grande fase de expansão. Devido às suas características estruturais, força mecânica e propriedades eléctricas [60,65,347,348], os CNTs têm atraído muitos cientistas a desenvolverem a sua investigação com estes materiais. Como seria de esperar, a reactividade dos nanotubos de carbono depende apenas dos planos exteriores e dos defeitos estruturais na forma cilíndrica da sua superfície [349].

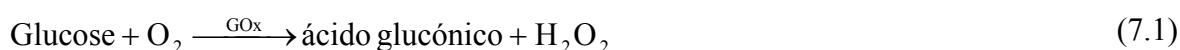
A estabilidade química dos CNTs bem como a sua afinidade para biomoléculas torna estes materiais promissores para aplicações em sensores e biossensores electroquímicos [350]. Como material de eléctrodo, os nanotubos de carbono, promovem a reacção de transferência de electrão com espécies electroactivas em solução [351], apresentando melhores características electroquímicas que os eléctrodos de carbono tradicionais [352]. Os CNTs melhoram também a reacção de transferência de electrão em moléculas com implicações biológicas importantes, como o citocromo c [353-355], mioglobina [356-358], glucose [359-363], catalase [364,365], NADH [366-370] e hemoglobina [371,372], entre outras.

A insolubilidade dos CNTs em todos os solventes é uma das grandes limitações ao seu uso em sensores e biossensores electroquímicos. Várias estratégias têm sido propostas

para dissolver os CNTs, incluindo o tratamento oxidativo [373], envolvimento em polímeros [374] e funcionalização lateral [375]. A funcionalização dos CNTs melhora a sua solubilidade e o seu processamento, permitindo o desenvolvimento de novos materiais baseados em nanotubos de carbono [299].

A utilização de cadeias poliméricas para revestir os CNTs permite melhorar a solubilidade mantendo as características físicas dos nanotubos. O Nafion é um dos polímeros mais utilizados em modificação de superfícies de eléctrodos, para o desenvolvimento de sensores e biossensores. Wang *et al.* [360] demonstraram a utilidade do Nafion para a solubilização dos CNTs e observaram efeitos electrocatalíticos para a oxidação/redução de peróxido de hidrogénio, importantes quando utilizados biossensores amperométricos preparados com enzimas oxidases. Tsai *et al.* [162] utilizaram uma dispersão de MWCNT em Nafion para modificar um eléctrodo de carbono vítreo com vista à sua utilização na determinação electroanalítica de metais pesados na presença de tensioactivos como o SDS e o Triton X-100 em solução.

Vários biossensores electroquímicos têm sido preparados utilizando CNTs [350]. A maioria destes tem sido desenvolvida para determinação de glucose com e sem a utilização de mediadores redox. A enzima glucose oxidase é usualmente utilizada para a construção de biossensores enzimáticos para determinação de glucose. Esta enzima catalisa a reacção de oxidação da glucose em ácido glucónico com produção de peróxido de hidrogénio



em que o oxigénio molecular actua como aceitador de electrões.

A redução do oxigénio ou oxidação/redução do peróxido de hidrogénio resultante necessita da aplicação de um potencial suficientemente elevado. A corrente registada é proporcional à concentração de glucose, determinada através da medição do oxigénio consumido ou do peróxido de hidrogénio libertado. A utilização de CNT ou de mediadores redox permite diminuir o potencial aplicado para estas determinações.

No que diz respeito a biossensores para etanol, o seu desenvolvimento tem sido baseado na enzima álcool desidrogenase, com a necessidade de misturar o co-factor NAD^+ com o compósito MWCNT [376], incorporação em eléctrodos de pasta de CNT [377] ou

por camada automontada numa superfície modificada de um eléctrodo de carbono vítreo com SWCNT, mantidos por policatões e recobertos com Nafion [378].

O objectivo deste capítulo é expandir a utilização dos eléctrodos de filme de carbono como material de suporte para eléctrodos modificando-os com MWCNT e desenvolver um biossensor baseado na enzima álcool oxidase. Foi investigado um método de modificação dos eléctrodos de filme de carbono com os MWCNT de acordo com os utilizados na modificação de eléctrodos de carbono vítreo [298]. Os MWCNTs foram funcionalizados em HNO₃ e dissolvidos em Nafion. A dispersão MWCNT/Nafion foi utilizada para desenvolver e otimizar um biossensor de glucose, baseado em glucose oxidase (GOx), em eléctrodos de carbono vítreo antes da aplicação de MWCNTs no desenvolvimento do biossensor com AlcOx em filmes de carbono.

7.2 Método de modificação dos eléctrodos

7.2.1 Biossensor para glucose

Antes do desenvolvimento do biossensor para álcool, foi necessário otimizar as condições de modificação dos eléctrodos de filme de carbono com os MWCNT. A modificação de eléctrodos com MWCNT é normalmente efectuada após a dispersão dos nanotubos em solventes como a dimetilformamida, etanol, e em polímeros como o Nafion e o acetato de celulose [298]. No entanto, devido à área geométrica disponível dos eléctrodos de disco de filme de carbono, $\sim 0,020 \text{ cm}^2$, o volume da dispersão utilizado nas modificações não poderia ser superior a 1 μL , tornando-se numa tarefa complicada de ser realizada. Deste modo, foi utilizado um eléctrodo de carbono vítreo para desenvolver metodologias de imobilização dos nanotubos de carbono e da camada enzimática com posterior aplicação nos eléctrodos de filme de carbono.

Suporte de carbono vítreo

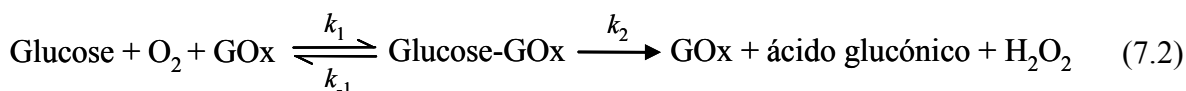
A optimização do processo de modificação foi efectuada de acordo com o procedimento descrito no Capítulo experimental. O eléctrodo GC foi modificado com os nanotubos de carbono de várias formas e a eficiência do biossensor testada através da resposta amperométrica para a electrooxidação de H₂O₂ a +0,70 V vs. SCE produzido na

reacção de oxidação da glucose catalisada pela enzima glucose oxidase. Resumidamente, a modificação dos eléctrodos efectuada da seguinte forma:

- GC/MWCNT/GOx: o eléctrodo de GC foi modificado através com a dispersão de MWCNT/Nafion, colocando-se por cima a mistura enzimática de GOx-BSA-GA;
- GC/MWCNT-GOx: o eléctrodo de GC foi modificado através de uma mistura formada por MWCNT-GOx-BSA-GA.
- GC/GOx/MWCNT: a camada enzimática foi primeiro colocada na superfície do eléctrodo de GC, e após se ter aguardado que secasse à temperatura ambiente, a dispersão MWCNT/Nafion foi colocada por cima desta camada enzimática.

Um eléctrodo de GC modificado com GOx (GC/GOx), no qual a mistura enzimática de GOx foi colocada directamente sobre o eléctrodo de GC, sem MWCNT, foi também preparada para permitir efectuar comparações com os eléctrodos modificados com MWCNT.

Por forma a estudar a reacção enzimática descrita na Equação (7.1), considere-se o seguinte mecanismo:



Admitindo que a concentração do complexo enzima-substrato é constante, poder-se-á aplicar a aproximação do estado estacionário, obtendo-se

$$[\text{ES}] = \frac{k_1[\text{S}][\text{E}_0]}{k_{-1} + k_2 + k_1[\text{S}]} = \frac{[\text{S}][\text{E}_0]}{K_M + [\text{S}]} \quad (7.3)$$

onde ES representa o complexo Glucose-GOx, $[\text{E}_0] = [\text{E}] + [\text{ES}]$ a concentração total da enzima GOx, $[\text{S}]$ a concentração de glucose e $K_M = (k_{-1} + k_2)/k_1$ a constante de Michaelis.

Sabendo-se que a velocidade do processo global é dada por

$$v = d[\text{P}]/dt = -d[\text{S}]/dt \quad (7.4)$$

concluí-se que

$$v = k_2[ES] = \frac{k_2[E_0][S]}{K_M + [S]} \quad (7.5)$$

sendo esta relação conhecida por equação de Michaelis-Menten.

Invertendo-se a Equação (7.5), pode ser obtida uma relação linear do tipo

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M + [S]}{k_2[E_0][S]} = \frac{k_2[E_0][S]}{K_M + [S]} + \frac{1}{v_{\max}} \quad (7.6)$$

com v_{\max} a velocidade da reacção quando a enzima livre se encontra saturada pelo substrato. Desta forma, representando-se $1/v$ em função $1/[S]$, gráfico de Lineweaver-Burk, é possível determinar a constante de Michaelis-Menten através do declive da recta obtida. Experimentalmente, no caso da utilização de uma curva de calibração resultante de cronoamperometria, representa-se $1/I$ vs. $1/[S]$.

Na Tabela 7.1 mostram-se os resultados dos ensaios efectuados nas diversas condições de modificação dos eléctrodos.

Tabela 7.1 Parâmetros obtidos das curvas de calibração de glucose em diferentes biossensores MWCNT-GOx . Potencial aplicado +0.70 V vs. SCE em PBS 0,1 M pH 7,0.

| Tipo de Biossensor | Gama linear/ mM | Sensibilidade/ $\mu\text{A cm}^{-2} \text{mM}^{-1}$ | R^2 | Limite de detecção/ μM | K_M / mM |
|--------------------|--------------------|--|-------|--------------------------------------|---------------|
| GC/GOx | 0,05–1,10 | 0,52 | 0,998 | 8,1 | 2,2 |
| GC/MWCNT/GOx | 0,05–1,10 | 9,43 | 0,997 | 9,3 | 1,9 |
| GC/MWCNT-GOx | 0,05–1,00 | 2,39 | 0,997 | 14,0 | 2,5 |
| GC/GOx/MWCNT | 0,05–1,00 | 0,49 | 0,998 | 16,2 | 2,2 |

O biossensor preparado com a camada enzimática sobre o filme de MWCNT apresentou uma maior eficiência para a determinação de glucose: a sensibilidade obtida com este biossensor foi ~18 vezes superior ao biossensor sem MWCNT. A sensibilidade obtida com os biossensores preparados sem MWCNT e com MWCNT sobre a camada enzimática foi semelhante, mostrando que os CNTs cobrem totalmente a camada enzimática, e por conseguinte dificultam o contacto do analito com a enzima.

A mistura dos MWCNT com a enzima GOx depositada sobre o eléctrodo GC, apresentou a menor resposta para a glucose de todos os biossensores estudados. Esta menor sensibilidade é causada, provavelmente, pelo bloqueamento parcial da enzima e do contacto deficiente entre esta e os nanotubos.

Suporte de filme de carbono

O passo seguinte foi utilizar os eléctrodos de filme de carbono (CFE) como suporte para o desenvolvimento do biossensor de glucose. O diâmetro dos eléctrodos de disco de CFE é de 1,5 mm, o que dificulta a colocação com precisão da dispersão de MWCNT/Nafion 1%. Desta forma, não foi possível o controle exacto da quantidade de MWCNT em modificações dos CFE semelhantes às realizadas com os eléctrodos de GC, descritas anteriormente. Por conseguinte, foi decidido colocar os MWCNT directamente sobre a superfície dos CFE sem recorrer ao uso de solventes, procedimento adoptado por Salimi *et al.* [300] para modificação de eléctrodos de GC. Após a colocação dos MWCNTs nos CFE, estes foram fixos através de 1 µL de Nafion 1% em etanol ou da mistura enzimática enzima-BSA-GA, colocados directamente no topo dos MWCNTs.

A determinação das áreas electroactiva e de cobertura dos MWCNT foram efectuadas através de voltametria cíclica dos eléctrodos modificados CFE/MWCNT/Nafion em hexaaminoruténio (III) de potássio 3 mM em KCl 0,1 M. Os voltamogramas obtidos estão representados na Figura 7.1.

De acordo com os voltamogramas obtidos, observa-se um comportamento reversível para o sistema redox $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+} / \text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+}$. A diferença entre os potenciais de pico de redução, $\sim -0,220$ V, e de oxidação, $\sim -0,160$ V, sugere um comportamento reversível ideal, já observado em eléctrodos modificados com MWCNT com o sistema redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ [379].

A linearidade da intensidade de pico de corrente anódico com a raiz quadrada da velocidade de varrimento permite calcular a área electroactiva do eléctrodo modificado, atendendo à equação de Randles-Sevick:

$$I_p = 2.7 \times 10^5 n^{3/2} A D_0^{1/2} [O]_{\infty} v^{1/2} \quad (7.7)$$

com $D_0 = 9,1 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ [380].

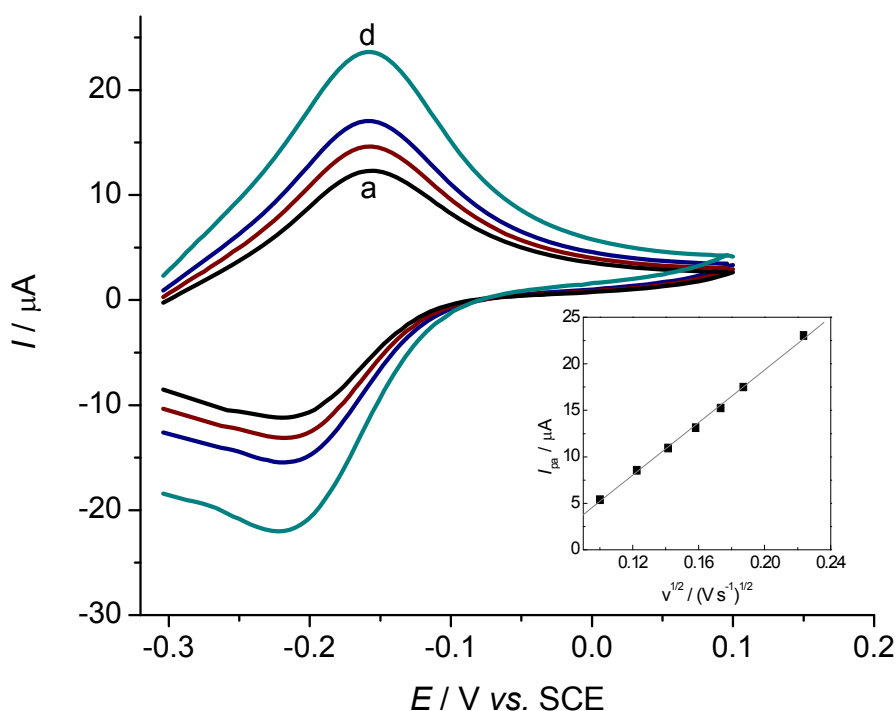


Figura 7.1 – Voltamogramas cíclicos de 3 mM de $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ em 0,1 M de KCl obtidos com os eléctrodos CFE/MWCNT/Nafion a diversas velocidades de varrimento de (a) $0,025 \text{ V s}^{-1}$ a (d) $0,05 \text{ V s}^{-1}$. No painel inserido mostra-se a dependência linear do pico de corrente anódico com a raiz quadrada da velocidade de varrimento.

Sendo o declive da recta do gráfico de I_p vs $v^{1/2}$ igual a $142 \mu\text{A V}^{1/2} \text{ s}^{1/2}$, a área electroactiva do eléctrodo modificado é de $\sim 0,060 \text{ cm}^2$, 3 vezes maior do que a do eléctrodo de filme de carbono $\sim 0,020 \text{ cm}^2$, e 30 vezes superior à do eléctrodo CFE/Nafion 1% ($\sim 0,002 \text{ cm}^2$). A comparação destes valores permite afirmar que o filme de Nafion 1% bloqueia alguns sítios electroactivos do eléctrodo de filme de carbono.

A área de cobertura, Γ , dos MWCNT foi calculada através dos picos de corrente de redução dos voltamogramas da Figura 7.1, pela equação [381]

$$I_p = \left(\frac{n^2 F^2}{4RT} \right) \Gamma A v \quad (7.8)$$

onde A é a área geométrica do eléctrodo e v é a velocidade de varrimento. O valor obtido foi de $27 \pm 1 \text{ nmol cm}^{-2}$.

O biossensor de glucose foi construído tendo como suporte um eléctrodo de filme de carbono. Este eléctrodo foi modificado com MWCNT sólidos funcionalizados e a mistura enzima-BSA-GA, colocada no topo destes, na mesma sequência que se observou ser a mais apropriada tendo como suporte um eléctrodo de GC. A colocação da mistura enzimática por cima dos MWCNT permitiu que estes ficassem imobilizados na superfície do eléctrodo.

Os nanotubos de carbono promovem uma transferência de electrão directa no caso da utilização de GOx [361], pelo que foi testada a resposta amperométrica do biossensor CFE/MWCNT-GOx-BSA-GA a 0,0 V vs. SCE. A este potencial o H₂O₂ é reduzido no eléctrodo CFE/MWCNT-Nafion, como mostra a Figura 7.2, mas ocorre um aumento de corrente, correspondente à oxidação, no biossensor após algumas adições de alíquotas de solução de glucose. A aplicação de um potencial mais negativo de -0,45 V, origina um aumento na corrente de oxidação e um decréscimo na gama linear da resposta amperométrica registada. Estas evidências confirmam que ocorre uma transferência de carga directa nos CNTs como observado em [361], pelo que não há necessidade de utilizar mediadores redox. Em substratos de carbono, a -0,45 V ocorre a regeneração do FAD da enzima GOx [363,382].

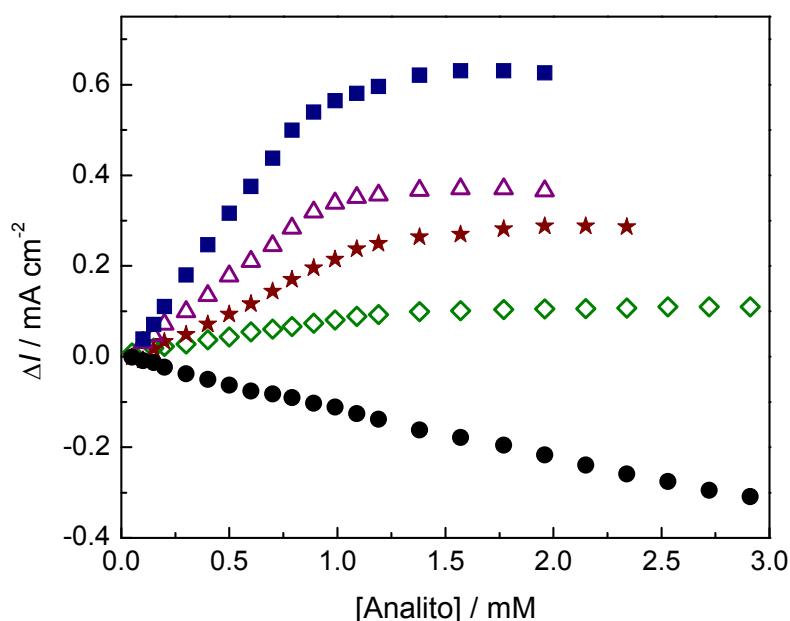


Figura 7.2 – Resposta amperométrica para H₂O₂ no eléctrodo CFE/MWCNT-Nafion a 0,0 V vs. SCE (●) e para glucose no biossensor CFE/MWCNT-GOx-BSA-GA a diferentes potenciais aplicados: (◇) 0,0 V; (★) -0,1 V; (△) 0,2 V e (■) -0,45 V vs. SCE. Electrólito suporte PBS 0,1 M pH 7,0.

Table 7.2. Parâmetros obtidos das curvas de calibração de biossensores de glucose CFE/CNT-GOx em diferentes potenciais aplicados. Electrólito suporte: PBS 0,1 M pH 7,0. No eléctrodo CFE/CNT o analito foi H₂O₂.

| Potencial / V | Gama linear/ mM | Sensibilidade/ $\mu\text{A cm}^{-2} \text{mM}^{-1}$ | R^2 | Limite de detecção/ μM | K_M / mM |
|-----------------|--------------------|--|-------|--------------------------------------|---------------|
| 0,0 (CNT) | -- | 106 | 0,998 | 15,5 | -- |
| 0,0 (CNT/GOx) | 0,05–1,2 | 75,0 | 0,998 | 7,1 | 1,7 |
| -0,10 (CNT/GOx) | 0,1–1,1 | 237 | 0,998 | 5,1 | 2,0 |
| -0,20 (CNT/GOx) | 0,1–0,9 | 364 | 0,998 | 2,8 | 1,5 |
| -0,45 (CNT/GOx) | 0,1–0,8 | 666 | 0,999 | 2,2 | 1,7 |

Apesar de ocorrer redução de H₂O₂ a 0,0 V, mostrando o efeito catalítico dos CNT no eléctrodo CFE/MWCNT-Nafion, a resposta do biossensor é significativamente mais baixa. Contudo a sensibilidade para a determinação de glucose com o biossensor é mais elevada, a -0,1 V ou a -0,2 V do que a +0,70 V, onde ocorre a reacção de oxidação do peróxido de hidrogénio em eléctrodos convencionais de carbono, vejam-se as Tabelas 7.1 e 7.2. A reacção substrato-enzima teve um comportamento típico de uma cinética de Michaelis-Menten. Após a análise da Tabela 7.2 optou-se por escolher o potencial de -0,15 V em estudos posteriores com este biossensor.

A resposta para glucose de diferentes biossensores preparados da mesma forma teve uma variação de cerca de 10%, atribuída a diferentes áreas de superfície devidas às variações na fracção de massa de MWCNT colocados no eléctrodo suporte.

A curva de calibração para glucose obtida a -0,15 V com biossensor CFE/MWCNT-GOx-BSA-GA apresentou uma linearidade de 0,05 a 0,9 mM, com uma sensibilidade de $289 \mu\text{A cm}^{-2} \text{mM}^{-1}$ e um limite de detecção de 5,0 μM . A constante aparente de Michaelis Menten, determinada através da representação de Lineweaver-Burk, foi de 2,4 mM. Estes parâmetros são melhores do que os obtidos com os eléctrodos de GC/CNT/GOx a +0,70 V na determinação de glucose no que diz respeito a sensibilidade e limite de detecção.

7.3 Biossensor para etanol

7.3.1 Optimização dos principais parâmetros para a determina o de etanol

O biossensor de etanol desenvolvido baseou-se na enzima álcool oxidase. A reac o catalisada pela enzima produz acetaldeído e peróxido de hidrog nio:



A optimiza o das condi es de utiliza o do biossensor foi estudada utilizando um eléctrodo de filme de carbono sem modifica o com MWCNT. A enzima AlcOx foi imobilizada da mesma forma que a anteriormente descrita para a GOx, ou seja, reticula o com glutaraldeído numa soluço de AlcOx e BSA na razão de 1:1.

Potencial aplicado

A influência do potencial de trabalho foi estudada nas condi es experimentais mais comuns para a utiliza o de oxidases, *i.e.*, em soluço PBS 0,1 M pH 7,0. Os resultados obtidos estão representados na Figura 7.3. Observou-se que, a resposta amperométrica   a mais elevada quando aplicado o potencial $-0,45$ V, sendo este o potencial onde ocorre a regenera o do FAD, tal como aconteceu com a GOx. Foi obtida uma maior corrente da electroxida o do H_2O_2 , formado durante a reac o enzimática, a $+0,75$ V, pelo que se optou por aplicar o potencial de $-0,45$ V para o estudo da optimiza o do pH da soluço.

pH da soluço de electrólito

Em rela o ao pH da soluço de electrólito suporte, registou-se a resposta amperométrica para uma concentra o de 1 mM de etanol em soluço tampão PBS 0,1 M, variando-se o pH entre 6,0 e 8,5. As respostas mais elevadas foram obtidas para valores de pH entre 7,5 e 8,0 como   mostrado na Figura 7.4. Optou-se por utilizar o pH 7,5 em futuras determina es, valor de pH óptimo utilizado no desenvolvimento de biossensores ópticos utilizando a enzima álcool oxidase [383,384]. De acordo com estes autores o pH óptimo de trabalho depende do ensaio e aumenta com o número de cadeias alifáticas do álcool [384].

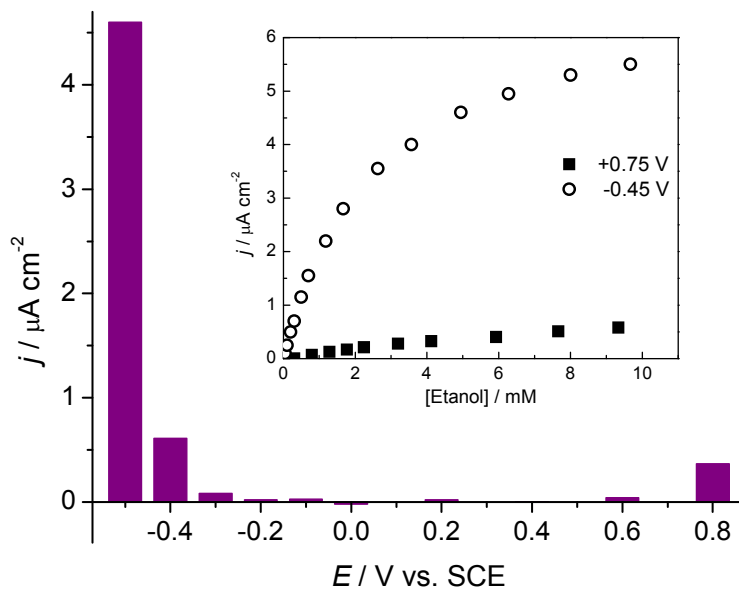


Figura 7.3 – Efeito do potencial aplicado na resposta de corrente de 1 mM de etanol em PBS pH 7,0 do biossensor CFE/AlcOx-BSA-GA. No painel inserido: curvas de calibração para etanol em PBS 0,1 M pH 7,0 a (○) -0,45 V e (■) +0,75 V vs. SCE.

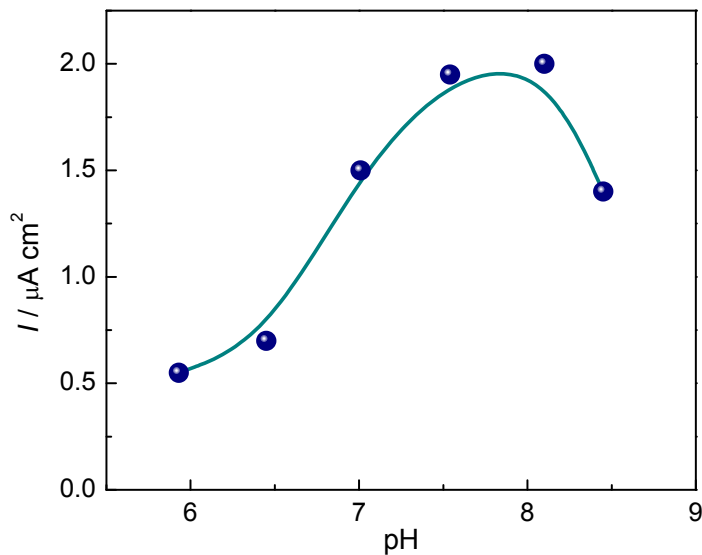


Figura 7.4 – Efeito do pH da solução de electrólito suporte na resposta de amperométrica de 0,3 mM de etanol em PBS 0,1 M.

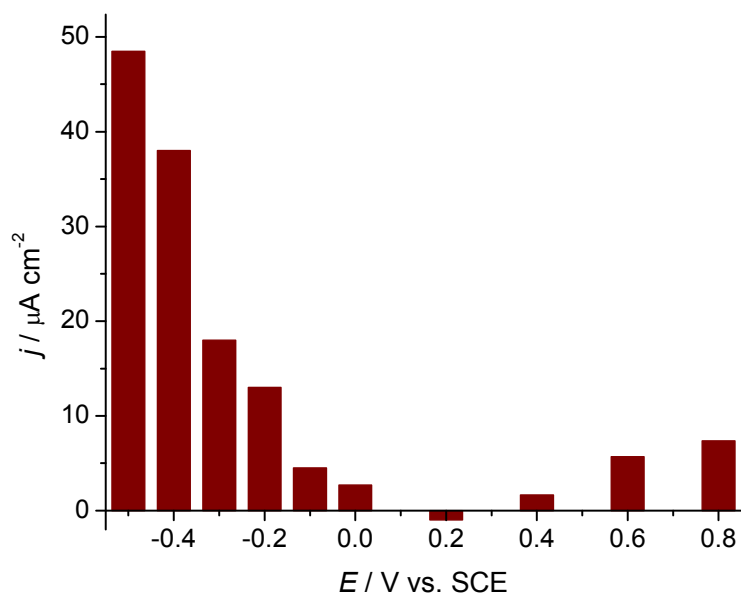


Figura 7.5 – Optimização do potencial de trabalho do biossensor CFE/MWCNT/AlcOX-BSA-GA na presença de 1 mM de etanol em solução tampão PBS 0,1 M pH 7,5.

Após esta optimização do biossensor sem MWCNT foram testadas as condições de operação do biossensor CFE/MWCNT/AlcOx em solução tampão PBS 0,1 M pH 7,5. A dependência da resposta de corrente em função do potencial aplicado para 1 mM de etanol foi investigada no intervalo de potenciais entre -0,5 V e +0,8 V vs SCE, e está representada na Figura 7.5.

Em toda a gama de potenciais estudada obtiveram-se intensidades de corrente mais elevadas neste biossensor do que no caso do biossensor sem MWCNT. Este facto pode também ser observado nos voltamogramas cíclicos da Figura 7.6 registados para os dois tipos de biossensores na presença de 6 mM de etanol em solução PBS 0,1 M pH 7,5. A potenciais negativos a corrente de redução no biossensor com MWCNT aumenta após a adição de etanol, embora não seja visível um pico bem definido no voltamograma cíclico, como o evidenciado no biossensor sem nanotubos de carbono.

Contudo, o biossensor com MWCNT apresenta uma resposta bem definida a -0,20 V, potencial menos negativo que o observado com o biossensor CFE onde a resposta para o etanol é iniciada apenas para o potencial de \sim -0,39 V.

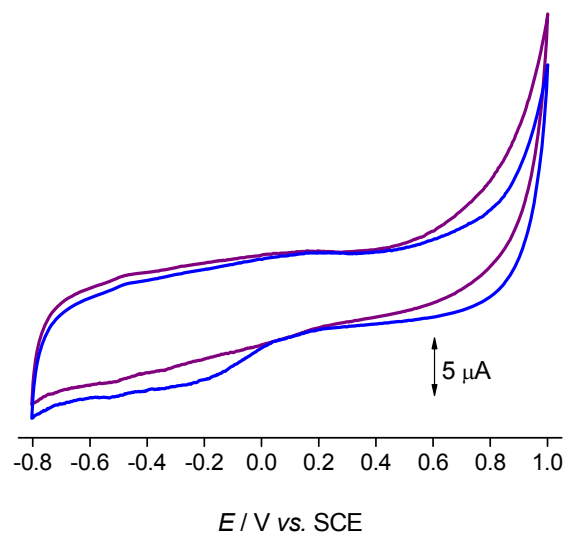
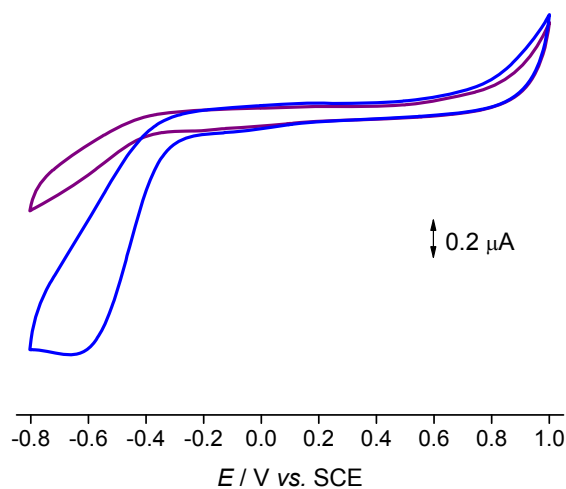


Figura 7.6 – Voltamogramas cíclicos do biossensor de CFE-AlcOx: (a) não modificado e (b) modificado com MWCNT em (—) solução tampão PBS 0,1 M pH 7,5 e (—) após a adição de 6 mM de etanol.

Apesar de nas determinações amperométricas na Figura 7.5 ter sido obtida uma maior resposta para o potencial aplicado de -0,45 V, devida em parte à própria reacção do FAD, foi decidido utilizar-se como potencial de trabalho -0,30 V, dado que a este potencial ainda ocorre uma boa resposta de corrente para o etanol, sendo também a corrente de base mais pequena. Este potencial foi também utilizado em [221] para o desenvolvimento de um

biossensor de etanol baseado em álcool oxidase tendo como suporte os eléctrodos de filme de carbono modificados com um mediador redox, poli(vermelho neutro).

7.3.2 Determinação de etanol por amperometria

O biossensor CFE/MWCNT/AlcOx foi utilizado para determinar etanol amperometricamente aplicando-se as condições experimentais optimizadas, ou seja, o potencial aplicado de -0,30 V vs. SCE em solução tampão PBS 0,1 M pH 7,5. Após a estabilização da corrente de base, e sempre com agitação da solução, foram adicionadas à solução de electrólito alíquotas de solução de etanol 0,1 M. A curva de calibração construída através da resposta típica do biossensor para adições sucessivas de etanol, está representada na Figura 7.7. A parte linear desta curva pode ser descrita através da equação:

$$\Delta j (\mu\text{A cm}^{-2}) = 1,88(\pm 0,77) + 44,5 (\pm 0,99) [\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}] (\text{mM}) \quad (7.10)$$

com um coeficiente de correlação de 0,998.

Os parâmetros enzimáticos resultantes da curva de calibração são: linearidade até 1,4 mM e limite de detecção de 86 μM . A constante aparente de Michaelis-Menten (K_M), determinada através do gráfico de Lineweaver-Burk foi de 2,2 mM. Os parâmetros

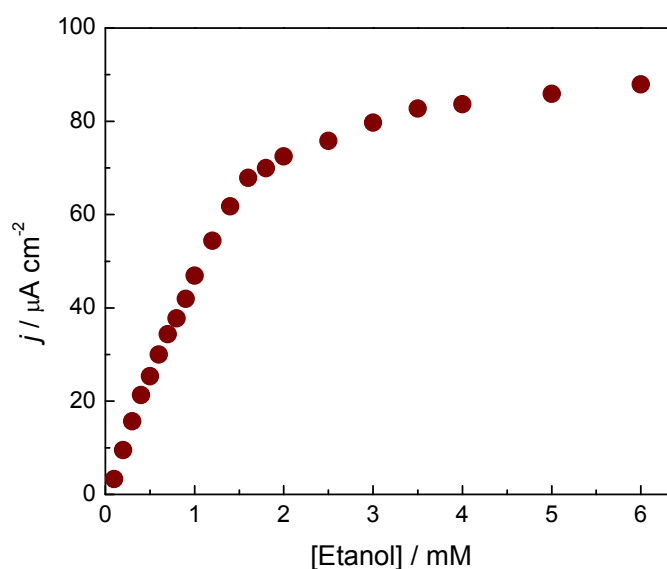


Figura 7.7 – Curva de calibração obtida com um biossensor CFE/MWCNT/AlcOx em PBS 0,1 M pH 7,5 a -0,30 V vs. SCE.

cinéticos obtidos com a mesma enzima e utilizando o substrato de filme de carbono modificado com um mediador redox, poli(vermelho) neutro sem MWCNT e utilizando as mesmas condições experimentais apresentou valores mais baixos do que os obtidos com o biossensor com MWCNT aqui descrito: gama linear até 0,6 mM e $K_M=2,1$ mM [221].

Os parâmetros cinéticos da enzima álcool oxidase dependem fortemente no métodos de imobilização, como afirmado em [385]: K_M aumenta de 1,5 mM, condição da enzima livre em solução, para 6,8 mM após a imobilização electroquímica em polipirrol. Para além dos métodos de imobilização, existe uma dependência crítica na cinética da álcool oxidase com a natureza da enzima, *i.e.*, com o organismo que produziu a enzima. Por exemplo, a constante aparente de Michaelis-Menten da AlcOx obtida de diferentes mutantes da levedura *Hansenula polymorpha* variam de 1,3 a 12,1 mM para o etanol [386].

O biossensor CFE/AlcOx não modificado com MWCNT apresentou os seguintes parâmetros cinéticos aplicando-se o potencial de -0,45 V (potencial óptimo para o biossensor não modificado de acordo com a Figura 7.3): linearidade até ~1,0 mM, limite de detecção de 37 μ M e uma sensibilidade de $2,23 \pm 0,05 \mu\text{A cm}^{-2} \text{mM}^{-1}$. A sensibilidade obtida com o biossensor baseado em MWCNT foi cerca de 20 vezes superior à do biossensor sem MWCNT, mesmo a um potencial menos negativo. Em comparação com o biossensor utilizando poli(vermelho neutro) como mediador [221] a sensibilidade obtida com o biossensor com MWCNT foi 50 vezes superior.

Estudos de reprodutibilidade com 3 biossensores com MWCNT preparados da mesma forma mostraram variações superiores a 30%, o que pode constituir uma grande limitação à utilização de biossensores com nanotubos de carbono preparados por colocação dos CNT sólidos na superfície dos eléctrodos. Todavia, se forem efectuadas calibrações individuais para cada sensor e as determinações de amostras desconhecidas forem efectuadas através do método de adição padrão, essas limitações podem, eventualmente, ser superadas.

7.3.3 Estabilidade operacional e selectividade do biossensor

A estabilidade do biossensor foi testada durante 3 semanas, registando-se uma curva de calibração diariamente. O biossensor foi mantido a 4 °C em solução tampão PBS sempre que não era utilizado. Durante este período de tempo, a sensibilidade decresceu em

Tabela 7.3 – Influência de vários compostos nas determinações de etanol com o biossensor CFE/MWCNT/AlcOx. Razão das concentrações 1:2 de etanol para o interferente.

| Interferente | Resposta relativa para o analito na presença dos interferentes / % |
|-----------------|--|
| Ácido acético | 100 |
| Ácido ascórbico | 131 |
| Ácido cítrico | 100 |
| Ácido láctico | 105 |
| Ácido málico | 100 |
| Ácido oxálico | 111 |
| Ácido tartárico | 107 |

cerca de 70% da inicial, estando de acordo com o decréscimo obtido com biossensores com o mediador redox poli(vermelho neutro) sem MWCNT [221]. O grau de estabilidade baixo da enzima álcool oxidase é bem conhecido [386], e o estudo aqui realizado e o apresentado em [221] representam um melhoramento a resultados anteriores no que diz respeito à estabilidade do biossensor.

A selectividade é outro parâmetro importante necessário investigar quando se desenvolve um biossensor. A resposta amperométrica relativa do biossensor CFE/MWCNT/AlcOx para etanol na presença de interferentes comuns em alimentos e bebidas está sumariada na Tabela 7.3. Todos os compostos testados estavam presentes numa concentração de 0,8 mM com uma concentração de etanol de 0,4 mM, e mostraram pequenas interferências na determinação de etanol, excepto no caso do ácido ascórbico onde ocorreu um aumento de 30% da resposta obtida. Considerando-se o vinho como amostra, esta interferência não constitui um problema, uma vez que a concentração de ascorbato no vinho é muito menor do que a de etanol.

7.4 Conclusões

Neste capítulo foi desenvolvido um biossensor para etanol utilizando os eléctrodos de filme de carbono modificados com nanotubos de carbono de paredes múltiplas.

Primeiramente, foi investigado o método de modificação dos eléctrodos com os nanotubos de carbono funcionalizados em ácido nítrico em eléctrodos de carbono vítreo e

nos de filme de carbono. Este passo revelou-se de extrema importância uma vez que devido à pequena dimensão dos eléctrodos de disco de filme de carbono, foi necessário colocar os nanotubos na superfície do eléctrodo sem recorrer ao uso de solventes. A optimização dos parâmetros de operacionalidade do biossensor com nanotubos de carbono foi levada a cabo com a enzima glucose oxidase, sendo as condições óptimas obtidas de aplicação do potencial $-0,15 \text{ V vs. SCE}$ em solução tampão PBS 7,0.

Após optimização da preparação dos eléctrodos foram utilizados MWCNT para desenvolver um biossensor para etanol com base na enzima álcool oxidase. As condições óptimas de trabalho foram semelhantes às obtidas para a glucose, no entanto o potencial aplicado foi de -0.30 V vs. SCE . Foram observados efeitos electrocatalíticos dos MWCNT em relação ao biossensor não modificado desenvolvido em filmes de carbono. Apesar de o limite de detecção para o etanol ser mais elevado no eléctrodo CFE/MWCNT/AlcOx, $86 \mu\text{M}$, comparado com o do biossensor CFE/AlcOx, $37 \mu\text{M}$, existe um aumento muito significativo da sensibilidade, cerca de 20 vezes superior, o que demonstra a aplicabilidade destes sensores.

CAPÍTULO 8

ELÉCTRODOS DE FILME DE CARBONO MODIFICADOS COM MEDIADORES REDOX EM BIOSSENSORES

A modificação de eléctrodos de filme de carbono de diferentes valores de resistência nominal com mediadores redox hexacianoferrato de cobre e poli(vermelho neutro) [13] é apresentada neste capítulo. O método de sol-gel é utilizado para a construção de biossensores de glucose, avaliando-se desta forma a possível aplicação destes eléctrodos no desenvolvimento de biossensores electroquímicos.

8.1 Introdução

Durante as últimas duas décadas o encapsulamento via sol-gel de substâncias bioactivas tem constituído um campo de investigação activo, particularmente para o desenvolvimento de biossensores [230,257,387-389]. Os compósitos orgânicos-inorgânicos baseados em sílica têm-se revelado como materiais atractivos dado que combinam num único sólido as propriedades de uma rede rígida de sílica tridimensional com a reactividade química particular dos componentes orgânicos [388,389]. Além disso, o pH, o tempo de gelificação, a transparência e a hidrofobicidade podem ser adaptados/controlados por forma a encapsular moléculas de proteínas como as enzimas [230,257,387].

O método de encapsulamento via sol-gel de enzimas ou proteínas tem sido aplicado no desenvolvimento de vários biossensores electroquímicos [184,187,257,390-397] e ópticos [398,399]. Os precursores de sol-gel mais utilizados são os tri- ou tetra-oxisilanos com componentes orgânicos simples, usualmente metiltrimetoxisilano (MTMOS) [237,252] e tetraetiloxisilano (TEOS) [250-254]. Outros grupos orgânicos mais complexos têm sido utilizados mas em menor escala, contudo os precursores 3-aminopropiltriétoxissilano (APTOS) [184,187,252,255] e 3-glicidoxipropiltrimetoxissilano (GOPMOS) foram introduzidos recentemente no desenvolvimento de biossensores num

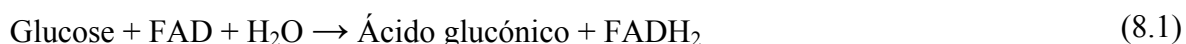
trabalho anterior [184,187]. Foram também utilizadas misturas de precursores de sol-gel para a preparação biossensores, por forma a alterar as propriedades hidrófobas e hidrofílicas, e a estrutura do nanoporo resultante do processo de sol-gel, tornando-o mais compatível para o encapsulamento de proteínas [257,400]. Essas misturas de precursores, particularmente aquelas que contêm cadeias orgânicas longas misturadas com cadeias curtas de oxissilanos, apresentam propriedades únicas que não são obtidas utilizando apenas um precursor [388].

Os eléctrodos utilizados como substratos no desenvolvimento de biossensores electroquímicos baseados no método de sol-gel são vários [257,388], no entanto, os mais usados ao longo dos últimos 20 anos são baseados em carbono, *p.e.*, grafite [394,401], carbono cerâmico[391,399] e grafite impressa [393].

O objectivo do trabalho apresentado neste capítulo é investigar a possível utilização dos eléctrodos de filme de carbono de resistência de 1,5, 15 e 140 Ω como substratos para o desenvolvimento de biossensores electroquímicos para glucose, modificando-se a superfície destes com hexacianoferrato de cobre e poli(vermelho neutro). Comparando-se com os resultados obtidos quando utilizados os eléctrodos de 2 Ω .

8.2 Deposição dos mediadores redox

Em biossensores electroquímicos enzimáticos utilizam-se muitas vezes mediadores redox. Estes são agentes que participam na reacção redox com o componente biológico actuando como intermediários na transferência de electrões, tornando-a mais fácil e rápida [402]. Durante a reacção catalítica, o mediador reage primeiro com a enzima reduzida e depois difunde para a superfície do eléctrodo onde ocorre uma transferência rápida de electrão. Por exemplo, na determinação de glucose através do biossensor com mediador e a enzima glucose oxidase,



onde FAD é o centro activo da enzima glucose oxidase. A taxa de produção do mediador reduzido (M_{red}) é medida amperométricamente pela oxidação no eléctrodo. Neste trabalho foram utilizados os mediadores hexacianoferrato de cobre (CuCHF) que foi depositado quimicamente nos eléctrodos, e o poli(vermelho neutro) preparado através da electropolimerizado a partir do monómero vermelho neutro. O procedimento está descrito no Capítulo experimental.

8.2.1 Hexacianoferrato de cobre

Os filmes de CuCHF foram preparados nos substratos de filme de carbono por adsorção química durante 50 minutos, e posteriormente secos com um jacto de ar quente durante 3 minutos. Após este processo, os eléctrodos foram guardados à temperatura ambiente para que estabilizassem. Observaram-se diferenças entre os eléctrodos sem e com mediador: o filme de CuCHF é menos brilhante e apresenta uma cor mais escura que os filmes de carbono.

De forma a investigar o comportamento electroquímico do mediador redox nos diferentes eléctrodos, registaram-se os voltamogramas cíclicos da Figura 8.1. Estes voltamogramas foram obtidos em KCl 0,1 M e PBS 0,1 M pH 7,0. Os voltamogramas mostram que o comportamento electroquímico depende do electrólito e do tipo de eléctrodo utilizados.

Em KCl 0,1 M, Figura 8.1(A), observam-se os picos reversíveis típicos do par redox Fe(II)/Fe(III), a +0,62 e +0,67 V vs. SCE, enquanto que os picos de Cu(I)/Cu(II), a \sim 0,5 V, menos intensos que os picos de Fe(II)/Fe(III), são dificilmente observados e encontram-se suprimidos. O comportamento dos filmes de CuCHF foi estudado detalhadamente em [185]. A corrente de pico mais elevada foi obtida nos eléctrodos de 15 Ω de resistência nominal. Os eléctrodos de 1,5 Ω apresentaram correntes um pouco mais baixas que as dos de 15 Ω , enquanto que nas resistências de maior valor, 140 Ω , não foi detectada a presença do filme de CuCHF.

Os mesmos eléctrodos foram utilizados para o estudo por voltametria cíclica em PBS 0,1 M pH 7,0, da Figura 8.1(B). É notória a diferença entre estes voltamogramas e os da Figura 8.1(A). No caso dos voltamogramas da Figura 8.1(B), os picos de redução são mais pequenos que os de oxidação e a separação entre picos varia significativamente entre

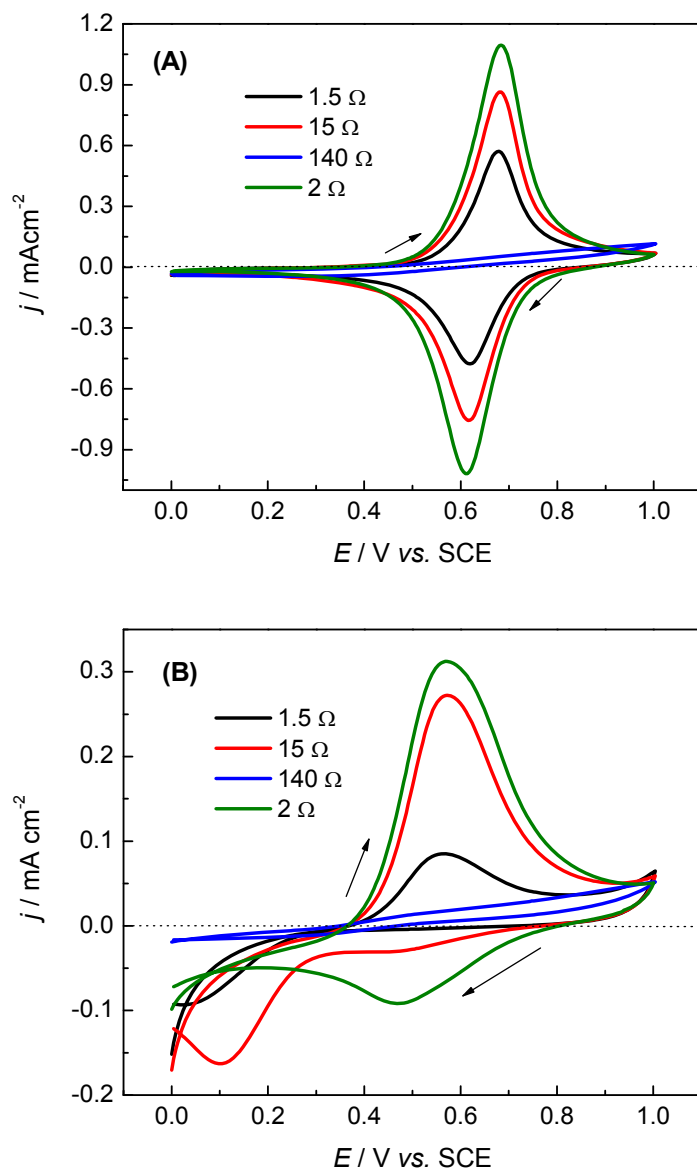


Figura 8.1 – Voltamogramas cíclicos em (A) KCl 0,1 M e (B) PBS 0,1 M pH 7,0 de filmes de CuHCF depositados quimicamente sobre eléctrodos de filme de carbono. Velocidade de varrimento: 50 mV s^{-1} .

os diferentes eléctrodos de filme de carbono, particularmente quando comparados com os eléctrodos de 2 Ω . Em [185] foi observado que o comportamento electroquímico dos filmes de CuCHF em PBS depende da janela de potencial utilizada sendo que no limite de potencial positivo de +0,8 V vs. SCE, os picos obtidos em PBS são melhor definidos mas mais amplos do que em KCl. Contudo, quando aplicado este limite de potencial positivo (+0,8 V) não foram observadas quaisquer alterações no comportamento electroquímico dos eléctrodos de resistências 1,5 Ω e 15 Ω .

Os eléctrodos de 140 Ω não apresentaram quaisquer picos relacionados com o filme de CuHCF nas duas soluções de electrólito utilizadas para registar os voltamogramas cíclicos, mostrando que estes eléctrodos não poderão ser utilizados como suporte do mediador CuHCF. As diferenças observadas nos voltamogramas cíclicos em diferentes soluções de electrólitos dependem quer do pH da solução quer do próprio electrólito, como descrito em [185]. As semelhanças no comportamento electroquímico do CuHCF depositado nas resistências de 1,5 e 15 Ω podem ser explicadas pela estrutura do filme de carbono. Os dados de Raman confocal e de difracção de raios-X mostram que os filmes de carbono de 1,5, 2, 15, e 140 Ω têm uma estrutura grafítica com ligações sp^2 . No entanto, os perfis de difracção de raios-X obtidos para as resistências de 1,5 e 15 Ω foram idênticos, excepto a linha de difracção a $\sim 31^\circ$ para 2θ , mais intensa para a resistência de 15 Ω [11]. As diferenças observadas no comportamento dos vários eléctrodos podem também ser atribuídas às diferenças na morfologia dos filmes de carbono, ainda que em menor escala, bem como a diferentes capacidades destes em adsorver o CuHCF.

8.2.2 Poli(vermelho neutro)

Os filmes de poli(vermelho neutro) foram electrodepositados a partir de 1 mM do monómero de vermelho neutro numa solução tampão fosfato com 0,1 M de KNO_3 de pH 5,5, sendo que o KNO_3 actua como catalisador e como electrólito [211,403]. O filme de PNR mostrou ser mais escuro e menos brilhante que os filmes de carbono, sendo também mais uniforme e liso que os filmes de CuHCF.

Os voltamogramas cíclicos da polimerização do vermelho neutro nos diferentes eléctrodos de filme de carbono são mostrados na Figura 8.2. Da mesma forma que

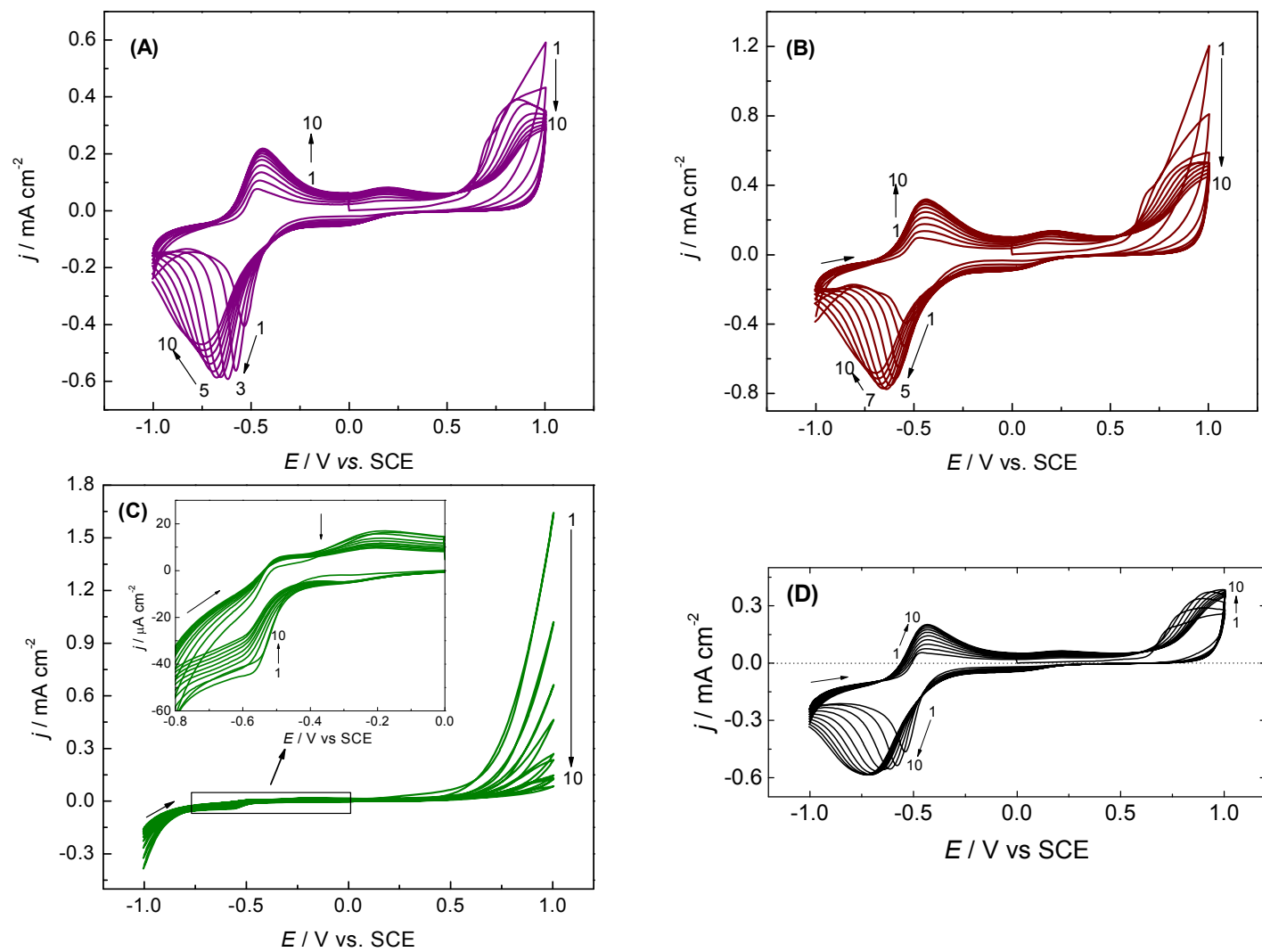


Figura 8.2 – Polimerização do vermelho neutro em CFE de resistência (A) $1,5 \Omega$, (B) 15Ω , (C) 140Ω e (D) 2Ω .

anteriormente com os filmes de CuHCF, ocorrem diferenças ligeiras no comportamento electroquímico entre os vários eléctrodos. Em todos os casos, os voltamogramas apresentam os picos característicos de dois pares redox e um pico de oxidação irreversível ao mesmo potencial em todos os eléctrodos. O primeiro pico de oxidação *quasi*-irreversível a $-0,45\text{ V vs. SCE}$ é atribuído à sobreposição das oxidações do monómero e do polímero enquanto que a segunda onda irreversível a $+0,2\text{ V}$ está relacionada com a dopagem do filme de PNR. A última onda de oxidação a $+0,8\text{ V vs. SCE}$ é devida à oxidação irreversível do monómero, resultando num radical catião de carga $+1$ que inicia a polimerização [6,210,220,403].

O pico de oxidação aumenta com o número de varrimentos de potencial, enquanto que o pico de redução aumenta apenas até ao terceiro-quinto ciclo, a partir destes desloca-se para um potencial mais negativo, com um decréscimo de intensidade de pico devido a algumas modificações na superfície após a formação do polímero [6,403]. Contudo, a área do pico aumenta com o número de ciclos, o que indica que ocorre crescimento do filme de PNR. O aumento no pico de redução varia com o tipo de eléctrodo: nos eléctrodos de $1,5\ \Omega$ e $15\ \Omega$ ocorre uma diminuição no pico de redução até ao terceiro e quinto ciclos, respectivamente, Figura 8.2(A) e (B); no caso dos eléctrodos de $2\ \Omega$ o pico aumenta consideravelmente em altura até ao quarto ciclo, a partir do qual o aumento é negligenciável ficando apenas mais largo.

A onda de oxidação do monómero desloca-se para potenciais mais positivos e a corrente diminui com o número de ciclos nos eléctrodos de resistências $1,5\ \Omega$ e $15\ \Omega$, de forma semelhante ao que ocorre em eléctrodos de carbono vítreo [210,403], tendo-se verificado que o potencial de oxidação do monómero em eléctrodos de carbono vítreo varia com o pH da solução [6]. A mesma tendência de deslocamento do potencial ocorre nos eléctrodos de filme de carbono de $2\ \Omega$, mas com um aumento da intensidade de corrente com o número de ciclos.

No caso dos eléctrodos de $140\ \Omega$ o comportamento electroquímico é totalmente diferente, como o que ocorreu no estudo dos filmes de CuHCF. Os picos redox são muito mais pequenos quando comparados com os obtidos com outros eléctrodos e não aumenta com o número de ciclos, como pode ser visto na Figura 8.2(C). O pico de oxidação

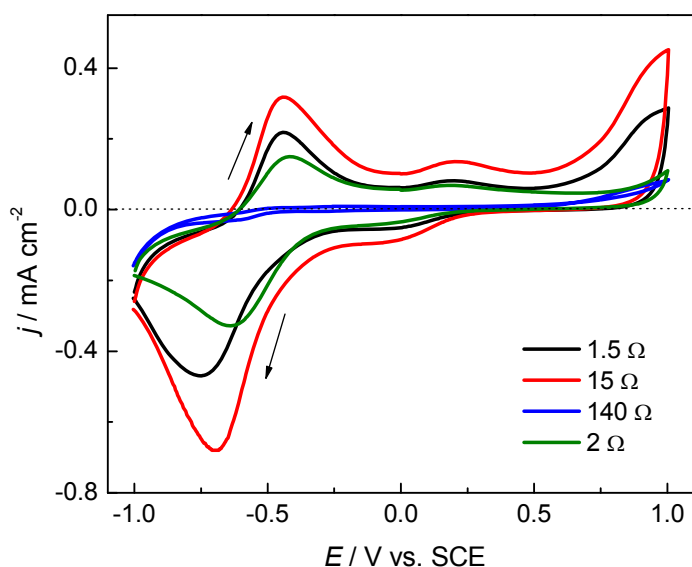


Figura 8.3 – Voltamogramas cíclicos dos filmes de PNR depositados em diferentes eléctrodos de filme de carbono. Electrólito de suporte PBS 0,1 M pH 7,0. Velocidade de varrimento 50 mV s^{-1} .

permanece constante enquanto que o pico de redução diminuí com o número de varrimentos. Não se observa a oxidação do monómero – a corrente faradaica decresce com o número de ciclos de uma forma semelhante verificado na polimerização do PNR em líquidos iónicos [222]. Todos estes factos indicam que o filme de PNR não se forma nas resistências de 140Ω , tal como aconteceu com os filmes de CuHCF. Desta forma, os eléctrodos de resistência 140Ω não podem ser utilizados como eléctrodos suporte no desenvolvimento de sensores e biossensores, como tinha sido previsto aquando da caracterização electroquímica apresentada nos Capítulos 4 e 5 desta dissertação.

Os filmes de PNR depositados nos eléctrodos de filme de carbono foram caracterizados por voltametria cíclica em tampão PBS 0,1 M pH 5,5. Os voltamogramas obtidos estão representados na Figura 8.3. A intensidade do pico de corrente observado para o vermelho neutro/leuco-(vermelho neutro) pode ser descrita através da sequência: $15 \Omega > 1,5 \Omega > 2 \Omega \geq 140 \Omega$. Esta sequência reflecte novamente as diferenças na morfologia e estrutura das superfícies [11], pelo que os eléctrodos de 15Ω poderão ser os

mais indicados para a electropolimerização do vermelho neutro, onde o filme de PNR apresenta as melhores características electroquímicas.

8.3 Biossensores baseados em sol-gel

8.3.1 Preparação

Os biossensores de sol-gel foram preparados conforme descrito no Capítulo 3, de acordo com o protocolo descrito em [187], utilizando uma mistura de dois precursores de sol-gel, GOPMOS e MTMOS, sem adição de álcool. Esta mistura foi empregue por forma a controlar o tamanho dos poros na matriz de sol-gel. Foi mostrado em [187] que o sol-gel preparado a partir de GOPMOS apresenta um número considerável de nanoporos de dimensão até 50 nm [187,404], enquanto que o sol-gel preparado através do MTMOS apresenta poucos poros mas de maiores dimensões, fazendo com que a enzima não seja retida na sua estrutura. Seria de esperar que a mistura destes dois precursores originasse poros mais pequenos e em maior número. A observação em microscópio óptico mostrou que o sol-gel não forma uma camada uniforme na superfície dos eléctrodos, uma vez que foi utilizada a técnica de revestimento por imersão.

Os eléctrodos utilizados para o desenvolvimento de biossensores de glucose baseados em sol-gel e mediadores redox foram apenas os de resistências 1,5 e 15 Ω , uma vez que já se demonstrou que os de 140 Ω não apresentam as características electroquímicas necessárias para o desenvolvimento de sensores e biossensores. Na Figura 8.4 mostram-se os voltamogramas cíclicos representativos de um eléctrodo de 1,5 Ω onde foi depositado um filme de PNR sem e com modificação sol-gel. Nos biossensores baseados em sol-gel com os mediadores redox CuHCF e PNR em eléctrodos de filme de carbono de 2 Ω foram estudados em [184,187,225,403], observam-se as mesmas tendências aqui obtidas para os eléctrodos de 1,5 e 15 Ω , *i.e.*, decréscimo de corrente correspondente ao par redox PNR devido à membrana de sol-gel.

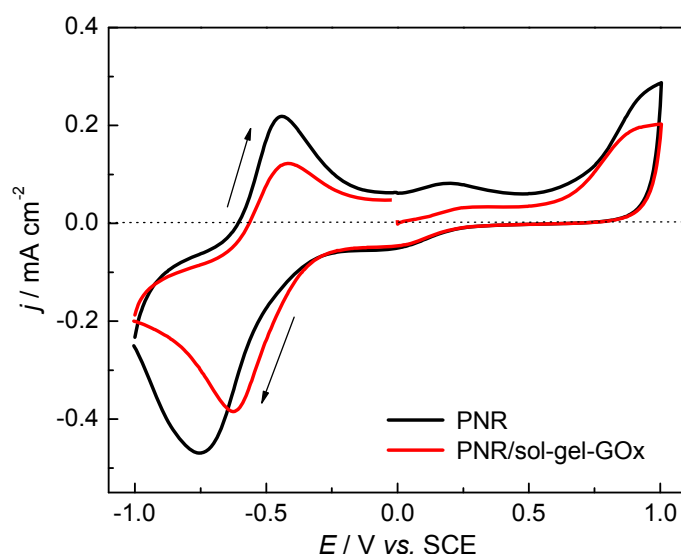


Figura 8.4 – Voltamogramas cíclicos de eléctrodos de filme de carbono de $1,5 \Omega$ modificados com (—) PNR e (—) PNR/sol-gel-GOx. Electrólito de suporte PBS 0,1 M pH 7,0. Velocidade de varrimento 50 mV s^{-1} .

8.3.2 Resposta do biossensor para a glucose

Pauliukaite *et al.* [185] verificou que a resposta para a glucose dos eléctrodos modificados com CuHCF-sol-gel-GOx apresentava uma sensibilidade demasiado pequena para que estes biossensores possam ser aplicados na determinação de glucose com resultados reprodutíveis e com boa sensibilidade. Por este motivo, foram apenas desenvolvidos neste trabalho [13] biossensores baseados em eléctrodos modificados com o mediador PNR. O esquema da Figura 8.5 mostra o funcionamento de um biossensor electroquímico de glucose com o mediador PNR.

A determinação de glucose foi efectuada através de amperometria pelo método de adição padrão, aplicando-se o potencial de $-0,35 \text{ V vs. SCE}$. As curvas de calibração obtidas com os eléctrodos de $1,5 \Omega$, 15Ω e 2Ω estão representadas na Figura 8.6. Pode observar-se que a resposta para a determinação de glucose com os eléctrodos de 15Ω é muito mais elevada que nos outros eléctrodos, sendo ainda que as respostas obtidas com os eléctrodos de filme de carbono de resistência $1,5 \Omega$ e 2Ω são bastante semelhantes nas mesmas condições de trabalho.

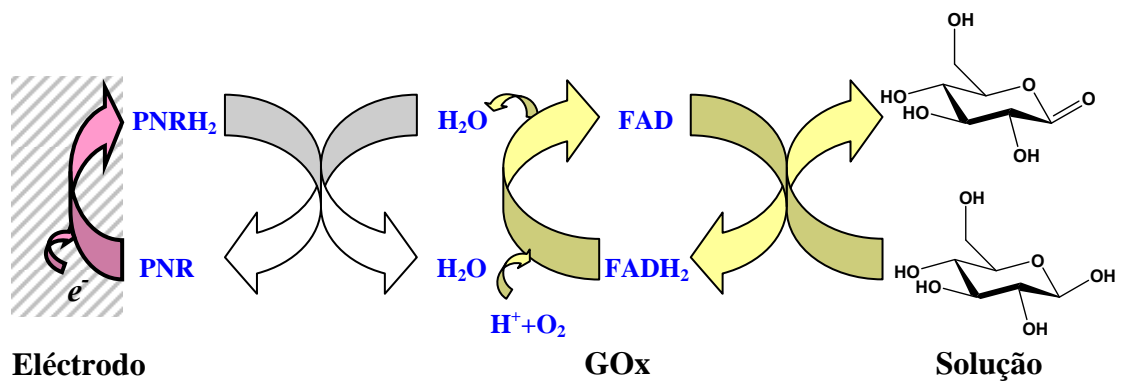


Figura 8.5 – Esquema de funcionamento de um biossensor com PNR para a redução do peróxido de hidrogénio.

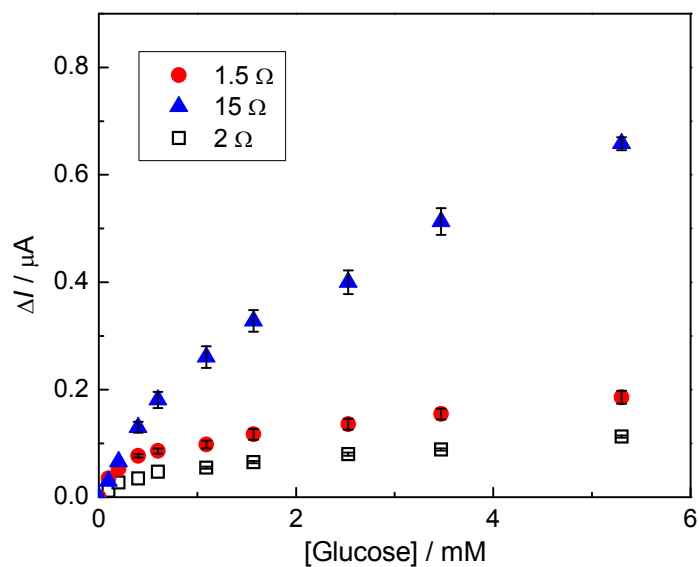


Figura 8.6 – Curvas de calibração obtidas em PBS 0,1 M pH 7,0 com eléctrodos de filme de carbono de diferentes resistências nominais modificados com PNR/sol-gel-GOx. Potencial aplicado -0,35 V vs. SCE. As barras indicam o erro para 3 ensaios.

Tabela 8.1 – Parâmetros calculados das curvas de calibração ($N=3$) de diferentes eléctrodos de filme de carbono modificados com PNR/sol-gel-GOx.

| Res. Nominal / Ω | Gama linear / mM | Limite de detecção / μM | Sensibilidade / nA mM^{-1} | K_M / mM |
|----------------------------|---------------------|---------------------------------------|--|---------------|
| 1,5 | 0,05 – 0,40 | 14,3 | $181,5 \pm 6,4$ | 2,2 |
| 15 | 0,05 – 1,60 | 15,2 | $208,2 \pm 7,3$ | 4,3 |
| 2 | 0,05 – 0,60 | 21,1 | $74,7 \pm 2,8$ | 1,4 |

O desvio padrão entre eléctrodos com a mesma resistência foi similar em todos os casos, variando entre 3,5% e 3,8% para os eléctrodos de 1,5 Ω e 2 Ω , respectivamente. Os dados calculados através das curvas de calibração da Figura 8.6 estão sumariados na Tabela 8.1. Apesar dos eléctrodos de 15 Ω apresentarem a maior resposta linear, até a uma concentração de 1,6 mM de glucose, bem como a maior sensibilidade, $208,2 \pm 7,3 \text{ nA mM}^{-1}$ ($N=3$) para a determinação de glucose, foi com os eléctrodos de 1,5 Ω que se obteve o menor limite de detecção, 14,3 μM (que corresponde a uma razão sinal/ruído = 3). A sensibilidade obtida com os eléctrodos de 2 Ω foi a mais baixa. No entanto biossensores de glucose preparados através da técnica de sol-gel e nestes eléctrodos de 2 Ω mostraram-se estáveis por pelo menos um mês, efectuando uma curva de calibração diariamente, sendo a estabilidade de longa duração, 4-5 meses, mantendo o biossensor a 4 °C em solução PBS 0,1 M pH 7,0. O valor mais elevado da constante de Michaelis-Menten, calculada através dos gráficos de Lineweaver-Burk, foi obtido no biossensor desenvolvido em eléctrodos de 15 Ω .

Os biossensores preparados através das resistências de 1,5 Ω e 15 Ω apresentaram menor estabilidade e uma cinética mais lenta que os preparados com as resistências de 2 Ω . Nestes eléctrodos (1,5 e 15 Ω) o sinal de corrente resposta para a glucose decresceu a partir do primeiro dia de uso. Pode-se, deste modo, concluir que devido às diferenças na morfologia da superfície dos eléctrodos, o mediador poli(vermelho neutro) e a membrana de sol-gel com a enzima encapsulada se encontram menos ligados à superfície destes eléctrodos comparando com os eléctrodos de 2 Ω .

8.4 Conclusões

Foram investigados três tipos de eléctrodos de filme de carbono, de resistências 1,5, 15 e 140 Ω com vista à sua aplicação como suporte para biossensores baseados em sol-gel. Os resultados foram comparados com os biossensores preparados através de eléctrodos de filme de carbono de resistência 2 Ω . Utilizaram-se dois mediadores redox, hexacianoferrato de cobre e poli(vermelho neutro), que foram depositados nos filmes de carbono através de deposição química e de electrodeposição, respectivamente. Os filmes de PNR depositados nos eléctrodos de 1,5 e 15 Ω mostraram boas características electroquímicas, sendo as melhores obtidas nos eléctrodos de 15 Ω . Não foi possível depositar o mediador redox nos eléctrodos de 140 Ω , pelo que estas resistências não podem ser utilizadas como suporte para o desenvolvimento de biossensores electroquímicos com mediador.

A enzima glucose oxidase foi imobilizada por encapsulamento numa matriz de sol-gel. O sol-gel foi preparado através da mistura de dois precursores, GOPMOS e MTMOS, numa razão de volume de 2:1. As melhores propriedades electroquímicas bem como a melhor resposta para a glucose foram obtidas com o biossensor preparado nos eléctrodos de filme de carbono de resistência 15 Ω . Contudo, a estabilidade do biossensor em condições idênticas não foi tão boa como a apresentada com os biossensores preparados nos eléctrodos de 2 Ω . Os biossensores de glucose preparados em eléctrodos de 1,5 Ω e 2 Ω mostraram características semelhantes, enquanto que os de 15 Ω apresentaram excelente resposta amperométrica para a glucose.

CONCLUSÕES

Esta dissertação teve como principal objectivo a caracterização por diversas técnicas electroquímicas e de análise de superfícies de eléctrodos de filme de carbono preparados a partir de resistências de filme de carbono de valores nominais compreendidos entre 1,5 Ω e 2,0 k Ω com vista à sua aplicação no desenvolvimento de sensores e biossensores electroquímicos. O comportamento electroquímico antes e após a aplicação de pré-tratamento electroquímico foi investigado através de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância electroquímica em solução tampão acetato e fosfato. No que diz respeito às técnicas de análise de superfície utilizaram-se as microscopias de força atómica e de Raman confocal.

Os eléctrodos de filme de carbono preparados a partir de resistências de 2 Ω foram caracterizados em solução tampão acetato antes e após a aplicação de um pré-tratamento electroquímico, que consistiu no varrimento cíclico em ácido perclórico. O pré-tratamento conduziu a modificações na superfície do eléctrodo, aumentando o intervalo de potencial útil e a diminuição das correntes residuais. Caracterizaram-se electroquimicamente eléctrodos de resistências nominais de 1,5 Ω , 15 Ω e 140 Ω e 2,0 k Ω em diversas soluções de electrólito suporte por voltametria cíclica e EIS. Foi estudada a influência do pré-tratamento electroquímico na janela de potencial e na cinética da reacção de oxidação de Fe(II)/Fe(III). Neste caso, o pré-tratamento utilizado consistiu na aplicação de um potencial fixo +0,9 V *vs.* ECS durante 4 minutos. Após este período de tempo, observou-se que, excepto para as resistências de valor mais elevado, a janela de potencial e as correntes residuais permaneciam inalteradas. Observaram-se ainda algumas diferenças consoante a solução de electrólito utilizada, existindo um aumento mais significativo no intervalo de potencial para a solução tampão fosfato salino nos eléctrodos após o pré-tratamento electroquímico.

A cinética do sistema $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ foi estudada para todas as resistências antes e após o pré-tratamento, excepto para as de 2,0 k Ω . Nos voltamogramas registados para os eléctrodos de 1,5 Ω não sujeitos ao pré-tratamento electroquímico os picos de oxidação e de redução não se encontram tão bem definidos como os obtidos com os eléctrodos com pré-tratamento. Nos eléctrodos de 15 Ω sem pré-tratamento os voltamogramas são semelhantes aos obtidos com resistências de 1,5 Ω sem pré-tratamento. As resistências de 140 Ω mesmo com pré-tratamento não apresentaram qualquer resposta à espécie electroactiva nos voltamogramas. Os eléctrodos com pré-tratamento electroquímico foram caracterizados por EIS nas duas soluções de electrólito observaram-se, de um modo geral, maiores magnitudes de impedância na solução tampão de fosfato salino.

As imagens de microscopia de força atómica das resistências de filme de carbono mostraram que com o aumento da resistência eléctrica, o filme de carbono é menos uniforme, tendo-se atribuído o comportamento electroquímico obtido anteriormente, às diferenças existentes na uniformidade dos filmes. As resistências com as melhores características electroquímicas (resistências de 1,5 Ω e de 15 Ω) apresentam nas imagens de AFM menos irregularidades, sendo o filme de carbono mais uniforme e mais compacto. Foram efectuados estudos de Raman confocal e os espectros obtidos revelaram uma banda G a $\sim 1594 \text{ cm}^{-1}$ e uma D a $\sim 1345 \text{ cm}^{-1}$ de acordo com uma estrutura grafítica dos filmes de carbono, confirmada por estudos de difracção de raios-X.

As resistências de filme de carbono de 2 Ω foram investigadas como substrato para modificações com filmes de Nafion no desenvolvimento de sensores electroquímicos de metais pesados em amostras naturais. As propriedades interfaciais deste eléctrodo modificado foram estudadas por voltametria cíclica, EIS, AFM e Raman confocal. A sua aplicação analítica na determinação de iões cádmio e chumbo através da técnica de voltametria de redissolução anódica foi empregue com sucesso. A microscopia de AFM revelou uma menor rugosidade para aos eléctrodos modificados com Nafion, e a análise dos espectros de Raman confocal mostraram a existência de uma estrutura grafítica. Desta análise concluiu-se que o Nafion não altera o perfil espectroscópico de Raman do filme de carbono. As experiências de voltametria cíclica mostraram que a janela de potencial e as correntes residuais não foram alteradas pela presença do filme de Nafion, sendo detectadas alterações através de EIS.

O efeito da presença de um agente tensoactivo Triton X-100 em solução na determinação de metais pesados foi também investigado através das técnicas de EIS e de voltametria de redissolução anódica. Os espectros de impedância revelaram que a presença deste em concentrações inferiores à concentração crítica micelar influencia temporariamente a região interfacial do eléctrodo, sendo a superfície inicial restabelecida após a remoção deste tensoactivo. No caso de concentrações superiores, a limpeza electroquímica da membrana de Nafion não é tão eficaz, conduzindo a modificações permanentes na estrutura do filme.

As resistências de filme de carbono de 2Ω foram também investigadas como substrato para a electrodeposição de filmes de bismuto. A electrodeposição do filme de bismuto foi levada a cabo através da aplicação de potencial constante de duas formas: *ex-situ* e *in-situ*. A electrodeposição *ex situ* revelou ser a mais útil, com maior sensibilidade e reprodutibilidade, para a determinação de zinco através de ASV. A electrodeposição *in situ* foi utilizada para determinação de cádmio e chumbo.

Foi também investigada a influência do tensoactivo Triton X-100 na determinação destes metais pesados através de ASV e de EIS com os eléctrodos modificados com filmes de bismuto. A presença de pequenas concentrações de Triton promoveu um decréscimo superior a 50% do sinal de ASV para todos os iões.

De forma a impedir a adsorção no eléctrodo de espécies químicas, os filmes de bismuto foram também modificados com um filme de Nafion. Estes eléctrodos modificados foram analisados através de voltametria cíclica e EIS e utilizados na determinação de Zn, Cd e Pb por ASV. As experiências de voltametria cíclica mostraram que a janela de potencial e as correntes residuais foram ligeiramente alteradas pela presença do filme de Nafion. O pequeno aumento no potencial útil na região dos potenciais negativos e menores correntes residuais foram atribuídos às características do Nafion, que promoveu maior eficiência na electrodeposição do filme de bismuto e contribuiu para a sua estabilização física. A mesma tendência foi observada para as duas formas de deposição dos filmes de bismuto.

A técnica de EIS permitiu verificar as alterações sofridas no eléctrodo de filme de carbono coberto com Nafion após a modificação com o filme de bismuto, bem como após a deposição de Cd e Pb na ausência e na presença de Triton X-100. A conclusão mais

importante destes estudos está relacionada com a resistência à transferência de carga obtida para os eléctrodos de filme de bismuto modificados com Nafion na presença dos iões Cd(II) e Pb(II), valor significativamente mais baixo que o obtido para a mesma solução em eléctrodos de filme de carbono modificados com Nafion. Este comportamento sugere que o eléctrodo de Bi modificado com Nafion é mais útil para a electroanálise de Cd e Pb que o eléctrodo de filme de carbono modificado com Nafion.

Foram desenvolvidos biossensores para glucose e etanol baseados em eléctrodos de filmes de carbono, de resistência de 2Ω , modificados com nanotubos de carbono de paredes múltiplas. Os MWCNT funcionalizados foram colocados directamente sem solventes na superfície dos filmes de carbono. As enzimas glucose oxidase e álcool oxidase foram imobilizadas por reticulação com glutaraldeído e albumina sérica bovina. As condições óptimas de utilização do biossensor para glucose no modo amperométrico foram a aplicação de um potencial de $-0,45 \text{ V vs. SCE}$ em solução tampão fosfato salino pH 7,0.

No caso do biossensor para etanol, as condições óptimas de operação corresponderam à aplicação de $-0,30 \text{ V vs. SCE}$ numa solução tampão fosfato salino pH 7,5. Observaram-se os efeitos electrocatalíticos atribuídos à presença dos MWCNT. Embora o limite de detecção seja superior ($\text{LOD} = 86 \mu\text{M}$) no biossensor filme de carbono/MWCNT/AlcOx comparado com o biossensor baseado em filmes de carbono não modificados com MWCNT ($\text{LOD} = 37 \mu\text{M}$), obteve-se uma sensibilidade 20 vezes superior no biossensor com MWCNT. Estudos de estabilidade demonstraram que a resposta do biossensor decresce em 70 % do seu valor inicial após 3 semanas de utilização.

As resistências de filme de carbono de resistência nominal 1,5, 15 e 140Ω foram aplicadas no desenvolvimento de biossensores de glucose com os mediadores redox hexacianoferrato de cobre e poli(vermelho neutro). Verificou-se que apenas o PNR apresentou boas características electroquímicas após deposição. As melhores propriedades electroquímicas deste mediador foram obtidas quando foram utilizadas as resistências de 15Ω , não tendo sido possível depositar qualquer filme nos eléctrodos de 140Ω . Nos eléctrodos de 1,5 e 15Ω foram desenvolvidos biossensores para glucose. A enzima glucose oxidase foi imobilizada utilizando-se o método de encapsulamento por sol-gel, preparado por mistura de dois precursores GOPMOS e MTMOS optimizada em resistências de 2Ω . As melhores propriedades electroquímicas bem como a resposta à glucose foram obtidas

com o biossensor preparado com resistências de 15 Ω . O comportamento dos biossensores preparados nas resistências de 1,5 e 2 Ω foram semelhantes, obtendo-se, no entanto, uma melhor estabilidade do biossensor para as resistências de 2 Ω .

Os eléctrodos de resistência de filme de carbono de baixa resistência nominal constituem uma boa escolha relativamente a outros materiais de eléctrodo, apresentando após um pré-tratamento electroquímico excelentes características para a sua aplicação no desenvolvimento de sensores e biossensores. Estes eléctrodos podem ser empregues na forma de disco ou cilindro, aumentando o número de possibilidades consoante a área de eléctrodo possível para o ensaio. O seu baixo custo aliado à fácil preparação e propriedades electroquímicas semelhantes às do carbono vítreo permitem a sua utilização como material de eléctrodo mais acessível economicamente nas mesmas aplicações.

A sensibilidade, limite de detecção e menor influência de interferentes podem ser controlados por modificação dos eléctrodos, pelo que outras modificações poderão ser testadas por forma a melhorar estas características em determinações de diversos analitos em amostras naturais. Por exemplo, utilização de misturas de filmes de poliméricos de Nafion e polivinilsulfamida, bem como a modificação por polímeros condutores e outros mediadores redox.

Outros eléctrodos de filme de carbono estão a ser estudados como é o caso de filmes de carbono depositados por pulverização catódica sobre cristais de quartzo, com vista a sua utilização na microbalança electroquímica de cristal de quartzo. Estes cristais modificados estão a revelar-se com uma alternativa promissora aos outros cristais não modificados utilizados na microbalança. A sua larga janela de potencial permite o estudo dos processos que ocorrem em sensores e biossensores, promovendo deste modo um melhor entendimento sobre o mecanismo e cinética das reacções químicas e bioquímicas durante as análises. Este tipo de eléctrodo ainda não está disponível comercialmente, pelo que a optimização do processo de fabrico é uma área de grande importância.

Outros materiais de carbono nanoestruturados poderão vir a ser empregues no desenvolvimento de sensores e biossensores electroquímicos preparados pela metodologia de camada-por-camada avaliando-se as suas propriedades e possibilidade de miniaturização para detecção de espécies relevantes em amostras naturais.

BIBLIOGRAFIA

- [1] C.M.A. Brett, A.M. Oliveira-Brett, *Electrochemistry: Principles, Methods and Applications*, Oxford University Press, Oxford, 1993.
- [2] N.Y. Stozhko, N.A. Malakhova, M.V. Fyodorov, K.Z. Brainina, *J. Solid State Electrochem.* 12 (2008) 1185.
- [3] B. Uslu, S.A. Ozkan, *Anal. Lett.* 40 (2007) 817.
- [4] C. Gouveia-Caridade, C.M.A. Brett, *Curr. Anal. Chem.* 4 (2008) 206.
- [5] J. Wang, *Electroanalysis* 17 (2005) 1341.
- [6] R. Pauliukaite, C.M.A. Brett, *Electroanalysis* 20 (2008) 1275.
- [7] C. Gouveia-Caridade, C.M.A. Brett, *Electroanalysis* 17 (2005) 549.
- [8] C. Gouveia-Caridade, C.M.A. Brett, *J. Electroanal. Chem.* 592 (2006) 113.
- [9] C. Gouveia-Caridade, C.M.A. Brett, H.D. Liess, *Mater. Sci. Forum* 514-516 (2006) 1313.
- [10] C. Gouveia-Caridade, R. Pauliukaite, C.M.A. Brett, *Electroanalysis* 18 (2006) 854.
- [11] C. Gouveia-Caridade, D.M. Soares, H.-D. Liess, C.M.A. Brett, *Appl. Surf. Sci.* 254 (2008) 6380.
- [12] C. Gouveia-Caridade, R. Pauliukaite, C.M.A. Brett, *Electrochim. Acta* 53 (2008) 6732.
- [13] R. Pauliukaite, C. Gouveia-Caridade, C.M.A. Brett, *J. Appl. Polym. Sci.* (2008) submetido para publicação.
- [14] N.Y. Stozhko, N.A. Malakhova, M.V. Fyodorov, K.Z. Brainina, *J. Solid State Electrochem.* 12 (2008) 1219.
- [15] O. Niwa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 78 (2005) 555.
- [16] H.W. Kroto, J.R. Heath, S.C. O'Brien, R.F. Curl, R.E. Smalley, *Nature* 318 (1985) 162.
- [17] A.V. Rode, E.G. Gamaly, B. Luther-Davies, *Appl. Phys. A* 70 (2000) 135.
- [18] A.G. Nasibulin, P.V. Pikhitsa, H. Jiang, D.P. Brown, A.V. Krashenninikov, A.S. Anisimov, P. Queipo, A. Moisala, D. Gonzalez, G. Lientschnig, A. Hassanien, S.D. Shandakov, G. Lolli, D.E. Resasco, M. Choi, D. Tomanek, E.I. Kauppinen, *Nat. Nanotechnol.* 2 (2007) 156.
- [19] N. Dubrovinskaia, L. Dubrovinsky, W. Crichton, F. Langenhorst, A. Richter, *Appl. Phys. Lett.* 87 (2005) 083106.
- [20] R.L. McCreery, *Chem. Rev.* 108 (2008) 2646.
- [21] V.V. Pokropivny, V.L. Bekenev, *Fuller. Nanotub. Carbon Nanostruct.* 13 (2005) 415.

- [22] M. Monthieux, V.L. Kuznetsov, *Carbon* 44 (2006) 1621.
- [23] G.L. Miessler, D.A. Tarr, *Inorganic Chemistry*, Pearson Education International, New Jersey, 2004.
- [24] A.V. Rode, S.T. Hyde, E.G. Gamaly, R.G. Elliman, D.R. McKenzie, S. Bulcock, *Appl. Phys. A* 69 (1999) S755.
- [25] R. Doremus, *Glass Science*, John Wiley & Sons, New York, 1973.
- [26] H.O. Pierson, *Handbook of Carbon, Graphite, Diamond and Fullerenes. Properties, Processing and Applications*, Noves Publications, New Jersey, 1993.
- [27] R. Dugben, *Glassy Carbon - A Material for Use in Analytical Chemistry*, Publication of Sigri, Meitingen, 1985.
- [28] G.M. Jenkins, K. Kawamura, *Polymeric Carbons*, Cambridge University Press, Cambridge, 1976.
- [29] E. Fitzer, W. Schaefer, S. Yamada, *Carbon* 7 (1969) 643.
- [30] M. Inagaki, S. Harada, T. Sato, T. Nakajima, Y. Horino, K. Morita, *Carbon* 27 (1989) 253.
- [31] M. Inagaki, L.J. Meng, T. Ibuki, M. Sakai, Y. Hishiyama, *Carbon* 29 (1991) 1239.
- [32] E. Fitzer, W. Schafer, *Carbon* 8 (1970) 353.
- [33] J. Wang, *Electrochim. Acta* 26 (1981) 1721.
- [34] C.F. Powell, J.H. Oxley, J.M. Blocher, Jr., *Vapor Deposition*, John Wiley & Sons, New York, 1966.
- [35] P. Lucas, A. Marchand, *Carbon* 28 (1990) 207.
- [36] J.C. Bokros, *Chemistry and Physics of Carbon*, Marcel Dekker Inc., New York, 1969.
- [37] H.O. Pierson, M.L. Lieberman, *Carbon* 13 (1975) 159.
- [38] K.R. Wehmeyer, M.R. Deakin, R.M. Wightman, *Anal. Chem.* 57 (1985) 1913.
- [39] R.S. Glass, S.P. Perone, D.R. Ciarlo, *Anal. Chem.* 62 (1990) 1914.
- [40] J.S. Mattson, C.A. Smith, *Anal. Chem.* 47 (1975) 1122.
- [41] T.P. DeAngelis, R.W. Hurst, A.M. Yacynych, H.B. Mark, Jr., W.R. Heineman, J.S. Mattson, *Anal. Chem.* 49 (1977) 1395.
- [42] Y.-T. Kim, D.M. Scarnulis, A.G. Ewing, *Anal. Chem.* 58 (1986) 1782.
- [43] H. Tabei, M. Morita, O. Niwa, T. Horiuchi, *J. Electroanal. Chem.* 334 (1992) 25.
- [44] A.L. Beilby, A. Carlsson, *J. Electroanal. Chem.* 248 (1988) 283.

- [45] C.F. McFadden, L.L. Russell, P.R. Melaragno, J.A. Davis, *Anal. Chem.* 64 (1992) 1520.
- [46] R.A. Saraceno, C.E. Engstrom, M. Rose, A.G. Ewing, *Anal. Chem.* 61 (1989) 560.
- [47] A. Rojo, A. Rosenstratten, D. Anjo, *Anal. Chem.* 58 (1986) 2988.
- [48] J. Wang, A. Brennstener, A.P. Sylwester, C.L. Renschler, *Electroanalysis* 3 (1991) 505.
- [49] C.F. McFadden, P.R. Melaragno, J.A. Davis, *Anal. Chem.* 62 (1990) 742.
- [50] O. Niwa, Y. Xu, H.B. Halsall, W.R. Heineman, *Anal. Chem.* 65 (1993) 1559.
- [51] X. Xing, T.-C. Tan, M. Shao, C.-C. Liu, *Electroanalysis* 4 (1992) 191.
- [52] S.A. Wring, J.P. Hart, B.J. Birch, *Electroanalysis* 4 (1992) 299.
- [53] J. Wang, B. Tian, *Anal. Chem.* 64 (1992) 1706.
- [54] P.N. Bartlett, P.R. Birkin, *Anal. Chem.* 65 (1993) 1118.
- [55] W. Lian, S. Wouters, *Sens. Actuators B* 17 (1989) 609.
- [56] K.D. Sternitzke, R.L. McCreery, *Anal. Chem.* 62 (1990) 1339.
- [57] T. You, O. Niwa, M. Tomita, T. Ichino, S. Hirono, *J. Electrochem. Soc.* 149 (2002) E479.
- [58] P.J.F. Harris, *Carbon Nanotubes and Related Structures*, Cambridge University Press, Cambridge, 1999.
- [59] M.S. Dresselhaus, G. Dresselhaus, P. Avouris, *Carbon Nanotubes: Synthesis, Structure, Properties and Applications*, Springer Verlag, New York, 2001.
- [60] E. Katz, I. Willner, *ChemPhysChem* 5 (2004) 1085.
- [61] S. Iijima, *Physica B* 323 (2002) 1.
- [62] V.N. Popov, *Mater. Sci. Eng. R* 43 (2004) 61.
- [63] J. Bernholc, D. Brenner, M.B. Nardelli, V. Meunier, C. Roland, *Ann. Rev. Mater. Res.* 32 (2002) 347.
- [64] S. Iijima, *Nature* 354 (1991) 56.
- [65] C.N.R. Rao, B.C. Satishkumar, A. Govindaraj, M. Nath, *ChemPhysChem* 2 (2001) 78.
- [66] J.L. Delgado, M.A. Herranz, N. Martín, *J. Mater. Chem.* 18 (2008) 1417.
- [67] L. Agüí, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, *Anal. Chim. Acta* 622 (2008) 11.
- [68] C.T. Kingston, B. Simard, *Anal. Lett.* 36 (2003) 3119.
- [69] J.W. Liu, M.W. Shao, Q. Tang, S.Y. Zhang, Y. Qian, *J. Phys. Chem. B* 107 (2003) 6329.

- [70] P. Smiljanic, T. Delloero, A. Serventi, G. Lebrun, B.L. Stansfield, J.P. Dodelet, M. Trudeau, S. Desilets, *Chem. Phys. Lett.* 342 (2001) 503.
- [71] J.L. O'Loughlin, C.H. Kiang, C.H. Wallace, T.K. Reynolds, L. Rao, R.B. Kaner, *J. Phys. Chem. B* 105 (2001) 1921.
- [72] Y. Chen, M.J. Conway, J.D. Fitz Gerald, *Appl. Phys. A* 76 (2003) 633.
- [73] V.A. Ryzhkov, *Physica B* 323 (2002) 324.
- [74] D. Laplaze, P. Bernier, W.K. Maser, G. Flamant, T. Guillard, A. Loiseau, *Carbon* 36 (1998) 685.
- [75] M.D. Diener, N. Nicholson, J.M. Alford, *J. Phys. Chem. B* 104 (2000) 9615.
- [76] W.K. Hsu, J.P. Hare, M. Terrones, H.W. Kroto, D.R.M. Walton, P.J.F. Harris, *Nature* 377 (1995) 687.
- [77] M. Valcarcel, B.M. Simonet, S. Cardenas, B. Suarez, *Anal. Bioanal. Chem.* 382 (2005) 1783.
- [78] S. Bandow, A.M. Rao, K.A. Williams, A. Thess, R.E. Smalley, P.C. Eklund, *J. Phys. Chem. B* 101 (1997) 8839.
- [79] K. Tohji, H. Takahashi, Y. Shinoda, N. Shimizu, B. Jeyadevan, I. Matsuoka, Y. Saito, A. Kasuya, S. Ito, Y. Nishina, *J. Phys. Chem. B* 101 (1997) 1974.
- [80] J.M. Bonard, T. Stora, J.P. Salvetat, F. Maier, T. Stockli, C. Duschl, L. Forro, W.A. deHeer, A. Chatelain, *Adv. Mater.* 9 (1997) 827.
- [81] A.C. Dillon, T. Gennett, K.M. Jones, J.L. Alleman, P.A. Parilla, M.J. Heben, *Adv. Mater.* 11 (1999) 1354.
- [82] A.G. Rinzler, J. Liu, H. Dai, P. Nikolaev, C.B. Huffman, F.J. Rodríguez-Macías, P.J. Boul, A.H. Lu, D. Heymann, D.T. Colbert, R.S. Lee, J.E. Fischer, A.M. Rao, P.C. Eklund, R.E. Smalley, *Appl. Phys. A* 67 (1998) 29.
- [83] A. Hulanicki, S. Glab, F. Ingman, *Pure Appl. Chem.* 63 (1991) 1247.
- [84] J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, VCH Publishers, Florida, 2000.
- [85] B.R. Eggins, *Chemical Sensors and Biosensors*, Wiley, Chichester, 2002.
- [86] <http://www.psrc.usm.edu/mauritz/nafion.html> (acedido em Agosto 2008)
- [87] D. Lowinsohn, M. Bertotti, *Quim. Nova* 29 (2006) 1318.
- [88] U. Yogeswaran, S.M. Chen, *Sensors* 8 (2008) 290.
- [89] M.F. Simoyi, E. Falkenstein, K. Van Dyke, K.P. Blemings, H. Klandorf, *Comp. Biochem. Physiol. B-Biochem. Mol. Biol.* 135 (2003) 325.

- [90] V.S. Vasantha, S.M. Chen, *J. Electroanal. Chem.* 592 (2006) 77.
- [91] C.M.A. Brett, A.M. Oliveira-Brett, *Electroanalysis*, Oxford University Press, Oxford, 1998.
- [92] C.M.A. Brett, *Pure Appl. Chem.* 73 (2001) 1969.
- [93] N.R. Stradiotto, H. Yamanaka, M.V.B. Zanoni, *J. Braz. Chem. Soc.* 14 (2003) 159.
- [94] K. Brainina, E. Neyman, *Electroanalytical Stripping Methods*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1993.
- [95] J. Wang, J.M. Lu, S.B. Hocevar, P.A.M. Farias, B. Ogorevc, *Anal. Chem.* 72 (2000) 3218.
- [96] P.R. Moses, L. Wier, R.W. Murray, *Anal. Chem.* 47 (1975) 1882.
- [97] A.C. Pereira, A.D. Santos, L.T. Kubota, *Quim. Nova* 25 (2002) 1012.
- [98] R.A. Durst, A.J. Baumner, R.W. Murray, R.P. Buck, C.P. Andrieux, *Pure Appl. Chem.* 69 (1997) 1317.
- [99] W. Kutner, J. Wang, M. L'Her, R.P. Buck, *Pure Appl. Chem.* 70 (1998) 1302.
- [100] J. Labuda, *Selective Electrode Reviews* 14 (1992) 33.
- [101] R.P. Baldwin, K.N. Thomsen, *Talanta* 38 (1991) 1.
- [102] C.M.A. Brett, *Electroanalysis* 11 (1999) 1013.
- [103] N. Oyama, F.C. Anson, *J. Electrochem. Soc.* 127 (1980) 247.
- [104] N. Oyama, F.C. Anson, *J. Electrochem. Soc.* 127 (1980) 249.
- [105] I. Rubinstein, A.J. Bard, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 6641.
- [106] A. Economou, *TrAC Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 334.
- [107] V. Rodilla, A.T. Miles, W. Jenner, G.M. Hawksworth, *Chem.-Biol. Interact.* 115 (1998) 71.
- [108] H.Z. Sun, H.Y. Li, I. Harvey, P.J. Sadler, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 29094.
- [109] J. Wang, J.M. Lu, *Electrochem. Commun.* 2 (2000) 390.
- [110] J. Wang, R.P. Deo, S. Thongngamdee, B. Ogorevc, *Electroanalysis* 13 (2001) 1153.
- [111] J. Wang, J.M. Lu, U.A. Kirgoz, S.B. Hocevar, B. Ogorevc, *Anal. Chim. Acta* 434 (2001) 29.
- [112] J. Wang, U.A. Kirgoz, J.M. Lu, *Electrochem. Commun.* 3 (2001) 703.
- [113] E.A. Hutton, B. Ogorevc, S.B. Hocevar, F. Weldon, M.R. Smyth, J. Wang, *Electrochem. Commun.* 3 (2001) 707.
- [114] S.B. Hocevar, B. Ogorevc, J. Wang, B. Pihlar, *Electroanalysis* 14 (2002) 1707.

- [115] S.B. Hocevar, J. Wang, R.P. Deo, B. Ogorevc, *Electroanalysis* 14 (2002) 112.
- [116] E.A. Hutton, S.B. Hocevar, B. Ogorevc, M.R. Smyth, *Electrochem. Commun.* 5 (2003) 765.
- [117] G. Kefala, A. Economou, A. Voulgaropoulos, M. Sofoniou, *Talanta* 61 (2003) 603.
- [118] A. Krolicka, A. Bobrowski, K. Kalcher, J. Mocak, I. Svancara, K. Vytras, *Electroanalysis* 15 (2003) 1859.
- [119] C.E. Banks, J. Kruusma, M.E. Hyde, A. Salimi, R.G. Compton, *Anal. Bioanal. Chem.* 379 (2004) 277.
- [120] A. Krolicka, A. Bobrowski, *Electrochem. Commun.* 6 (2004) 99.
- [121] M.L. Yang, Z.B. Hu, *J. Electroanal. Chem.* 583 (2005) 46.
- [122] G. Kefala, A. Economou, *Anal. Chim. Acta* 576 (2006) 283.
- [123] E.A. Hutton, S.B. Hocevar, L. Mauko, B. Ogorevc, *Anal. Chim. Acta* 580 (2006) 244.
- [124] B. Claux, O. Vittori, *Electroanalysis* 19 (2007) 2243.
- [125] J.B. Jia, L.L. Cao, Z.H. Wang, *Electroanalysis* 19 (2007) 1845.
- [126] E.O. Jorge, M.M.M. Neto, M.M. Rocha, *Talanta* 72 (2007) 1392.
- [127] D. Du, X.P. Ye, J.D. Zhang, D.L. Liu, *Electrochim. Acta* 53 (2008) 4478.
- [128] J.B. Jia, L.Y. Cao, Z.H. Wang, T.X. Wang, *Electroanalysis* 20 (2008) 542.
- [129] E.A. Hutton, B. Ogorevc, S.B. Hocevar, M.R. Smyth, *Anal. Chim. Acta* 557 (2006) 57.
- [130] N.G. Naseri, S.J. Baldock, A. Economou, N.J. Goddard, P.R. Fielden, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 1283.
- [131] J. Wang, J.M. Lu, S.B. Hocevar, B. Ogorevc, *Electroanalysis* 13 (2001) 13.
- [132] R.O. Kadara, I.E. Tothill, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 770.
- [133] S. Chuanuwatanakul, W. Dungchai, O. Chailapakul, S. Motomizu, *Anal. Sci.* 24 (2008) 589.
- [134] G.H. Hwang, W.K. Han, J.S. Park, S.G. Kang, *Talanta* 76 (2008) 301.
- [135] A. Królicka, R. Pauliukaite, I. Svancara, R. Metelka, A. Bobrowski, E. Norkus, K. Kalcher, K. Vytras, *Electrochem. Commun.* 4 (2002) 193.
- [136] K. Vytras, I. Svancara, R. Metelka, *Electroanalysis* 14 (2002) 1359.
- [137] G.U. Flechsig, M. Kienbaum, P. Grundler, *Electrochem. Commun.* 7 (2005) 1091.

- [138] L. Baldrianova, I. Svancara, M. Vlcek, A. Economou, S. Sotiropoulos, *Electrochim. Acta* 52 (2006) 481.
- [139] L. Baldrianova, I. Svancara, S. Sotiropoulos, *Anal. Chim. Acta* 599 (2007) 249.
- [140] R.T. Kachoosangi, C.E. Banks, X.B. Ji, R.G. Compton, *Anal. Sci.* 23 (2007) 283.
- [141] R. Pauliukaite, C.M.A. Brett, *Electroanalysis* 17 (2005) 1354.
- [142] R. Pauliukaite, R. Metelka, I. Svancara, A. Królicka, A. Bobrowski, K. Vytras, E. Norkus, K. Kalcher, *Anal. Bioanal. Chem.* 374 (2002) 1155.
- [143] D.A. Fungaro, C.M.A. Brett, *Quim. Nova* 23 (2000) 805.
- [144] H.L. Yeager, A. Steck, *Anal. Chem.* 51 (1979) 862.
- [145] M.E.R. Dam, K.N. Thomsen, P.G. Pickup, K.H. Schroder, *Electroanalysis* 7 (1995) 70.
- [146] B. Hoyer, T.M. Florence, G.E. Batley, *Anal. Chem.* 59 (1987) 1608.
- [147] F.M. Matysik, S. Matysik, A.M.O. Brett, C.M.A. Brett, *Anal. Chem.* 69 (1997) 1651.
- [148] J.M. Zen, P.J. Chen, *Anal. Chem.* 69 (1997) 5087.
- [149] B. Hoyer, N. Jensen, L.P. Busch, *Electroanalysis* 13 (2001) 843.
- [150] C.R. Martin, T.A. Rhoades, J.A. Ferguson, *Anal. Chem.* 54 (1982) 1639.
- [151] M.W. Espenscheid, A.R. Ghatakroy, R.B. Moore, R.M. Penner, M.N. Szentirmay, C.R. Martin, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 82 (1986) 1051.
- [152] C.M.A. Brett, D.A. Fungaro, J.M. Morgado, M.H. Gil, *J. Electroanal. Chem.* 468 (1999) 26.
- [153] B. Hoyer, T.M. Florence, *Anal. Chem.* 59 (1987) 2839.
- [154] C.M.A. Brett, A.M.O. Brett, F.M. Matysik, S. Matysik, S. Kumbhat, *Talanta* 43 (1996) 2015.
- [155] C. Agra-Gutiérrez, J.L. Hardcastle, J.C. Ball, R.G. Compton, *Analyst* 124 (1999) 1053.
- [156] C.E. West, J.L. Hardcastle, R.G. Compton, *Electroanalysis* 14 (2002) 1470.
- [157] J. Kruusma, C.E. Banks, E. Lust, H. Keis, L. Nei, R.G. Compton, *Electroanalysis* 16 (2004) 596.
- [158] J. Kruusma, L. Nei, J.L. Hardcastle, R.G. Compton, E. Lust, H. Keis, *Electroanalysis* 16 (2004) 399.
- [159] G. Kefala, A. Economou, A. Voulgaropoulos, *Analyst* 129 (2004) 1082.
- [160] H. Xu, L. Zeng, D. Huang, Y. Xian, L. Jin, *Food Chem.* 109 (2008) 834.

- [161] Y.C. Tsai, J.M. Chen, S.C. Li, F. Marken, *Electrochem. Commun.* 6 (2004) 917.
- [162] Y.C. Tsai, J.M. Chen, F. Marken, *Microchim. Acta* 150 (2005) 269.
- [163] D. Sun, X.F. Xie, Y.P. Cai, H.J. Zhang, K.B. Wu, *Anal. Chim. Acta* 581 (2007) 27.
- [164] H.J. Kim, K.S. Yun, E. Yoon, J. Kwak, *Electrochim. Acta* 50 (2004) 205.
- [165] N.R. de Tacconi, K. Rajeshwar, R.O. Lezna, *Chem. Mat.* 15 (2003) 3046.
- [166] S. Ferlay, T. Mallah, R. Ouahes, P. Veillet, M. Verdaguer, *Nature* 378 (1995) 701.
- [167] O. Sato, T. Iyoda, A. Fujishima, K. Hashimoto, *Science* 272 (1996) 704.
- [168] T. Nuida, T. Matsuda, H. Tokoro, S. Sakurai, K. Hashimoto, S. Ohkoshi, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 11604.
- [169] M.A. Malik, P.J. Kulesza, *Electroanalysis* 8 (1996) 113.
- [170] S.S. Narayanan, F. Scholz, *Electroanalysis* 11 (1999) 465.
- [171] I.L. de Mattos, L. Gorton, *Quim. Nova* 24 (2001) 200.
- [172] R. Koncki, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 32 (2002) 79.
- [173] H. Yu, J.B. Zheng, *Chin. J. Chem.* 25 (2007) 503.
- [174] C.W. Liu, Y. Wang, G.Y. Zhu, S.J. Dong, *Electrochim. Acta* 42 (1997) 1795.
- [175] G. Horanyi, G. Inzelt, P.J. Kulesza, *Electrochim. Acta* 35 (1990) 811.
- [176] L.M. Siperko, T. Kuwana, *J. Electrochem. Soc.* 130 (1983) 396.
- [177] L.M. Siperko, T. Kuwana, *J. Electrochem. Soc.* 133 (1986) 2439.
- [178] L.M. Siperko, T. Kuwana, *Electrochim. Acta* 32 (1987) 765.
- [179] J. Wang, X.J. Zhang, L. Chen, *Electroanalysis* 12 (2000) 1277.
- [180] V.G. Bonifácio, L.H. Marcolino, M.F.S. Teixeira, O. Fatibello-Filho, *Microchem. J.* 78 (2004) 55.
- [181] G. Tabrizvand, R.E. Sabzi, K. Farhadi, *J. Solid State Electrochem.* 11 (2006) 103.
- [182] D.R. Shankaran, S.S. Narayanan, *Sens. Actuators B* 55 (1999) 191.
- [183] D.R. Shankaran, S.S. Narayanan, *Fresenius J. Anal. Chem.* 364 (1999) 686.
- [184] R. Pauliukaite, C.M.A. Brett, *Electrochim. Acta* 50 (2005) 4973.
- [185] R. Pauliukaite, M. Florescu, C.M.A. Brett, *J. Solid State Electrochem.* 9 (2005) 354.
- [186] R. Pauliukaite, M.E. Ghica, C.M.A. Brett, *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2005) 972.
- [187] R. Pauliukaite, A.-M. Chiorcea-Paquim, A.M. Oliveira-Brett, C.M.A. Brett, *Electrochim. Acta* 52 (2006) 1.
- [188] A. Ivaska, *Electroanalysis* 3 (1991) 247.

- [189] A.F. Diaz, K.K. Kanazawa, G.P. Gardini, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1979) 635.
- [190] A.F. Diaz, J.A. Logan, *J. Electroanal. Chem.* 111 (1980) 111.
- [191] A.A. Karyakin, E.E. Karyakina, H.L. Schmidt, *Electroanalysis* 11 (1999) 149.
- [192] A.A. Karyakin, E.E. Karyakina, W. Schuhmann, H.L. Schmidt, *Electroanalysis* 11 (1999) 553.
- [193] C.A. Pessoa, Y. Gushikem, L.T. Kubota, L. Gorton, *J. Electroanal. Chem.* 431 (1997) 23.
- [194] M. Guttenberg, *Plant Soil* 226 (2000) 211.
- [195] P.J. Cardona, C.Y. Soto, C. Martín, B. Giquel, G. Agustí, E. Guirado, T. Sirakova, R. Kolattukudy, E. Julián, M. Luquin, *Microbes Infect.* 8 (2006) 183.
- [196] V. Ricci, P. Sommi, R. Fiocca, V. Necchi, M. Romano, E. Solcia, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292 (2002) 167.
- [197] T. Mammone, D. Gan, D. Collins, R.A. Lockshin, K. Marenus, D. Maes, *Cell Biol. Toxicol.* 16 (2000) 293.
- [198] Y.N. Ni, D.Q. Lin, S. Kokot, *Anal. Biochem.* 352 (2006) 231.
- [199] Y. Yang, X. Yang, Y.L. Liu, Z.M. Liu, H.F. Yang, G.L. Shen, R.Q. Yu, *J. Photochem. Photobiol. A-Chem.* 171 (2005) 137.
- [200] G.F. Wang, N.J. Hu, W. Wang, P.C. Li, H.C. Gu, B. Fang, *Electroanalysis* 19 (2007) 2329.
- [201] C.S. Halliday, D.B. Matthews, *Aust. J. Chem.* 36 (1983) 507.
- [202] D.D. Schlereth, A.A. Karyakin, *J. Electroanal. Chem.* 395 (1995) 221.
- [203] C.X. Chen, Y.H. Gao, *Electrochim. Acta* 52 (2007) 3143.
- [204] C.M. Yang, J.L. Yi, X.J. Tang, G.Z. Zhou, Y. Zeng, *React. Funct. Polym.* 66 (2006) 1336.
- [205] C.X. Chen, Y.H. Gao, *Electrochim. Acta* 52 (2007) 7322.
- [206] B.P. Nikolski, V.V. Palchevs, L.A. Polyansk, V.V. Boriskin, *Dokl. Akad. Nauk* 193 (1970) 352.
- [207] B.P. Nikolski, V.V. Palchevs, L.A. Polyansk, A.G. Rodichev, *Dokl. Akad. Nauk* 194 (1970) 1334.
- [208] J.M. Bauldreay, M.D. Archer, *Electrochim. Acta* 28 (1983) 1515.

- [209] W.J. Albery, A.R. Hillman, R.G. Egdell, H. Nutton, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 80 (1984) 111.
- [210] S.M. Chen, K.C. Lin, *J. Electroanal. Chem.* 511 (2001) 101.
- [211] A.A. Karyakin, O.A. Bobrova, E.E. Karyakina, *J. Electroanal. Chem.* 399 (1995) 179.
- [212] D. Benito, J.J. García-Jareño, J. Navarro-Laboulais, F. Vicente, *J. Electroanal. Chem.* 446 (1998) 47.
- [213] D. Benito, C. Gabrielli, J.J. García-Jareño, M. Keddou, H. Perrot, F. Vicente, *Electrochem. Commun.* 4 (2002) 613.
- [214] F. Vicente, J.J. García-Jareño, D. Benito, J. Agisuelas, *J. New Mat. Electrochem. Syst.* 6 (2003) 267.
- [215] G. Inzelt, E. Csahok, *Electroanalysis* 11 (1999) 744.
- [216] E.I. Saez, R.M. Corn, *Electrochim. Acta* 38 (1993) 1619.
- [217] F.L. Qu, M.H. Yang, J.W. Chen, G.L. Shen, R.Q. Yu, *Anal. Lett.* 39 (2006) 1785.
- [218] D.R.S. Jeykumari, S.S. Narayanan, *Biosens. Bioelectron.* 23 (2008) 1404.
- [219] M.E. Ghica, C.M.A. Brett, *Anal. Lett.* 39 (2006) 1527.
- [220] M.E. Ghica, C.M.A. Brett, *Electroanalysis* 18 (2006) 748.
- [221] M.M. Barsan, C.M.A. Brett, *Talanta* 74 (2008) 1505.
- [222] R. Pauliukaite, A.P. Doherty, K.D. Murnaghan, C.M.A. Brett, *J. Electroanal. Chem.* 616 (2008) 14.
- [223] M.M. Barsan, E.M. Pinto, C.M.A. Brett, *Electrochim. Acta* 53 (2008) 3973.
- [224] R. Pauliukaite, A.P. Doherty, K.D. Murnaghan, C.M.A. Brett, *Electroanalysis* 20 (2008) 485.
- [225] R. Pauliukaite, M. Schoenleber, P. Vadgama, C.M.A. Brett, *Anal. Bioanal. Chem.* 390 (2008) 1121.
- [226] J. Li, S.N. Tan, *Anal. Lett.* 33 (2000) 1467.
- [227] V.B. Kandimalla, V.S. Tripathi, H.X. Ju, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 36 (2006) 73.
- [228] D. Avnir, S. Braun, O. Lev, M. Ottolenghi, *Chem. Mat.* 6 (1994) 1605.
- [229] B.C. Dave, B. Dunn, J.S. Valentine, J.I. Zink, *Anal. Chem.* 66 (1994) A1120.
- [230] I. Gill, *Chem. Mat.* 13 (2001) 3404.
- [231] M.M. Collinson, *TrAC Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 30.
- [232] W. Jin, J.D. Brennan, *Anal. Chim. Acta* 461 (2002) 1.

- [233] G. Carturan, R. Dal Toso, S. Boninsegna, R. Dal Monte, J. Mater. Chem. 14 (2004) 2087.
- [234] K. Smith, N.J. Silvernail, K.R. Rodgers, T.E. Elgren, M. Castro, R.M. Parker, J. Am. Chem. Soc. 124 (2002) 4247.
- [235] C.J. Brinker, G.W. Scherer, *Sol-gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*, Academic Press, Boston, 1990.
- [236] A.A.S. Alfaya, L.T. Kubota, Quim. Nova 25 (2002) 835.
- [237] O. Lev, Z. Wu, S. Bharathi, V. Glezer, A. Modestov, J. Gun, L. Rabinovich, S. Sampath, Chem. Mat. 9 (1997) 2354.
- [238] L. Rabinovich, O. Lev, Electroanalysis 13 (2001) 265.
- [239] C.J. Brinker, J. Non-Cryst. Solids 100 (1988) 31.
- [240] L.L. Hench, J.K. West, Chem. Rev. 90 (1990) 33.
- [241] A.M. Buckley, M. Greenblatt, J. Chem. Educ. 71 (1994) 599.
- [242] A. Walcarius, Electroanalysis 13 (2001) 701.
- [243] J. Li, S.N. Tan, J.T. Oh, J. Electroanal. Chem. 448 (1998) 69.
- [244] W.Y. Lee, S.R. Kim, T.H. Kim, K.S. Lee, M.C. Shin, J.K. Park, Anal. Chim. Acta 404 (2000) 195.
- [245] W.Y. Lee, K.S. Lee, T.H. Kim, M.C. Shin, J.K. Park, Electroanalysis 12 (2000) 78.
- [246] A. Navas Díaz, M.C. Ramos Peinado, M.C. Torijas Minguez, Anal. Chim. Acta 363 (1998) 221.
- [247] D.J. van Unen, J.F.J. Engbersen, D.N. Reinhoudt, Biotechnol. Bioeng. 75 (2001) 154.
- [248] H.C. Tsai, R.A. Doong, H.C. Chiang, K.T. Chen, Anal. Chim. Acta 481 (2003) 75.
- [249] C.G. Kauffmann, R.T. Mandelbaum, J. Biotechnol. 51 (1996) 219.
- [250] U. Künzelmann, H. Böttcher, Sens. Actuators B 39 (1997) 222.
- [251] B.Q. Wang, S.J. Dong, J. Electroanal. Chem. 487 (2000) 45.
- [252] B.Q. Wang, J.Z. Zhang, G.J. Cheng, S.J. Dong, Chem. Commun. (2000) 2123.
- [253] D. Martinez-Pérez, M.L. Ferrer, C.R. Mateo, Anal. Biochem. 322 (2003) 238.
- [254] B.D. Gupta, D.K. Sharma, Opt. Commun. 140 (1997) 32.
- [255] C. Couto, A.N. Araújo, M. Montenegro, J. Rohwedder, I. Raimundo, C. Pasquini, Talanta 56 (2002) 997.
- [256] S. Sampath, O. Lev, Anal. Chem. 68 (1996) 2015.

- [257] A.C. Pierre, *Biocatal. Biotransform.* 22 (2004) 145.
- [258] J. Wang, P.V.A. Pamidi, D.S. Park, *Anal. Chem.* 68 (1996) 2705.
- [259] A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1980.
- [260] J.R. Macdonald, *Impedance Spectroscopy. Emphasizing Solid Materials and Systems*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1987.
- [261] P.T. Kissinger, W.R. Heineman, Eds. *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1996.
- [262] A. Fick, *Phil. Mag.* 10 (1855) 30.
- [263] A. Fick, *Poggendorff's Annal. Physik.* 94 (1855) 59.
- [264] J.A.V. Butler, *Trans. Faraday Soc.* 19 (1924) 0729.
- [265] T. Erdey-Gruz, M. Volmer, *Z Phys. Chem A-Chem. Thermodyn. Kinet. Elektrochem. Eigensch.lehre* 150 (1930) 203.
- [266] W.H. Reinmuth, *J. Electroanal. Chem.* 34 (1972) 297.
- [267] C.P.M. Bongenaar, A.G. Remijnse, M. Sluyters-Rehbach, J.H. Sluyters, *J. Electroanal. Chem.* 111 (1980) 155.
- [268] J.E.B. Randles, *Trans. Faraday Soc.* 44 (1948) 327.
- [269] A. Sevcik, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 13 (1948) 349.
- [270] R.S. Nicholson, *Anal. Chem.* 37 (1965) 1351.
- [271] G.C. Barker, I.L. Jenkins, *Anal. Chem.* 24 (1952) 1519.
- [272] G.C. Barker, *Anal. Chim. Acta* 18 (1958) 118.
- [273] J.J. Odea, A. Ribes, J.G. Osteryoung, *J. Electroanal. Chem.* 345 (1993) 287.
- [274] J.G. Osteryoung, R.A. Osteryoung, *Anal. Chem.* 57 (1985) A101.
- [275] J.J. Odea, J. Osteryoung, R.A. Osteryoung, *Anal. Chem.* 53 (1981) 695.
- [276] A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, Wiley, New York, 2001.
- [277] J. Wang, *Stripping Analysis: Principles, Instrumentation and Applications*, VCH Publishers, Florida, 1985.
- [278] K.Z. Brainina, N.A. Malakhova, N.Y. Stojko, *Fresenius J. Anal. Chem.* 368 (2000) 307.
- [279] F.G. Cottrell, *Z. Physik. Chem.* 42 (1903) 385.
- [280] W. Lorenz, K.D. Schulze, *J. Electroanal. Chem.* 65 (1975) 141.

- [281] R. Cottis, S. Turgoose, *Corrosion Testing Made Easy: Electrochemical Impedance and Noise*, NACE, Texas, 1999.
- [282] M.G.S. Ferreira, M.J.J. Ferreira in *Corrosão Atmosférica: Mapas de Portugal*; M.E.M. Almeida, M.G.S. Ferreira, Eds.; INETI, Lisboa, 1998, p 135.
- [283] L. Beaunier, M. Keddam, J.J. García-Jareño, F. Vicente, J. Navarro-Laboulais, *J. Electroanal. Chem.* 566 (2004) 159.
- [284] J.E.B. Randles, *Discuss. Faraday Soc.* 1 (1947) 11.
- [285] R. de Levie, *Electrochim. Acta* 9 (1964) 1231.
- [286] G. Binnig, C.F. Quate, C. Gerber, *Phys. Rev. Lett.* 56 (1986) 930.
- [287] R. Wiesendanger, *Scanning Probe Microscopy and Spectroscopy: Methods and Applications*, Cambridge University Press, Cambridge, 1994.
- [288] C.B. Prater, P.G. Maivald, K.J. Kjoller, M.G. Heaton, *Probing Nano-Scale Forces with the Atomic Force Microscope*, Digital Instruments Application Notes, 1995.
- [289] A.A.P. Ferreira, H. Yamanaka, *Quim. Nova* 29 (2006) 137.
- [290] H. Heinzelmann, E. Meyer, P. Grutter, H.R. Hidber, L. Rosenthaler, H.J. Guntherodt, *J. Vac. Sci. Technol. A-Vac. Surf. Films* 6 (1988) 275.
- [291] M. Fleischmann, P.J. Hendra, J. Mcquillan, *Chem. Soc. - Chem. Commun.* 80 (1973)
- [292] J.R. Baena, B. Lendl, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8 (2004) 534.
- [293] U. Schmidt, A. Jauss, W. Ibach, K. Weishaupt, O. Hollricher, *Microsc. Today* 13 (2005) 30.
- [294] P. Dhamelinourt in *Handbook of Vibrational Spectroscopy*; J.M. Chalmers, P.R. Griffiths, Eds.; John Wiley & Sons, Chichester, 2002, p 1149.
- [295] H. Boyer, J. Oswald, *Analisis* 28 (2000) 3.
- [296] C.M.A. Brett, L. Angnes, H.D. Liess, *Electroanalysis* 13 (2001) 765.
- [297] M. Florescu, C.M.A. Brett, *Talanta* 65 (2005) 306.
- [298] N.S. Lawrence, R.P. Deo, J. Wang, *Electroanalysis* 17 (2005) 65.
- [299] P. Papakonstantinou, R. Kern, L. Robinson, H. Murphy, J. Irvine, E. McAdams, J. McLaughlin, T. McNally, Fuller. *Nanotub. Carbon Nanostruct.* 13 (2005) 91.
- [300] A. Salimi, A. Noorbakhsh, S. Soltanian, *Electroanalysis* 18 (2006) 703.
- [301] M.L. Ferrer, F. del Monte, D. Levy, *Chem. Mat.* 14 (2002) 3619.
- [302] R.L. McCreery in *Electroanalytical Chemistry*; A.J. Bard, Ed.; Marcel Dekker, New York, 1991, p 221.

- [303] A. Zeng, E. Liu, S.N. Tan, S. Zhang, J. Gao, *Electroanalysis* 14 (2002) 1294.
- [304] A. Zeng, E. Liu, S. Zhang, S.N. Tan, P. Hing, I.F. Annergren, J. Gao, *Thin Solid Films* 426 (2003) 258.
- [305] A. Zeng, E. Liu, S. Zhang, S.N. Tan, L.X. Liu, J. Gao., *Mater. Sci. Forum* 437-438 (2003) 467.
- [306] O.M.S. Filipe, C.M.A. Brett, *Talanta* 61 (2003) 643.
- [307] O.M.S. Filipe, C.M.A. Brett, *Electroanalysis* 16 (2004) 994.
- [308] R.C. Engstrom, *Anal. Chem.* 54 (1982) 2310.
- [309] R.C. Engstrom, V.A. Strasser, *Anal. Chem.* 56 (1984) 136.
- [310] J. Wang, L.D. Hutchins, *Anal. Chim. Acta* 167 (1985) 325.
- [311] J. Wang, P. Tuzhi, V. Villa, *J. Electroanal. Chem.* 234 (1987) 119.
- [312] L. Falat, H.Y. Cheng, *Anal. Chem.* 54 (1982) 2108.
- [313] L. Otero, N. Vettorazzi, L. Sereno, *J. Electrochem. Soc.* 148 (2001) E413.
- [314] K. Grennan, A.J. Killard, M.R. Smyth, *Electroanalysis* 13 (2001) 745.
- [315] A.L. Beilby, T.A. Sasaki, H.M. Stern, *Anal. Chem.* 67 (1995) 976.
- [316] I.F. Hu, D.H. Karweik, T. Kuwana, *J. Electroanal. Chem.* 188 (1985) 59.
- [317] C.M.A. Brett, V.A. Alves, D.A. Fungaro, *Electroanalysis* 13 (2001) 212.
- [318] H. Maleki, C.D. Cojocar, C.M.A. Brett, G.M. Jenkins, J.R. Selman, *J. Electrochem. Soc.* 145 (1998) 721.
- [319] E.S. Gadelmawla, M.M. Koura, T.M.A. Maksoud, I.M. Elewa, H.H. Soliman, *J. Mater. Process. Technol.* 123 (2002) 133.
- [320] A. Argoitia, J.C. Angus, J.S. Ma, L. Wang, P. Pirouz, W.R.L. Lambrecht, *J. Mater. Res.* 9 (1994) 1849.
- [321] H.B. Martin, A. Argoitia, J.C. Angus, U. Landau, *J. Electrochem. Soc.* 146 (1999) 2959.
- [322] P.K. Chu, L.H. Li, *Mater. Chem. Phys.* 96 (2006) 253.
- [323] F. Tuinstra, J.L. Koenig, *J. Chem. Phys.* 53 (1970) 1126.
- [324] J. Robertson, *Mater. Sci. Eng. R* 37 (2002) 129.
- [325] J. Robertson, *Surf. Coat. Technol.* 50 (1992) 185.
- [326] R.J. Bowling, R.T. Packard, R.L. McCreery, *J. Am. Chem. Soc.* 111 (1989) 1217.
- [327] R.J. Rice, R.L. McCreery, *Anal. Chem.* 61 (1989) 1637.
- [328] Y.W. Alsmeyer, R.L. McCreery, *Langmuir* 7 (1991) 2370.

- [329] Y.C. Tsai, J. Davis, R.G. Compton, S. Ito, N. Ono, *Electroanalysis* 13 (2001) 7.
- [330] B. Hoyer, N. Jensen, *Talanta* 42 (1995) 767.
- [331] B. Hoyer, N. Jensen, *Talanta* 41 (1994) 449.
- [332] C.M.A. Brett, D.A. Fungaro, *J. Braz. Chem. Soc.* 11 (2000) 298.
- [333] C.J. Biaselle, D.B. Millar, *Biophys. Chem.* 3 (1975) 355.
- [334] E.A. Dennis, A.A. Ribeiro, M.F. Roberts, J. Robson. in *Solution Chemistry of Surfactants*; K.L. Mittal, Ed.; Plenum, New York, 1979, p 175.
- [335] C. González-García, M.L. González-Martán, V. Gómez-Serrano, J.M. Bruque, L. Labajos-Broncano, *Carbon* 39 (2001) 849.
- [336] W.W. Kubiak, E. Niewiara, *Electroanalysis* 14 (2002) 1169.
- [337] H. Sawamoto, *Anal. Sci.* 19 (2003) 1381.
- [338] B. Gasparovic, D. Risovic, B. Cosovic, *Electrochim. Acta* 49 (2004) 3383.
- [339] S. Paria, C. Manohar, K.C. Khilar, *Colloids Surf., A* 252 (2005) 221.
- [340] R.J. Hunter, *Foundations of Colloid Science*, Oxford University Press, Oxford, 2000.
- [341] P. Ugo, L.M. Moretto, *Electroanalysis* 7 (1995) 1105.
- [342] O. Rohr, *Ind. Lubr. Tribol.* 54 (2002) 153.
- [343] G.U. Flechsig, O. Korbout, S.B. Hocevar, S. Thongngamdee, B. Ogorevc, P. Grundler, J. Wang, *Electroanalysis* 14 (2002) 192.
- [344] C.E. Banks, J. Kruusma, R.R. Moore, P. Tomcik, J. Peters, J. Davis, S. Komorsky-Lovric, R.G. Compton, *Talanta* 65 (2005) 423.
- [345] R. Pauliukaite, S.B. Hocevar, B. Ogorevc, J. Wang, *Electroanalysis* 16 (2004) 719.
- [346] A. Economou, P.R. Fielden, *Analyst* 128 (2003) 205.
- [347] R.H. Baughman, A.A. Zakhidov, W.A. de Heer, *Science* 297 (2002) 787.
- [348] J.J. Gooding, *Electrochim. Acta* 50 (2005) 3049.
- [349] G.G. Wildgoose, C.E. Banks, H.C. Leventis, R.G. Compton, *Microchim. Acta* 152 (2006) 187.
- [350] G.A. Rivas, M.D. Rubianes, M.C. Rodríguez, N.E. Ferreyra, G.L. Luque, M.L. Pedano, S.A. Miscoria, C. Parrado, *Talanta* 74 (2007) 291.
- [351] P.J. Britto, K.S.V. Santhanam, P.M. Ajayan, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 41 (1996) 121.
- [352] Q. Zhao, Z.H. Gan, Q.K. Zhuang, *Electroanalysis* 14 (2002) 1609.
- [353] J.X. Wang, M.X. Li, Z.J. Shi, N.Q. Li, Z.N. Gu, *Anal. Chem.* 74 (2002) 1993.

- [354] G.C. Zhao, Z.Z. Yin, L. Zhang, X.W. Wei, *Electrochem. Commun.* 7 (2005) 256.
- [355] Y.J. Yin, P. Wu, Y.F. Lu, P. Du, Y.M. Shi, C.X. Cai, *J. Solid State Electrochem.* 11 (2007) 390.
- [356] G.C. Zhao, L. Zhang, X.W. Wei, Z.S. Yang, *Electrochem. Commun.* 5 (2003) 825.
- [357] L. Zhang, G.C. Zhao, X.W. Wei, Z.S. Yang, *Chem. Lett.* 33 (2004) 86.
- [358] Y.F. Lu, Y.J. Yin, P. Wu, C.X. Cai, *Acta Phys.-Chim. Sin.* 23 (2007) 5.
- [359] A. Guiseppi-Elie, C.H. Lei, R.H. Baughman, *Nanotechnol.* 13 (2002) 559.
- [360] J. Wang, M. Musameh, Y.H. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 2408.
- [361] C.X. Cai, J. Chen, *Anal. Biochem.* 332 (2004) 75.
- [362] F. Patolsky, Y. Weizmann, I. Willner, *Angew. Chem.-Int. Edit.* 43 (2004) 2113.
- [363] X.L. Luo, A.J. Killard, M.R. Smyth, *Electroanalysis* 18 (2006) 1131.
- [364] L. Wang, J.X. Wang, F.M. Zhou, *Electroanalysis* 16 (2004) 627.
- [365] A. Salimi, A. Noorbakhsh, M. Ghadermarz, *Anal. Biochem.* 344 (2005) 16.
- [366] M. Musameh, J. Wang, A. Merkoci, Y.H. Lin, *Electrochem. Commun.* 4 (2002) 743.
- [367] J. Chen, J.C. Bao, C.X. Cai, T.H. Lu, *Chin. Chem. Lett.* 14 (2003) 1171.
- [368] J. Chen, C.X. Cai, *Chin. J. Chem.* 22 (2004) 167.
- [369] J. Wang, *Electroanalysis* 17 (2005) 7.
- [370] K.S. Prasad, J.C. Chen, C. Ay, J.M. Zen, *Sens. Actuators B* 123 (2007) 715.
- [371] J. Chen, C.X. Cai, *Chin. Chem. Lett.* 15 (2004) 813.
- [372] G.C. Zhao, M.Q. Xu, J. Ma, X.W. Wei, *Electrochem. Commun.* 9 (2007) 920.
- [373] W. Zhao, C.H. Song, P.E. Pehrsson, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 12418.
- [374] M.J. O'Connell, P. Boul, L.M. Ericson, C. Huffman, Y.H. Wang, E. Haroz, C. Kuper, J. Tour, K.D. Ausman, R.E. Smalley, *Chem. Phys. Lett.* 342 (2001) 265.
- [375] R.K. Saini, I.W. Chiang, H.Q. Peng, R.E. Smalley, W.E. Billups, R.H. Hauge, J.L. Margrave, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 3617.
- [376] J. Wang, M. Musameh, *Anal. Lett.* 36 (2003) 2041.
- [377] M.D. Rubianes, G.A. Rivas, *Electroanalysis* 17 (2005) 73.
- [378] S.N. Liu, C.X. Cai, *J. Electroanal. Chem.* 602 (2007) 103.
- [379] J.M. Nugent, K.S.V. Santhanam, A. Rubio, P.M. Ajayan, *Nano Lett.* 1 (2001) 87.
- [380] F. Marken, J.C. Eklund, R.G. Compton, *J. Electroanal. Chem.* 395 (1995) 335.
- [381] M.I. Prodromidis, A.B. Florou, S.M. Tzouwara-Karayanni, M.I. Karayannis, *Electroanalysis* 12 (2000) 1498.

- [382] G.D. Withey, A.D. Lazareck, M.B. Tzolov, A. Yin, P. Aich, J.I. Yeh, J.M. Xu, *Biosens. Bioelectron.* 21 (2006) 1560.
- [383] R.C.W. Lau, M.H.F. Choi, J.Z. Lu, *Talanta* 48 (1999) 321.
- [384] H.B. Yidiz, L. Toppare, *Biosens. Bioelectron.* 21 (2006) 2306.
- [385] K.V. Dmytruk, O.L. Smutok, O.B. Ryabova, G.Z. Gayda, V.A. Sibirny, W. Schuhmann, M.V. Gonchar, A.A. Sibirny, *BMC Biotech.* 7 (2007) 33.
- [386] N.G. Patel, S. Meier, K. Cammann, G.C. Chemnitz, *Sens. Actuators B* 75 (2001) 101.
- [387] I. Gill, A. Ballesteros, *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 8587.
- [388] A. Walcarius, D. Mandler, J.A. Cox, M. Collinson, O. Lev, *J. Mater. Chem.* 15 (2005) 3663.
- [389] M. Pagliaro, R. Ciriminna, G. Palmisano, *Chem. Soc. Rev.* 36 (2007) 932.
- [390] K. Anitha, S.V. Mohan, S.J. Reddy, *Biosens. Bioelectron.* 20 (2004) 848.
- [391] C.X. Lei, S.Q. Hu, N. Gao, G.L. Shen, R.Q. Yu, *Bioelectrochem.* 65 (2004) 33.
- [392] J.A. Rodríguez Gutiérrez, M.D. Petit Domínguez, J.M. Pinilla Macías, *Anal. Chim. Acta* 524 (2004) 339.
- [393] G. Roman, A.C. Pappas, D. Kovala-Demertzi, M.I. Prodromidis, *Anal. Chim. Acta* 523 (2004) 201.
- [394] A. Salimi, R.G. Compton, R. Hallaj, *Anal. Biochem.* 333 (2004) 49.
- [395] H.F. Teh, X.H. Yang, H.Q. Gong, S.N. Tan, *Electroanalysis* 16 (2004) 769.
- [396] J.Z. Xu, Y. Zhang, G.X. Li, J.H. Zhu, *Mater. Sci. Eng. C-Biomimetic Supramol. Syst.* 24 (2004) 833.
- [397] Y.F. Tu, J.W. Di, X.J. Chen, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 33 (2005) 187.
- [398] I. Pastor, R. Esquembre, V. Micol, R. Mallavia, C.R. Mateo, *Anal. Biochem.* 334 (2004) 335.
- [399] X.J. Wu, M.M.F. Choi, *Anal. Chim. Acta* 514 (2004) 219.
- [400] P.C.A. Jerónimo, A.N. Araújo, M.C.B.S.M. Montenegro, *Talanta* 72 (2007) 13.
- [401] S. Andreescu, D. Fournier, J.L. Marty, *Anal. Lett.* 36 (2003) 1865.
- [402] M.D.B. Souza, *Quim. Nova* 20 (1997) 191.
- [403] R. Pauliukaite, M.E. Ghica, M. Barsan, C.M.A. Brett, *J. Solid State Electrochem.* 11 (2007) 899.

[404] A.-M. Chiorcea-Paquim, R. Pauliukaite, C.M.A. Brett, A.M. Oliveira-Brett, *Biosens. Bioelectron.* 24 (2008) 297.