

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE ARARAQUARA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

WILLIAN CAMPOS RIBEIRO

**INVESTIGAÇÃO DA CONDUÇÃO ELÉTRICA EM FITAS DUPLAS DE DNA
IMOBILIZADAS EM ELETRODOS DE OURO POR MEDIDAS ELETROQUÍMICAS**

Araraquara

2014

WILLIAN CAMPOS RIBEIRO

INVESTIGAÇÃO DA CONDUÇÃO ELÉTRICA EM FITAS DUPLAS DE DNA
IMOBILIZADAS EM ELETRODOS DE OURO POR MEDIDAS ELETROQUÍMICAS

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do Título de Doutorado
em Química

Orientador: Dr. Paulo Roberto Bueno

Coorientadora: Dr^a. Maria Célia Bertolini

Araraquara

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

R484i
DNA

Ribeiro, Willian Campos
Investigação da condução elétrica em fitas duplas de
imobilizadas em eletrodos de ouro por medidas
eletroquímicas / Willian Campos Ribeiro. –
Araraquara : [s.n], 2014
110 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química

Orientador: Paulo Roberto Bueno

Coorientadora: Maria Célia Bertolini

1. Físico-química. 2. Espectroscopia de impedância.
3. Condutividade elétrica. 4. Filmes semicondutores.
5. Reação de oxidação-redução. I. Título.

WILLIAN CAMPOS RIBEIRO

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Química.

Araraquara, 24 de setembro de 2014.

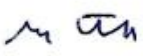
BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno (Orientador)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara


Dr. Antonio Aparecido Pupim Ferreira
Instituto de Química – UNESP, Araraquara


Prof. Dr. Carlos Frederico de Oliveira Graeff
Faculdade de Ciências - UNESP, Bauru


Prof. Dr. Marcelo Mulato
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras – USP, Ribeirão Preto


Prof. Dr. Sergio Brochsztain
Universidade Federal do ABC – UFABC, Santo André

Este trabalho é dedicado à minha Família: Silvia, Junior, Wellington e Ângela. Também ao Jorge, que considero da Família, por me ajudar nestes últimos 2 anos e meio e ao amigo fiel de 11 anos Tom. Agradeço a Dora e Mauro pelo lindo presente que me deram e por isso dedico minha Tese.

Este trabalho ainda possui uma dedicatória para todos aqueles que não alcançaram seus objetivos ao iniciar o projeto de pesquisa, não porque o projeto mudou no desenvolvimento da pesquisa, todavia pela impossibilidade de terminá-la. Portanto, dedico-o para aqueles que continuaram suas pesquisas de uma outra maneira: Dilton Gonçalves Teixeira, Grazielle de Oliveira Setti, Fabiana Antonia Arena, Elsa Maria Materón Vásquez e Anayza Bittencourt de Aragão. Dedico ainda para aqueles que não tiveram a oportunidade de finalizar: Ailton Massaiti Watanabe e Rafael Giusti de Castro Araújo; também para aqueles que mal iniciaram e que não tive contato. Desejo boa sorte a todos e que sejam muito felizes!!!

AGRADECIMENTOS

Ao Ser iluminado onipresente por me fortalecer todos os dias e me tornar cada vez mais persistente em busca de meus sonhos;

Aos meus Familiares por me dar todo o apoio necessário para finalizar esta Tese de doutorado;

Aos professores por me instigarem a ter mais vontade de aprender e por acreditarem em meu potencial;

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno pela oportunidade de realizar o doutorado no grupo de pesquisa Nanobionics e pelas discussões e correções de trabalhos científicos. Ressalto aqui um grande agradecimento à Fabiana Arena (pela parceria ao iniciar o doutorado), Ailton M. Watanabe (pelas discussões de imobilização de biomoléculas, arquivos de tratamento de dados e pelas dicas de como melhorar minha Tese), Carla e Márcio Santos (pelas dicas iniciais de ensaio de imobilização do DNA e pela sugestões no decorrer da pesquisa), Anayza B. Aragão (pela parceria na pesquisa em buscar soluções para o polimento do eletrodo, melhorar o sinal das medidas de tiol modificado com ferroceno, por me incentivar a continuar meu trabalho mesmo dando errado), Tiago A. Benites (pela parceria realizada para solucionar os problemas de polimento do eletrodo de ouro), Fernanda Cesar dos Santos, Flávio C. Bedatty Fernandes, Adriano dos Santos e Eucarlos de Lima Martins (pelas boas discussões científicas) e Márcio Góes (pelas discussões de imobilização do DNA, oferecimento de protocolos de imobilização e de medidas eletroquímicas empregando DNA);

À mestre Ángela M. A. Velásquez, pela recuperação das alíquotas de fita simples de DNA contaminadas com solução salina e pelas inúmeras revisões desta tese de doutorado;

Ao pesquisador português Dr. Luís Moreira Gonçalves, pela parceria na escrita de trabalhos científicos e na resolução de problemas experimentais;

À Profa. Dra. Maria Célia Bertolini por acreditar em meu trabalho e oferecimento de toda infraestrutura para a obtenção e manipulação do DNA usado

no início desta pesquisa. Agradeço também a todo seu grupo de pesquisa (Fernanda Cupertino, principalmente, Tiago, Rodrigo, Fernanda e todos os outros que me ajudaram);

Ao Prof. Dr. Assis V. Benedetti pelas discussões e dicas a respeito do uso de circuito elétrico equivalente e ajustes de curvas de impedância;

Ao Prof. Dr. Cecílio S. Fugivara pelas boas discussões, oferecimento da infraestrutura e grande atenção para resolver os problemas de polimento do eletrodo de ouro e disponibilização da placa de conversão de sinal da Microquímica. Agradeço também ao Dr. Adriano Akita por me ajudar a realizar alguns experimentos no laboratório em que desenvolve seu pós-doutoramento;

Ao Prof. Mário pela ajuda na sonda de eletrodos de platina;

À Porfa. Dra. Maria Isabel Pividori Gurgo pela oportunidade de estagiar em seu laboratório, ter disponibilizado a infraestrutura e reagentes para o desenvolvimento desta Tese. Agradeço também pelas enriquecedoras discussões para solucionar a imobilização do DNA e não posso esquecer de todos os integrantes do Grup Sensors & Biosensors da grande parte desta Tese, para não dizer a sua totalidade, foi realizada graças à esta colaboração. Um agradecimento especial à Susana L. Girona por me ajudar em todo o meu estágio na UAB, desde as instalações até a liofilização das soluções de DNA para o transporte. Agradeço também a Delfina, Tamara, Soledad, Jose e a todos os outros membros do grupo;

Aos funcionários do Instituto de Química por fornecer-me as condições adequadas para realizar esta Tese de Doutorado. Destaco aqui a Seção Técnica de Pós-Graduação, à Biblioteca, à Secretaria do departamento de Físico-Química, ao Almoxarifado, à Seção de Conservação e Manutenção, ao Terceirizado da Limpeza, ao Setor de Vigilância, a Seção de Materiais, ao STAEPE, à Seção de Apoio Técnico Químico (Depósito de Resíduos, Oficina de Eletrônica, Oficina de Vidraria), ao Posto FAPESP e ao Setor de Transportes;

À FAPESP pelo apoio financeiro em que compreende a bolsa e a reserva técnica. Agradeço também ao meu irmão pelo apoio financeiro na realização do estágio na Espanha e pelos 10 meses que fiquei sem bolsa;

Ao Instituto de Química por fornecer-me infraestrutura adequada para o desenvolvimento de minha Tese e a oportunidade de realizar este doutorado;

À UNESP cuja Universidade vem investindo na minha formação como pesquisador desde minha graduação.

Agradeço, por fim, ao Governo Brasileiro por me fornecer uma educação gratuita e de elevada qualidade.

“A educação é a arma mais poderosa que
você pode usar para mudar o mundo”

NELSON MANDELA

“Inauguram o desamor, não os desamados, mas
os que não amam, porque apenas se amam.”

PAULO FREIRE, Pedagogia do Oprimido

RESUMO

A molécula de DNA imobilizada sobre um substrato metálico possui uma infinidade de aplicações: inspeção de alimentos, autenticação pessoal, combate ao bioterrorismo, taxonomia, entre outras. Contudo, nos dispositivos que utilizam as propriedades elétricas desta biomolécula, ainda existem muitas dúvidas, haja vista que nem mesmo a literatura específica chegou a um consenso se o DNA possui características de um material elétrico condutor, semicondutor, isolante ou ainda supercondutor. Neste contexto, a investigação da condução elétrica de fitas duplas de DNA imobilizadas em eletrodos de ouro e sua caracterização por medidas eletroquímicas é bastante atraente. O uso do azul de metileno (MB), um agente intercalante, e a modificação da biomolécula com um grupo ferroceno, com propriedades redox, foram os dois tipos de abordagens utilizados para estudar o comportamento elétrico de fitas duplas e curtas de DNA com conteúdo distinto de bases nitrogenadas: uma rica em guanina e citosina e outra em adenina e timina, denominadas de DNA condutor (ds-DNAc) e DNA isolante (ds-DNAi), respectivamente. Para a primeira abordagem, a caracterização voltamétrica e impedimétrica não permitiu uma diferenciação da resistência elétrica dos sistemas de ds-DNAc e ds-DNAi, pois a transferência eletrônica do MB para o DNA ocorria em paralelo ao processo redox do MB com a superfície do eletrodo, inviabilizando a análise. Deste modo, a modificação do DNA com uma molécula redox foi necessária. Nesta segunda abordagem foi possível diferenciar os sistemas de ds-DNA. Primeiramente, a monocamada de tiol foi caracterizada usando o 6-ferrocenil-hexano-1-tiol. A área do pico de oxidação no voltamograma forneceu um valor de densidade de moléculas igual a $7,5 \times 10^{12}$ moléculas/cm² e, após o tratamento dos espectros de capacitância eletroquímica, o perfil de densidade de estados foi obtido ($2,9 \times 10^{13}$ estados/cm²). A razão entre estes valores foi de 4:1 estados/molécula que, como hipótesem, corresponde a 4 diferentes formas do elétron ocupar os orbitais moleculares do ferroceno com a oxidação do Fe²⁺ a Fe³⁺. Por voltametria cíclica foi evidenciado um par de picos ao redor de 0,25V (vs Ag|AgCl) para o ds-DNAc que é pouco perceptível para o ds-DNAi, o que mostra a maior acessibilidade do grupo ferroceno no ds-DNAc pela menor resistência da biomolécula rica em GC. Os espectros de impedância não forneceram muita informação, mas os espectros de capacitância foram conclusivos, apresentando um aumento de 2,5 vezes para ds-DNAc da resposta na região redox em comparação àquela na região capacitiva. A comparação dos perfis de densidade de estados confirmam uma transferência eletrônica indireta para os ds-DNAs.

Palavras-chave: DNA, imobilização, condução elétrica, impedância, quântica, circuito elétrico equivalente

ABSTRACT

Immobilization of DNA on metallic substrate has an infinity of applications: food inspection, personal authentication, combating bioterrorism, taxonomy and so on. However, there are still some questions about devices based on the electrical properties of this biomolecules because specific literature did not reach consensus if the DNA possesses electric characteristics of conductor, semiconductor, insulator or superconductor. In this context, we were interested to investigate electrical conduction of double-strands DNA immobilized on gold surface and to analyze this system by electrochemical techniques. Two methodologies were used to distinguish electrical behavior of shorts double-strands DNAs with different content of nitrogen bases: one double-strand rich in guanine and cytosine (conductive DNA or ds-DNAc) and another rich in adenine and thymine (non-conductive DNA or ds-DNAi). Intercalating agent methylene blue (MB) was used to characterize the electrical resistance of ds-DNAc and ds-DNAi by cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy. Nevertheless, this methodology was not good enough because the electronic transfer between MB and DNA occurs simultaneously to the MB redox process on electrode surface. Therefore, modification of DNA with a redox group was necessary. In the second approaches we used the ferrocene-modified DNA monolayer. This approach was effective to discern ds-DNAc and ds-DNAi electric properties. Firstly, 6-ferrocenyl-1-hexanethiol molecule was assembled on gold electrode to find out the response of thiol film on ds-DNA systems. Voltammogram curves showed a narrow and intense oxidation peak and the surface density of molecule was obtained by integrating curve (7.5×10^{12} molecules/cm²). After, the density of states (DOS) profile was calculated from capacitance spectra and the integrating curve results on 2.9×10^{13} states/cm². The quotient DOS/surface density was 4:1 states/molecule and it was suggested that this value corresponds to 4 different forms of electrons occupy the molecular orbital of ferrocene when ferrocene group changes from Fe²⁺ to Fe³⁺. Cyclic voltammetry showed a clear couple of redox peaks to ds-DNAc and inconspicuous peaks to ds-DNAi. Differences on peak current are related to the most accessibility of ds-DNAc ferrocene group and lower electrical resistance. Impedance spectrum do not offer information about differences on electrical resistance, but capacitance spectra analysis were very important. In redox region ds-DNAc capacitance is 2.5 times higher than in capacitive region. Density of state profile of ds-DNAs were compared to Tiol-Fc DOS profile to confirm indirect electron transfer to ds-DNAs.

Keywords: DNA, immobilization, electric conduction, impedance, quantum, electric equivalent circuit

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Evolução dos equipamentos eletrônicos. a) Primeiro computador datado de 1946 e b) o smart watch, o menor computador pessoal do mundo..... 20
- Figura 2 - Ilustração de alguns fios moleculares existentes. a) ferroceno entre contatos de alumínio, b) condução por fulerenos, c) fio inorgânico. 22
- Figura 3 - Modelo do DNA a) na forma bidimensional para explicitar as ligações de hidrogênio entre os pares de bases complementares. Note que as fitas simples de DNA são formadas na região externa da dupla hélice por grupos fosfatos alternados por moléculas de desoxirribose. A parte interna da dupla hélice é constituída das bases nitrogenadas púricas e pirimídicas empilhadas muito próximas e perpendiculares ao longo do eixo da molécula. Devido a estas interações e ligações, a molécula de DNA possui uma b) geometria tridimensional de dupla hélice em que o empilhamento das bases nitrogenadas podem ser observadas na vista superior da biomolécula. 24
- Figura 4 - Diversas conformações da molécula de DNA: A-DNA, B-DNA, Z-DNA e grampo..... 25
- Figura 5 - Mecanismo de transporte de carga a curto (*superexchange*) e longo alcance (*hopping*) de buracos e elétrons. Note que o mecanismo é definido pela posição dos níveis de energia da ponte como, por exemplo, a molécula de DNA..... 30
- Figura 6 - Mecanismo de transporte via *hopping* de buracos e elétrons e sua eficiência de transporte..... 31
- Figura 7 - Ilustração dos modos de transferência eletrônica em função da espessura do filme sobre o eletrodo metálico: (a) transferência direta por efeito túnel e (b) transferência indireta em que as propriedades elétricas do filme definem o processo..... 34
- Figura 8 - Densidade de estados eletrônicos no eletrodo metálico DM_{ϵ} , no filme semicondutor DF_{ϵ} e nas espécies redox em solução $DREDOX_{\epsilon}$ e a corrente de troca redox na transferência de carga em equilíbrio em função da energia dos estados. A corrente de troca apresentada é referente ao eletrodo metálico nu, M, e ao eletrodo coberto com um filme fino..... 36

Figura 9 - Reação de transferência eletrônica de espécies redox solvatadas em equilíbrio em um eletrodo metálico coberto com um filme espesso (F, linha sólida) e com um filme fino (F', linha pontilhada).....	37
Figura 10 - Esquemático do mecanismo “liga/desliga” do eletrodo modificado com DNA marcado com ferroceno na extremidade 5'. A marca de ferroceno está representada por um círculo preto.....	39
Figura 11 - Ilustração (a) do modelo clássico de capacitor de placas metálicas planas e paralelas e (b) do processo de polarização do dielétrico com o campo elétrico ligado.....	44
Figura 12 - Ilustração de modelos de dupla camada elétrica para realçar o acúmulo de cargas na região próxima ao eletrodo.....	45
Figura 13 - Ilustração de um sistema de capacitância redox envolvendo mediadores biológicos no processo faradaico.....	46
Figura 14 - Curva de capacitância em função do potencial. Esta representação permite associar a área da curva com DOS da espécie redox ancorada sobre o eletrodo metálico.	48
Figura 15 - Perfil voltamétrico do último ciclo de limpeza eletroquímica em H ₂ SO ₄ 0,5 mol/L com velocidade de varredura igual a 100 mV/s. A área sombreada foi integrada para obter a área eletroativa do eletrodo. O fator de rugosidade para o eletrodo com o perfil de limpeza apresentado foi de 1,5.....	58
Figura 16 - Esquema da preparação experimental de monocamadas de DNA modificadas com um grupo ferroceno. (a) Modificação das fitas simples de DNA com um grupo ferroceno, (b) hibridização da fita simples modificada com a fita simples complementar, (c) imobilização da fita dupla de DNA/bloqueio com 6-mercaptophexan-1-ol e (d) medidas eletroquímicas e tratamento dos dados.	61
Figura 17 - Concentração da fita simples de DNA condutor e isolante (ss-DNA _c e ss-DNA _i , respectivamente) modificada com ferroceno nas diferentes alíquotas do processo de purificação por coluna de separação molecular. Cada alíquota possuía um volume de 0,5mL. O valor de concentração está relacionado com a absorbância de cada alíquota em comprimento de onda de 260nm.....	63

- Figura 18 - Gráfico de contorno de precisão típico de um modo potenciostático PGSTAT302N/FRA2, com amplitude AC 350mV (rms), em que a máxima impedância mensurável é de $10^{11}\Omega$; a capacitância mínima mensurável não é apresentada, mas um cálculo aproximado segundo o gráfico de contorno de precisão apresentado abaixo permite estimar que está compreendido no intervalo 10-100nF; a região de baixa impedância em alta frequência é de aproximadamente 10 em 1MHz e 10^{-3} em 10MHz; e a menor impedância mensurável é de $10^{-3}\Omega$. Para que a medida tenha uma boa precisão, os valores de impedância devem estar compreendidos na área branca destacada no gráfico..... 66
- Figura 19 - Curva de contorno de precisão real do equipamento em que se realizaram as medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica. Amplitude do potencial AC usada foi de 350 mV..... 67
- Figura 20 - Curvas do módulo de impedância em diferentes frequências em função da amplitude AC, utilizando como referência a medida realizada em amplitude de 1mV. O sistema eletroquímico usado nas medidas foi em solução tampão fosfato salino (PBS) 0,1mol/L, pH=7,4, e aplicando um potencial DC de 0,10 V vs Ag|AgCl..... 68
- Figura 21 - Curvas do módulo de impedância em diferentes frequências em função da amplitude AC, utilizando como referência a medida realizada em amplitude de 1mV. O sistema eletroquímico usado nas medidas foi em solução tampão fosfato salino (PBS) 0,1mol/L, pH 7,4, e aplicando um potencial DC de 0,25V vs Ag|AgCl. 70
- Figura 22 - Curvas do módulo de impedância em diferentes frequências em função da amplitude AC, utilizando como referência a medida realizada em amplitude de 1mV. O sistema eletroquímico usado nas medidas foi em solução NaClO_4 0,5mol/L e aplicando um potencial DC de 0,10V vs Ag|AgCl..... 71
- Figura 23 - Curvas do módulo de impedância em diferentes frequências em função da amplitude AC, utilizando como referência a medida realizada em amplitude de 1mV. O sistema eletroquímico usado nas medidas foi em solução NaClO_4 0,5 mol/L e aplicando um potencial DC de 0,25V vs Ag|AgCl..... 72
- Figura 24 - Voltamogramas cíclicos do eletrodo de ouro limpo em PBS 0,1mol/L (pH 7,4) (Au) e do eletrodo modificado com o (a) DNA condutor e (b) DNA isolante e bloqueados com 6-mercaptop-hexan-1-ol 20mmol/L em PBS 0,1mol/L (ds-DNAc e ds-DNAi) e em uma mistura de PBS 0,1mol/L (pH=7,4) com azul de metileno 100 μ mol/L (ds-DNAc_MB e ds-DNAi_MB). Medidas realizadas com velocidade de varredura de 100mV/s. Os potenciais E_1 e E_2 em destaque nas curvas representam

os potenciais de circuito aberto e redox do azul de metileno, respectivamente. Estes valores foram usados para realizar as medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica. 74

Figura 25 - Espectros de (a) impedância e (b) capacitância complexas no plano de Nyquist e espectros de capacitância (c) real e (d) imaginária no plano de Bode do eletrodo de ouro limpo (Au) e eletrodos modificados com DNA e bloqueados com 6-mercaptop-hexan-1-ol 20mmol/L em solução tampão fosfato salino (PBS) 0,1mol/L (ds-DNAi e ds-DNAc) e em uma mistura de PBS 0,1mol/L com azul de metileno 100µmol/L (ds-DNAi_MB e ds-DNAc_MB). Os dados foram obtidos em intervalo de frequência de 1MHz a 10mHz, potencial de oscilação de 10mV (*rms*), 12 pontos por década e tempo de estabilização de 300s. Medidas realizadas em pH=7,4. Os espectros para o eletrodo de ouro limpo foram obtidos apenas em 0,10 V vs Ag|AgCl (E_1) enquanto que os espectros do eletrodo modificado com ds-DNAi ou ds-DNAc foram obtidos em 0,10V vs Ag|AgCl (E_1) e em -0,19V vs Ag|AgCl (E_2), que é o potencial redox do azul de metileno. Os valores destacados para alguns pontos nos espectros de impedância e capacitância correspondem aos valores de frequência linear. OBS: Onde se lê C", leia-se - C"..... 77

Figura 26 - Espectros da razão entre a capacitância imaginária pela real no plano de Bode do eletrodo de ouro limpo (Au) e eletrodos modificados com DNA em solução tampão fosfato salino (PBS) 0,1mol/L (ds-DNAi e ds-DNAc) e em uma mistura de PBS 0,1mol/L com azul de metileno 100µmol/L (ds-DNAi_MB e ds-DNAc_MB). Os dados foram obtidos em intervalo de frequência de 1MHz a 10mHz, potencial de oscilação de 10 mV (*rms*), 12 pontos por década e tempo de espera de 300s. Medidas realizadas em pH=7,4. Os espectros para o eletrodo de ouro limpo foram obtidos apenas em 0,10V vs Ag|AgCl (E_1) enquanto que os espectros do eletrodo modificado com ds-DNAi ou ds-DNAc foram obtidos em 0,10V vs Ag|AgCl (E_1) e em -0,19V vs Ag|AgCl (E_2), que é o potencial redox do azul de metileno. OBS: Onde se lê C", leia-se - C"..... 80

Figura 27 - Voltamogramas cíclicos em PBS 0,1mol/L (pH 7,4) do eletrodo de ouro antes (Au) e depois (tiol) da modificação com 6-mercaptop-hexan-1-ol e também em PBS 0,1mol/L (pH 7,4) com azul de metileno 100µmol/L (MB) (tiol_MB). Há a resposta redox do MB em monocamadas auto-organizadas de 6-mercaptop-hexan-1-ol de acordo com o par de picos na curva tiol MB..... 82

Figura 28 - Representação esquemática dos sistemas ds-DNAc (à esquerda) e ds-DNAi (à direita) modificados com ferroceno e imobilizados na superfície do eletrodo de ouro. A tese levantada é exemplificada neste

esquema com a maior quantidade de elétrons que atravessam o DNA no sistema ds-DNAc. O comprimento de cada molécula também é apresentado..... 84

Figura 29 - Voltamogramas cíclicos em NaClO₄ 0,5M do eletrodo de ouro antes (Au) e depois (Tiol-Fc) da modificação com 6-ferrocenil-hexano-1-tiol. A separação entre picos redox do tiol com ferroceno de 7mV demonstra a reversibilidade do sistema estudado. Apresentado o último voltamograma cíclico de uma série de 3 ciclos. A área hachurada em azul corresponde à oxidação do ferro de todos os grupos ferroceno na superfície do eletrodo. Em outras palavras, a integral desta área se refere à densidade superficial de moléculas no eletrodo, que é igual a $7,5 \times 10^{12}$ moléculas/cm²..... 85

Figura 30 - Espectros de (a) impedância e (b) capacitância complexas no plano de Nyquist e espectros de capacitância (c) real e (d) imaginária no plano de Bode do eletrodo de ouro limpo (Au) e eletrodos modificados com Tiol-Fc, ou simplesmente Fc, em solução aquosa de NaClO₄ 0,5mol/L. Os dados foram obtidos em intervalo de frequência de 100kHz a 10mHz, potencial de oscilação de 10mV (rms), 12 pontos por década e tempo de espera de 300s. Os espectros de impedância e capacitância para o eletrodo de ouro limpo foram obtidos em 0,10V vs Ag|AgCl (E₁), fora da janela da reação redox do ferroceno, enquanto que os espectros do eletrodo modificado com Tiol-Fc foram obtidos também no potencial de meia onda de 0,36V vs Ag|AgCl (E₂). Os valores destacados para alguns pontos nos espectros de impedância e capacitância correspondem aos valores de frequência linear..... 87

Figura 31 - Ilustração da oxidação do grupo ferroceno e a formação do par iônico na monocamada autoorganizada de 6-ferrocenil-hexano-1-tiol imobilizada em eletrodo de ouro..... 88

Figura 32 - Capacitância redox, obtida a 1kHz, em função do potencial DC para o sistema 6-ferrocenil-hexano-1-tiol em meio aquoso de NaClO₄. A área da curva Gaussiana foi usada para calcular a densidade de estados, sendo de $2,9 \times 10^{13}$ estados/cm². O ajuste da curva Gaussiana apresentou χ^2 igual a 0,99..... 89

Figura 33 - Diagrama de orbital molecular do ferroceno com o ferro no estado de oxidação Fe²⁺..... 91

Figura 34 - Voltamogramas cíclicos do ds-DNAc e ds-DNAi em solução aquosa de 0,5mol/L de NaClO₄, realizadas entre -0,1 e +0,7V vs Ag|AgCl e em velocidade de varredura de 500mV/s. O ferroceno é reversivelmente oxidado quando uma varredura de potencial anódica

é aplicada no caso do ds-DNAc e tal processo não ocorre com o ds-DNAi. Os potenciais E_1 e E_2 em destaque nas curvas representam os potenciais de circuito aberto e redox do ferroceno ligado ao DNA, respectivamente. Estes valores foram usados para realizar as medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica. A área hachurada é proporcional à densidade de carga fornecida para reduzir os grupos ferroceno oxidados e, conseqüentemente, o número de moléculas de DNA na superfície do eletrodo. De acordo com as áreas dos picos de oxidação, ds-DNAc e ds-DNAi possuem, respectivamente, $4,8 \times 10^{12}$ e $7,2 \times 10^{11}$ moléculas/cm². 93

Figura 35 - A curva de densidade de corrente do pico catódico do ds-DNAc em função da velocidade de varredura indica um processo de transferência de carga controlado por adsorção conforme indicado pela relação direta entre os parâmetros. 94

Figura 36 - Espectros de (a) impedância e (b) capacitância complexas no plano de Nyquist e espectros de capacitância (c) real e (d) imaginária no plano de Bode do eletrodo de ouro limpo (Au) e eletrodos modificados com ds-DNAi e ds-DNAc em solução aquosa de NaClO₄ 0,5mol/L. Os dados foram obtidos em intervalo de frequência de 100kHz a 10mHz, potencial de oscilação de 10mV (rms), 12 pontos por década e tempo de espera de 300s. Os espectros de impedância e capacitância para o eletrodo de ouro limpo foram obtidos apenas em 0,10V vs Ag|AgCl (E_1), fora da janela da reação redox do ferroceno, enquanto que os espectros do eletrodo modificado com ds-DNAi ou ds-DNAc foram obtidos também no potencial de meia onda de 0,25V vs Ag|AgCl (E_2). Os valores destacados para alguns pontos nos espectros de impedância e capacitância correspondem aos valores de frequência linear e as linhas são os ajustes das curvas realizadas pelo programa Zview. 96

Figura 37 - Capacitância redox em função do potencial DC. O valor de C_r (refletindo o DOS da molécula de ferroceno ancorado ao DNA) foi calculado seguindo os procedimentos previamente descritos [64, 132] e a área da curva Gaussiana foi usada para obter a densidade de estados. Para melhor resolução os dados foram corrigidos considerando os termos parasíticos não faradaicos [64, 128, 132]. Os ajustes das curvas Gaussianas para estes dados são bons ($\chi^2 = 0,99$). A maior área da Gaussiana para ds-DNAc em comparação ao ds-DNAi é reflexo de elevada transmitância eletrônica e maior quantidade de DOS ocupados. 97

Figura 38 - Comparação dos perfis de capacitância redox (Tiol-Fc e ds-DNAs) em função do potencial DC. 98

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Valores médios de $|Z|/|Z|_{\text{ampl.} = 1\text{mV (rms)}}$ em função da amplitude do potencial AC, obtidos para eletrodos de ouro em solução tampão fosfato salino (PBS) 0,1mol/L, pH 7,4, e aplicando um potencial DC de 0,1 V vs Ag|AgCl. 69
- Tabela 2 - Valores médios de $|Z|/|Z|_{\text{ampl.} = 1\text{mV (rms)}}$ em função da amplitude do potencial AC, obtidos para eletrodos de ouro em solução de PBS 0,1mol/L e aplicando um potencial DC de 0,25V vs Ag|AgCl. 70
- Tabela 3 - Valores médios de $|Z|/|Z|_{\text{ampl.} = 1\text{mV (rms)}}$ em função da amplitude do potencial AC, obtidos para eletrodos de ouro em solução de NaClO₄ 0,5mol/L e aplicando um potencial DC de 0,10V vs Ag|AgCl..... 72
- Tabela 4 - Valores médios de $|Z|/|Z|_{\text{ampl.} = 10\text{mV (rms)}}$ em função da amplitude do potencial AC, obtidos para eletrodos de ouro em solução de NaClO₄ 0,5mol/L e aplicando um potencial DC de 0,25V vs Ag|AgCl..... 73

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	20
1.1	DNA: Estrutura e Propriedades	23
2	ESTADO DA ARTE NA CONDUÇÃO ELÉTRICA DE FITAS DUPLAS DE DNA	26
2.1	Condução elétrica do DNA: pensamentos que não convergem	26
2.1.1	Mecanismos de condução	29
2.2	Uso de medidas elétricas para explorar erros no pareamento e mudanças na conformação do DNA.....	32
2.3	Transferência eletrônica em eletrodos metálicos revestidos por filmes	33
2.4	Transferência eletrônica em moléculas imobilizadas com um sítio redox.....	37
2.5	Espectroscopia de Impedância eletroquímica	40
2.5.1	Capacitância: eletrostática, redox, química e quântica	43
2.5.2	Imobilização de Moléculas de DNA	51
3	OBJETIVOS.....	54
4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	54
4.1	Monocamadas de tiol e de DNA em solução de azul de metileno	55
4.1.1	Materiais	55
4.1.2	Preparação do eletrodo de trabalho	56
4.1.3	Imobilização das moléculas	58
4.1.4	Medidas Eletroquímicas.....	59
4.2	Monocamadas de DNA modificadas com um grupo ferroceno.....	60
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
5.1	Testes preliminares de EIS para delimitar o intervalo de frequência e a escolha da amplitude de potencial AC.....	65
5.2	Monocamadas de tiol e de DNA: resposta eletroquímica em solução de azul de metileno.....	73
5.3	Monocamadas de DNA modificadas com um grupo ferroceno.....	83
6	CONCLUSÃO	99
	REFERÊNCIAS	100

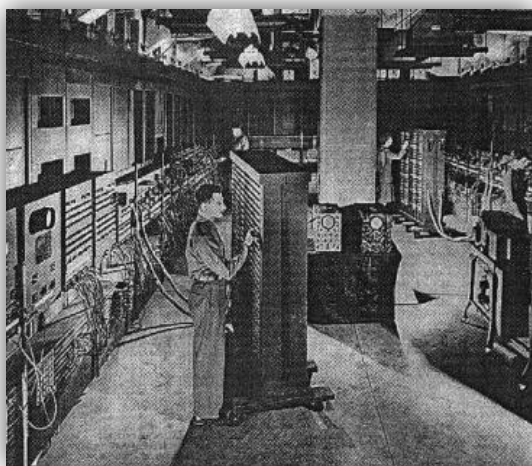
1 INTRODUÇÃO

Na atualidade os computadores possuem dimensões bastante reduzidas quando comparados com os computadores de décadas anteriores, devido aos avanços da nanotecnologia.

Em 1936, o computador Z-1, construído pelo engenheiro alemão Konrad Zuse, fazia os cálculos e lia os dados em fitas perfuradas. Contudo, na Figura 1a é mostrada a conhecida fotografia do primeiro computador desenvolvido pelo exército dos Estados Unidos, o computador ENIAC, que tinha por objetivo calcular as trajetórias de mísseis com maior precisão. Este computador ocupava várias salas, pesava 30 toneladas, consumia 0,25 MW/h de energia e fazia centenas de operações por segundo [1-3].

Figura 1 - Evolução dos equipamentos eletrônicos. a) Primeiro computador datado de 1946 e b) o smart watch, o menor computador pessoal do mundo.

a)



b)



Fonte: ref. [3] para Figura 1a e ref. [4] para Figura 1b.

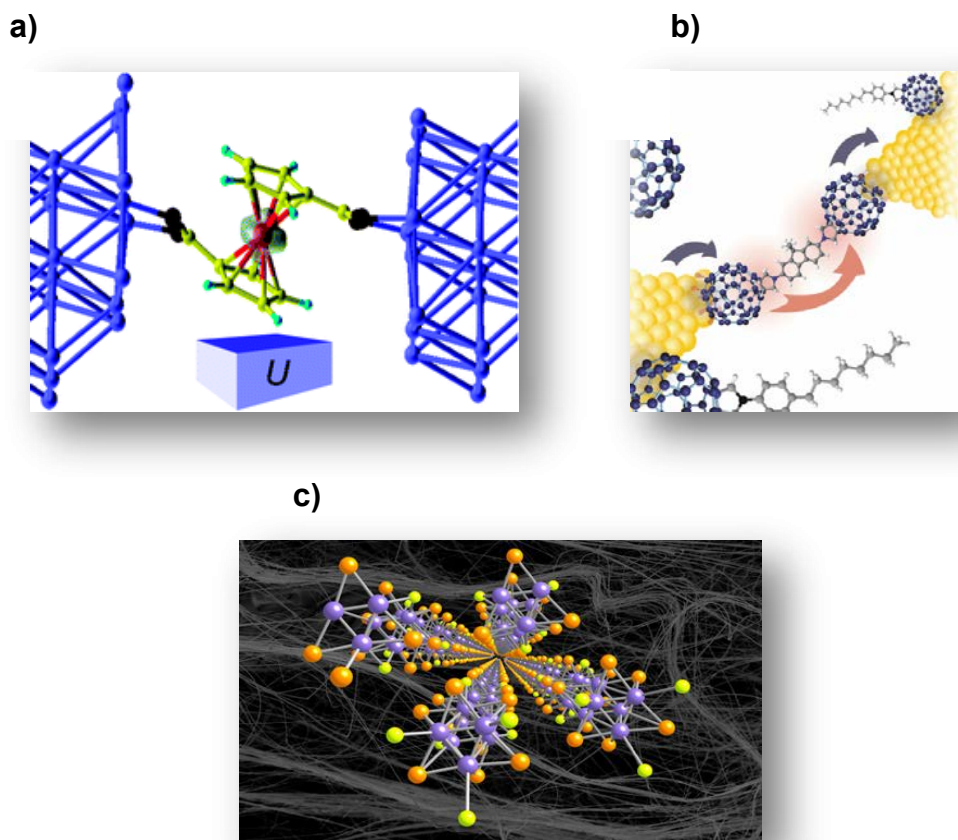
Agora os computadores do século XXI pesam poucos quilos, consome alguns W/h e realizam bilhões de operações por segundo. Para exemplificar este processo rápido de miniaturização decorrente dos avanços da nanotecnologia, recentemente

várias empresas estão fabricando o relógio inteligente (do inglês, *Smart Watch*) com diversas funções de um computador, o que seria o menor computador pessoal do mundo conforme ilustrado na Figura 1b. Observando-se que este aparelho eletrônico ocupa um espaço de poucos centímetros quadrados contra dezenas de metros quadrados do mais antigo devido à diminuição dos componentes eletrônicos.

Com esta diminuição do tamanho, é preciso também o desenvolvimento de conexões cada vez menores, atingindo-se um limite na tecnologia de confecção de fios metálicos ultrafinos. O problema com este tipo de fios está relacionado com o manuseio, pois seriam rompidos com a aplicação de uma pequena tensão. A nanolitografia, um ramo da nanotecnologia que estuda e aplica conceitos de fabricação de estruturas nanométricas, poderia resolver o problema de contato entre dispositivos com estas dimensões, contudo o efeito quântico de tunelamento poderia curto-circuitar os dispositivos pela falta de isolamento da conexão. Desta maneira, o uso de fios moleculares, que são objetos com dimensões de moléculas que conduzem a corrente elétrica, é a estratégia mais vantajosa para realizar as conexões [5]. Assim, existe um interesse crescente por fornecer ferramentas que descrevam os efeitos relacionados com a transferência de elétrons a nível molecular em sistemas biológicos e/ou sintéticos [6].

Os fios moleculares mais comuns baseiam-se em moléculas orgânicas. Como principais exemplos descritos na literatura encontram-se os nanotubos de carbono, diversos polímeros e vários fios moleculares inorgânicos, como ilustrado na Figura 2 [7].

Figura 2 - Ilustração de alguns fios moleculares existentes. a) ferroceno entre contatos de alumínio, b) condução por fulerenos, c) fio inorgânico.



Fonte: ref. [8], [9] e [10] referentes as Figuras 2 a), 2b) e 2c), respectivamente.

Um exemplo de uma biomolécula que possui característica de fio molecular é o DNA [11]. O DNA é composto por unidades repetitivas, os nucleotídios. Estes últimos possuem três componentes característicos: uma base nitrogenada (púricas ou pirimídicas), uma pentose e um fosfato. Os nucleotídios são unidos covalentemente por meio de ligações de grupos fosfatos, em que o grupo fosfato do carbono 5' do nucleotídio está ligado ao grupo hidroxila do carbono 3' do nucleotídio seguinte, criando uma ligação fosfodiéster [12]. Este esqueleto de açúcar e fosfato do DNA serve como isolamento do fio condutor. O uso desta biomolécula limita o diâmetro dos fios, também chamados de fios quânticos, em 2 nm. Além do uso como fio molecular, a condução elétrica da molécula de DNA visa o entendimento dos danos e reparos à biomolécula por processos redox. Alterações nas bases por reações químicas ou fotoquímicas podem vir a causar mudanças permanentes na

informação genética codificada. Ainda não foi comprovado que estes processos, chamados de mutações genéticas, são os prováveis responsáveis pelo envelhecimento e doenças associadas ao câncer. Este aspecto é importante para o desenvolvimento de biossensores baseados no reconhecimento de genes e defeitos genéticos, também chamados de genossensores [13-14]. A imobilização de uma fita simples de DNA sobre um suporte que tem como objetivo identificar/quantificar o processo de hibridização de acordo com o sinal do transdutor é a definição mais precisa de um genossensor. Nota-se que o entendimento da transferência eletrônica através do DNA pode melhorar o desempenho dos genossensores e desenhar conectores moleculares cada vez mais eficientes.

Contudo, a verificação do comportamento elétrico de fitas duplas de DNA não é algo trivial, pois a literatura ainda não chegou a um consenso se esta biomolécula é um material isolante [15-18], semicondutor [19-20], condutor [21-23] ou um supercondutor [24], isto porque a configuração experimental não é variada em um único trabalho. Com o intuito de complementar o conhecimento já descrito na literatura, neste trabalho de Doutorado realizou-se o estudo da condução elétrica em fitas duplas de DNA por espectroscopia de impedância eletroquímica, pois são poucos os trabalhos que utilizam de modo mais aprofundado esta técnica no contexto em questão. Antes de descrever a técnica e como aplicá-la para estudar a condução da referida molécula, é importante contextualizar de maneira geral a estrutura e propriedades do DNA, a biomolécula da vida.

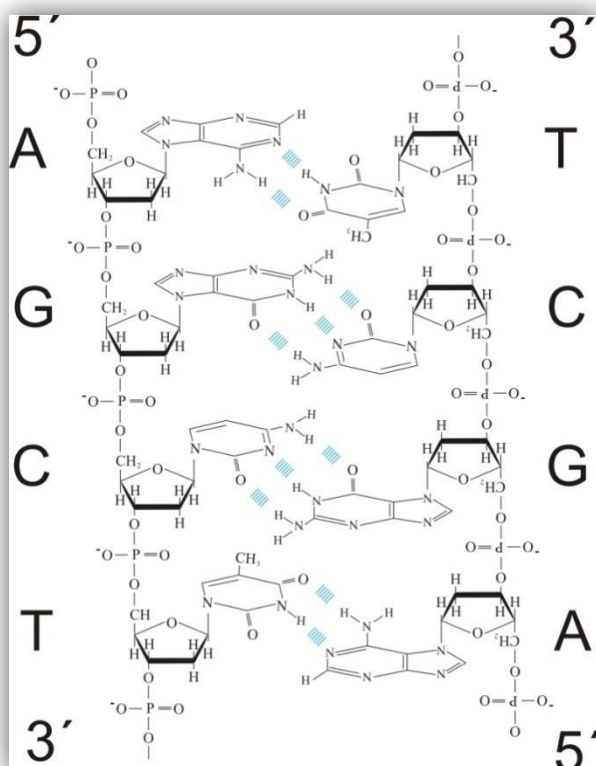
1.1 DNA: Estrutura e Propriedades

O estudo do DNA ficou marcado com a revelação de sua estrutura tridimensional em 1953 por James Watson e Francis Crick, como ilustrado na Figura 3 [25]. O ácido desoxirribonucleico é um polímero constituído de duas fitas de desoxirriboses (açúcar) e grupos fosfatos intercalados formando uma cadeia principal e bases púricas (Guanina-G ou Adenina-A) ou pirimídicas (Timina-T ou Citosina-C) fazendo uma ligação β glicosídica no carbono 1' do açúcar. As fitas ficam coesas por interações entre as bases de cada fita de modo que o pareamento das bases dá-se por ligações de hidrogênio de G com C (3 ligações) e de A com T (2 ligações). Esta interação provoca a rotação da molécula e a formação de uma dupla

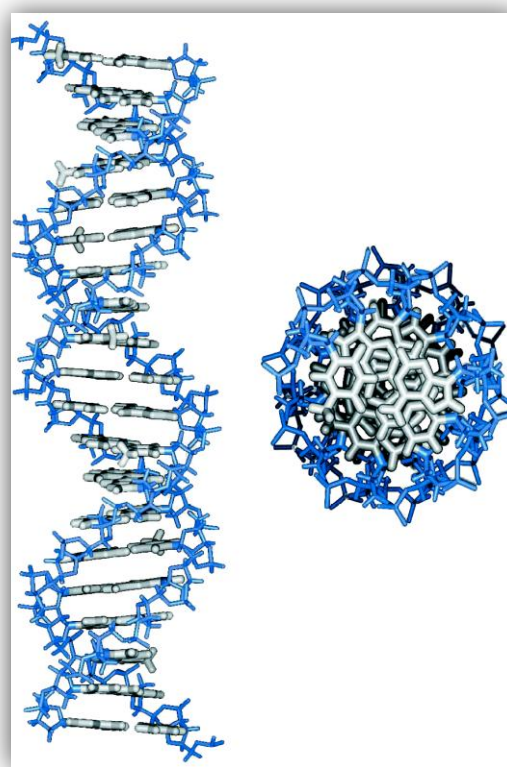
hélice com o sentido da mão direita. As bases nitrogenadas de ambas as fitas estão empilhadas dentro da dupla hélice, com suas estruturas hidrofóbicas de anéis praticamente planares muito próximas e perpendiculares ao longo do eixo. As fitas da dupla hélice são antiparalelas, o que significa que as ligações 5', 3'-fosfodiéster de cada fita ocorrem em sentidos opostos [25].

Figura 3 - Modelo do DNA a) na forma bidimensional para explicitar as ligações de hidrogênio entre os pares de bases complementares. Note que as fitas simples de DNA são formadas na região externa da dupla hélice por grupos fosfatos alternados por moléculas de desoxirribose. A parte interna da dupla hélice é constituída das bases nitrogenadas púricas e pirimídicas empilhadas muito próximas e perpendiculares ao longo do eixo da molécula. Devido a estas interações e ligações, a molécula de DNA possui uma b) geometria tridimensional de dupla hélice em que o empilhamento das bases nitrogenadas podem ser observadas na vista superior da biomolécula.

a)



b)

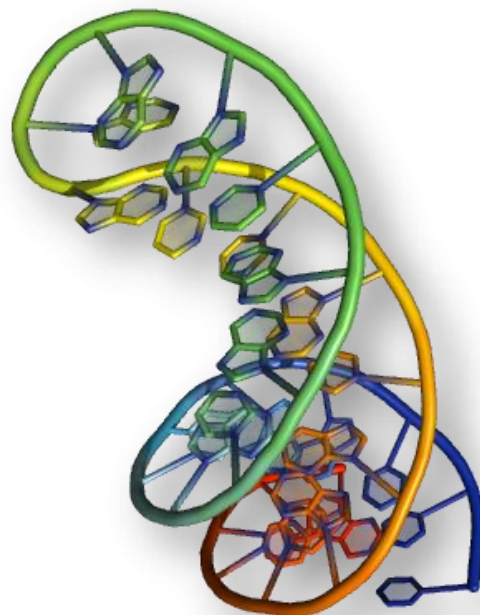
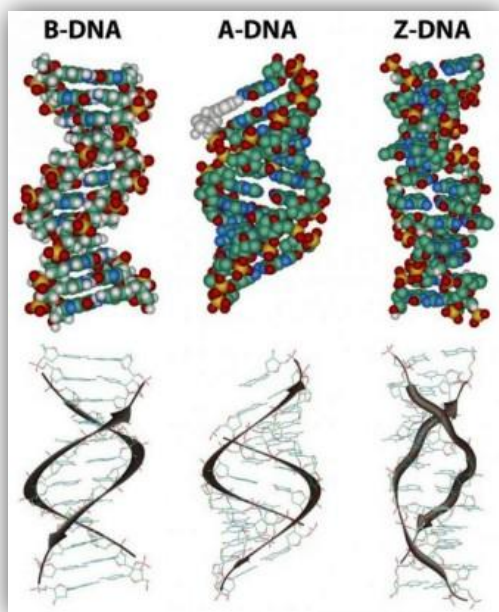


Fonte: a) autor e b) referência [26].

A molécula de DNA apresentada na Figura 3 é chamada de forma B do DNA (B-DNA), para este tipo de DNA uma volta completa de rotação ocorre a cada 10,5 pares de bases, no entanto esta não é a única que pode ser formada. Devido à livre

rotação de diferentes ligações, a variação de temperatura pode provocar curvaturas, estiramento ou até o não pareamento das fitas (processo chamado de fusão ou desnaturação). Outra forma é o Z-DNA que possui como principal característica a dupla hélice com o sentido da mão esquerda. Sequências de purinas e pirimidinas alternadas favorecem este tipo de estrutura. Outras sequências de nucleotídeos adotam estruturas não convencionais como grampos, alças, cruzes ou são destacadas por apresentarem certa simetria como no caso de palíndromos ou repetições em espelho [12]. As conformações discutidas estão ilustradas na Figura 4. Estas diferenças na conformação são importantes na regulação gênica. Alterações nas bases por reações químicas ou fotoquímicas podem vir a causar mudanças permanentes na informação genética codificada. Acredita-se que estes processos, chamados de mutações genéticas, são os prováveis responsáveis pelo envelhecimento e doenças associadas ao câncer [12].

Figura 4 - Diversas conformações da molécula de DNA: A-DNA, B-DNA, Z-DNA e grampo.



Fonte: referências [27-28].

Estudos com diversas sequências de nucleotídeos reportaram que a condutividade do DNA depende da sequência de nucleotídeos [29-31]. As bases púricas ou pirimídicas estão empilhadas na fita de modo que os elétrons π de uma

base interagem com os elétrons π da base superior e/ou inferior. Portanto, qualquer modificação relacionada aos nucleotídeos e/ou a conformação do DNA acarreta na variação do recobrimento dos orbitais π e, como consequência do rearranjo eletrônico, o comportamento elétrico é alterado [32-35].

2 ESTADO DA ARTE NA CONDUÇÃO ELÉTRICA DE FITAS DUPLAS DE DNA

2.1 Condução elétrica do DNA: pensamentos que não convergem

O comportamento elétrico do DNA até o momento ainda é um grande alvo de debate. Existem trabalhos para cada tipo de característica: isolante [15-18], semicondutor [19-20], condutor [21-23] e supercondutor [24], tanto para aqueles que realizam trabalhos teóricos quanto experimentais.

Em 1986, Bakhshi e colaboradores [34] estudaram a densidade de estados eletrônicos (DOS, do inglês, *Density of States*, é a descrição do número de estados, ou níveis de energia dos elétrons incluindo o momento de spin, por unidade de energia no intervalo disponível da amostra) em DNA de fita simples com as 4 bases nitrogenadas dispostas periodicamente, de maneira aleatória e em fragmentos de gene humano (gene da família *Alu* isolada do DNA de fígado fetal). Explicaram também a relação entre as curvas de DOS obtidas pela metodologia de contagem de fator negativo (NFC, do inglês, *Negative Factor Counting method*) *ab initio* e as propriedades de condução elétricas do DNA. Assim, quando a fita do ácido nucleico possui as bases ordenadas de modo periódico, as densidades de estados aparecem como bandas bastante estreitas na região da banda de valência e de condução. Isto significa que a energia dos estados são restritas a um intervalo pequeno de energia. Na medida em que o sistema perde a periodicidade, o ambiente químico, que era o mesmo para cada base nitrogenada, é alterado e, como consequência, há um alargamento das bandas do DOS de sistemas aperiódicos e uma pequena diminuição da energia de *band gap* (região compreendida entre as bandas de valência e de condução) [34]. Os sistemas aperiódicos possuem praticamente o mesmo perfil de DOS e podem ser identificados em uma sequência qualquer de um gene. As bandas largas do DOS destes sistemas poderiam transportar carga efetiva via *hopping*, porém um conjunto de dados considerando o efeito da água, do meio

ambiente de íons e de outros fatores como interações com proteínas ainda seriam necessários para definir a possibilidade de condução por *hopping*. Esta conclusão é obtida a partir da análise de dados de transferência de carga descritos na literatura, podendo descobrir a posição do nível de Fermi e as propriedades locais dos estados de energia ao redor e identificando assim a maior probabilidade de transporte de carga via *hopping*.

Song e colaboradores [35] propuseram que o DNA pode possuir características elétricas de um condutor, semicondutor ou isolante após analisar a banda de energia e a densidade de estados dos elétrons no DNA, assim como também a variação da energia do *band gap* em função do número de elétrons itinerantes (elétrons de valência ou também chamados de elétrons de fronteira). Três casos foram estudados: a molécula de ácido nucleico com duas formas de parear as bases nitrogenadas (G/C e A/T), com quatro formas de pareamento (G/C, A/T, C/G e T/A) dispostas periodicamente e a terceira em que o pareamento era desordenado. No primeiro caso, a molécula de DNA tende a se comportar como um condutor ou semicondutor dependendo da razão (N_e/N) entre elétrons itinerantes (ou deslocalizados, N_e) e elétrons totais (N). No segundo caso, a molécula possui um comportamento que, majoritariamente, será de um semicondutor. Já para o último caso, na cadeia de DNA desordenada, a tendência é ser um semicondutor ou um isolante [35].

Para os trabalhos experimentais, o comportamento isolante pode ser destacado pelos trabalhos de Storm et al. [16] e Zhang et al. [15], a característica semicondutora ressaltada por Porath et al. [20] e a alta condutividade das fitas de DNA mostradas nos resultados de Fink et al. [22] e Kelley et al. [21], como segue.

O trabalho de Storm et al. [16] consistiu em realizar medidas elétricas do DNA de fita dupla usando nanoeletrodos e fora de um meio aquosa. Uma resistência de $10T\Omega$ foi obtida para fitas de DNA de comprimento superior a 40nm, indicando que o DNA é um material isolante. Kleine-Ostmann e colaboradores [36] apresentaram resultados que mostravam o efeito da quantidade de água na condutividade de fitas simples ou duplas de DNA, encontrando que a condutividade cresce exponencialmente com o aumento da umidade e estando em concordância com o

estudo teórico de Zhang e Wang [37] a respeito da mudança da estrutura do DNA em função do solvente. Como comentado anteriormente, a conformação do DNA é crucial para descrever a sua condutividade, haja vista que ela está relacionada com o empilhamento das bases nitrogenadas. Desta maneira, deve-se ter em mente que não se pode afirmar nada a respeito da condução elétrica desta molécula biológica sem que sejam destacadas as condições nas quais foram realizados os estudos, pois o meio em que são feitas as medidas são determinantes para o comportamento elétrico.

Porath et al. [20] e Storm et al. [16], caracterizaram o DNA como um material semiconductor, pois uma pequena região não-linear (em intervalo de potencial de -2V a +2V) foi notada na resposta de corrente em função do potencial. Entretanto, as medidas foram feitas a vácuo de 10^{-6} mbar, evaporando qualquer água que houvesse mesmo em baixas temperaturas (abaixo de -20°C). A diferença entre os dois trabalhos em questão está no tamanho da fita de DNA. Porath e colaboradores utilizaram uma fita de 10,4nm, enquanto que Storm et al. uma fita de comprimento superior a 40nm. O aumento da cadeia de DNA também pode contribuir para a caracterização de um comportamento isolante. O artigo de Zhang et al. [15] corrobora esta tendência em que se mediu valores elevados de resistividade (maiores do que $10^6\Omega\text{cm}$) para um tipo de DNA com comprimento de aproximadamente $16\mu\text{m}$. Quanto maior a cadeia de DNA, maior é a sua flexibilidade, menor o recobrimento entre os orbitais π de bases adjacentes e menor condução elétrica, conseqüentemente.

O comportamento condutor do DNA foi relatado no artigo de Kelley e colaboradores [21] em que as medidas foram realizadas em meio aquoso e na presença do composto intercalante daunomicina (DM). Os voltamogramas apresentados mostraram a importância do empilhamento das bases nitrogenadas para a condutividade do DNA a longo alcance. O pico de óxido-redução presente no sistema totalmente complementar desaparece ao inserir um erro no pareamento do oligonucleotídios, indicando a interrupção do fluxo de elétrons através do DNA.

Pode ser notado que os debates sobre o comportamento elétrico do DNA nunca irão cessar, pois as condições experimentais em que se pode realizar as

medidas é muito ampla. Todavia, parece que a conformação do DNA é um dos pontos-chaves para a pesquisa nesta área. Não se pode esquecer que existem outras peculiaridades do sistema que devem ser consideradas e que não foram discutidas nesta seção como, por exemplo, o conteúdo de cada base nitrogenada, além da disposição delas, a qual foi brevemente discutida. Para maior entendimento e esclarecimento do comportamento elétrico, os mecanismos de condução propostos para o DNA serão abordados.

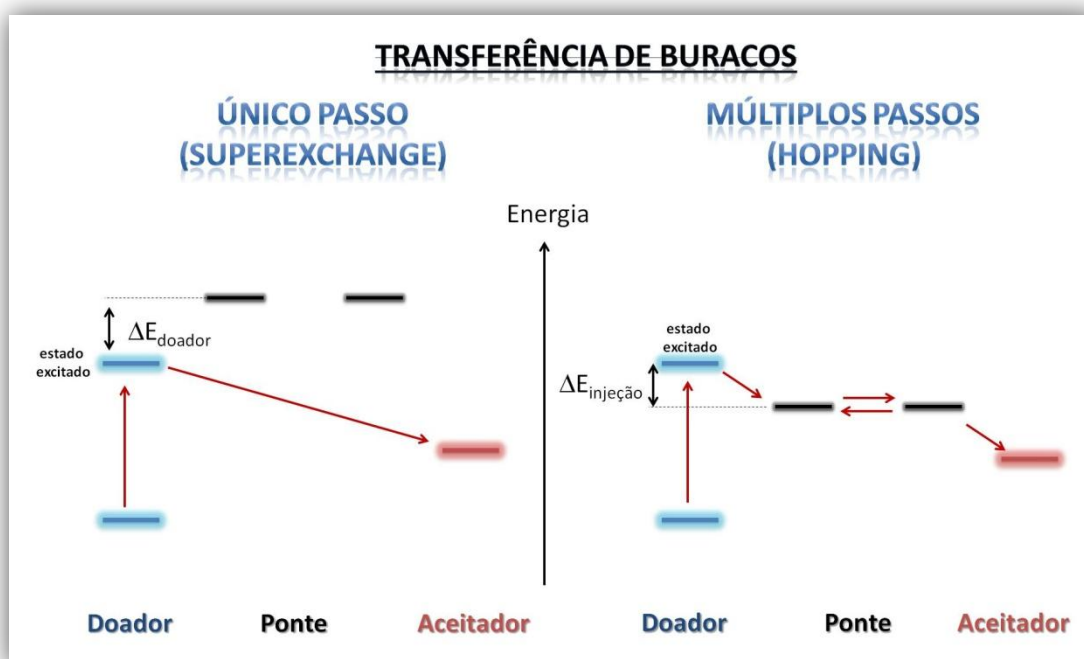
A hipótese de que moléculas de DNA com maior conteúdo de GC são mais condutoras é suportada pela literatura, em que o transporte de carga em ds-DNA (termo em inglês, *double-stranded DNA*) é uma função da distância entre os pares de bases GC, na qual a velocidade de transferência eletrônica diminui cerca de uma ordem de grandeza com cada par de base AT adicionado [38-39]. O aumento da quantidade de adenina e timina causa um decréscimo exponencial da resposta elétrica e, portanto, os sítios AT são conhecidos como barreiras de condução [40-42]. Então, é esperado que o fluxo de carga seja facilitado em poli(dG)-poli(dC) (ds-DNA_c ou DNA condutor) comparado com poli(dA)-poli(dT) (ds-DNA_i ou DNA isolante). Dentre as sequências de DNA com maior conteúdo de GC, aquelas em que uma fita simples é composta apenas de G e a outra de C é a que possui maior condução elétrica [43].

2.1.1 Mecanismos de condução

O processo de transferência eletrônica é influenciado pelo acoplamento eletrônico dos grupos aceitador/doador com a ponte de DNA, a força motriz do processo de transferência eletrônica e a energia de reorganização. De maneira geral, o primeiro e segundo parâmetro levantado são resumidos no trabalho de Gorodetsky, Buzzeo e Barton [44], no qual o acoplamento entre o DNA e uma sonda redox por ligações insaturadas e conjugadas permite a transferência eletrônica enquanto que o uso de ligações saturadas resulta em mau acoplamento. Os diferentes tipos de sondas com propriedades redox fornecem respostas eletroquímicas em potenciais distintos. No último ponto destacado, a polarização dos grupos aceitador/doador e a constante dielétrica do meio em que o sistema está inserido são alguns dos pontos importantes [45]. A forma como o transporte das

cargas é efetuada depende dos níveis de energia do orbital de fronteira do grupo doador ou aceitador de carga e dos níveis de energia da molécula de DNA, o qual serve de ponte para transferir esta carga para o grupo aceitador, como apresentado na Figura 5. Isto vai definir se a condução será de curto alcance, por mecanismo envolve um único passo (*superexchange*), ou longo alcance envolvendo um mecanismo de múltiplos passos (*hopping*).

Figura 5 - Mecanismo de transporte de carga a curto (*superexchange*) e longo alcance (*hopping*) de buracos e elétrons. Note que o mecanismo é definido pela posição dos níveis de energia da ponte como, por exemplo, a molécula de DNA.

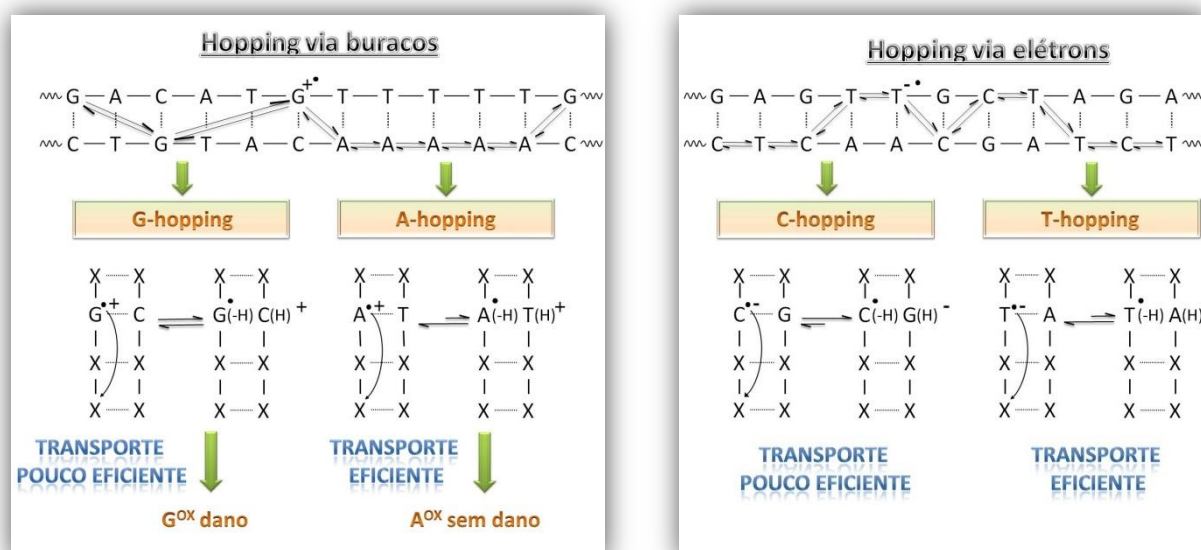


Fonte: adaptado da ref. [46].

No *superexchange*, os estados de energia da ponte de DNA estão acima daqueles apresentados pelo grupo doador e a carga é transferida por um salto coerente desde o grupo doador para o grupo aceitador e nunca está localizado na ponte. Já para o *hopping*, devido às semelhanças energéticas dos estados de energia entre o doador e a ponte, o elétron está localizado dentro do DNA e move-se incoerentemente até o grupo aceitador. A designação de longo alcance é utilizada para transferências de cargas que ultrapassem distâncias de 4 bases nitrogenadas e que, segundo alguns trabalhos da literatura, podem chegar a 20nm [47].

Pensando em cargas, o transporte pode ser efetuado por cargas negativas (elétrons) ou positivas (buracos, que significa a falta de um elétron), dependendo da natureza do grupo doador de carga. Estas espécies podem ser criadas no DNA com o uso de agentes redutores [48] ou oxidantes [49-51], respectivamente, e algumas vezes com o auxílio de luz para a ação dos compostos fotoinduzidos. A transferência de cargas pode ser feita por buracos (principalmente pelas bases púricas guanina e adenina) e elétrons (majoritariamente pelas bases nitrogenadas pirimídicas citosina e timina). O transporte de cargas a longa distância, via *hopping*, pode ser realizada por buracos ou elétrons, cujo mecanismo está ilustrado na Figura 6.

Figura 6 - Mecanismo de transporte via *hopping* de buracos e elétrons e sua eficiência de transporte.



Fonte: adaptado da ref. [46].

O primeiro tipo, que é por buracos, pode ocorrer por meio da transferência de carga entre guaninas ou entre adenosinas. Pelo mais baixo potencial de oxidação da guanina dentre as bases nitrogenadas, existe maior probabilidade de condução dos buracos pelas guaninas. Contudo, caso haja a oxidação da adenina, a transferência de carga via *hopping* é um processo rápido, podendo ocorrer através de várias adeninas consecutivas [52]. A transferência de cargas entre fitas acontece na mesma velocidade da transferência de H entre os pares de bases e, como consequência, pode influenciar na eficiência do transporte pelo DNA. Isto depende

da constante de acidez de cada base, em que a diferença de pK_a entre A e T é maior do que em G e C, promovendo um transporte via *hopping* mais eficiente por A [53] em relação à G e provocando danos ao DNA pela oxidação da guanina. O transporte por elétrons não é completamente entendido na literatura e os mecanismos e processos de transporte usados para descrevê-lo são emprestados do transporte de cargas por buracos [46]. No transporte via *hopping* de elétrons os carreadores intermediários são os ânions radicalares pirimídicos de citosina e timina devido aos menores potenciais de redução entre as 4 bases nitrogenadas do DNA [54]. A transferência de H também interfere no processo de transporte de elétrons através do DNA, fazendo com que o íon radical de timina possua um transporte mais eficiente em comparação ao ânion radical de citosina.

Os grupos doadores/aceitadores podem ser diversos, como moléculas de transferência eletrônica fotoinduzida [49] ou com propriedades eletroquímicas [1] (moléculas eletroativas ou moléculas redox). No caso em que elas possuam um centro redox, as moléculas podem ser do tipo intercalador [26, 55-56] (livre em solução) ou estar acoplado [44,57] ao DNA por ligações covalentes insaturadas e conjugadas. Ainda existe a possibilidade do grupo estar ligado ao DNA, mas ser um centro redox intercalante [58].

2.2 Uso de medidas elétricas para explorar erros no pareamento e mudanças na conformação do DNA

Sabe-se que o DNA possui uma forma helicoidal desde a descoberta de sua estrutura tridimensional por James Watson e Francis Crick [25], como descrito na Seção 1.1. Todavia, a forma helicoidal pode ter diferentes conformações, as quais já foram identificadas na literatura e podem exibir um papel importante na regulação da expressão gênica [59]. A identificação das diferentes conformações pode ser feita pelo uso de complexos quirais [59]. No caso da hibridização em biologia molecular normalmente utiliza marcadores, sejam eles radioativos ou não [48,60]. No entanto, ensaios livres de marcadores são bastante interessantes, pois diminuem os custos nas análises. Neste contexto, a empresa Toshiba criou um sistema para monitorar o processo de hibridização e sua identificação pelo método eletroquímico feito pelo *DNA Detection System GenelyzerTM* [61]. Conforme relatado, os chips de DNA

podem ser aplicados em diagnósticos de doenças infecciosas, previsão da eficácia de drogas e efeitos colaterais e diagnóstico/prognóstico de doenças com o intuito de “realizar um tratamento médico personalizado”. Além disso, eles também podem ser usados em inspeções de alimentos, autenticação pessoal e contra o bioterrorismo. O princípio usado envolve a medida da corrente com a aplicação de uma diferença de potencial sobre o chip de DNA. A aplicação da diferença de potencial permite a intercalação de uma espécie eletroativa à fita dupla de DNA, que surge pela hibridização da fita totalmente complementar à fita simples de DNA imobilizada no chip. Por ser um produto de mercado, não está descrita qual a técnica eletroquímica usada na análise nem maiores detalhes do seu funcionamento.

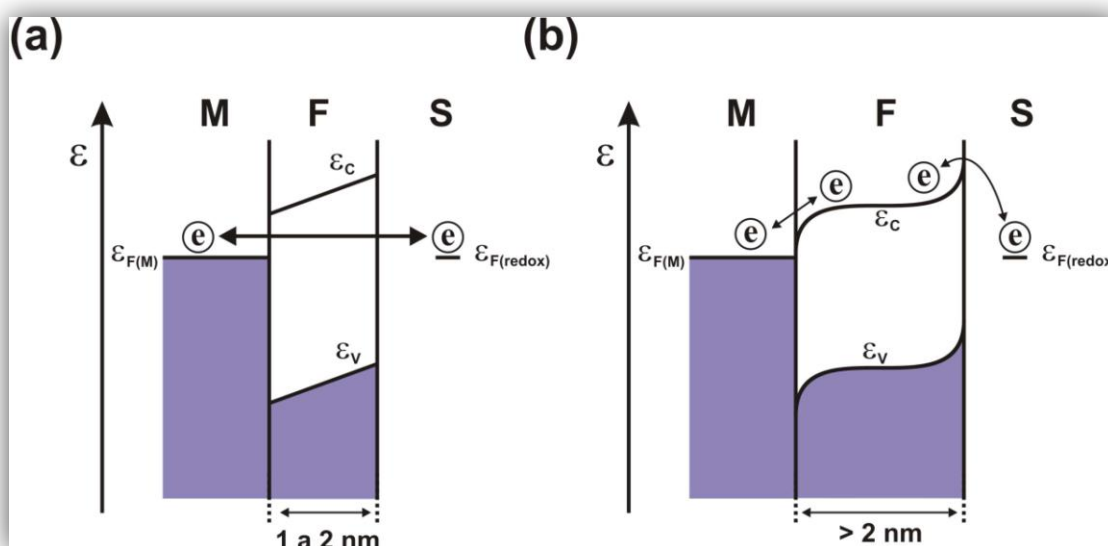
Uma metodologia similar foi apresentada por Kafka e colaboradores [62]. O trabalho visa diferenciar os processos de hibridização em moléculas pequenas de DNA com o pareamento totalmente complementar daquele com erros no pareamento por espectroscopia de impedância eletroquímica. Os autores introduzem, primeiramente, a necessidade de testes de reconhecimento de sequências específicas de DNA que sejam simples, rápidas e sensíveis, para a aplicação na área forense, indústria de alimentos e em análises clínicas para a detecção/identificação de patógenos ou doenças geneticamente conhecidas. Eles comentam que tal tipo de teste é atualmente realizado pela hibridização de fitas complementares de DNA em que a análise pode ser feita por diversas técnicas, sendo destacadas as técnicas eletroquímicas devido às características relatadas anteriormente. Como comentado no sistema comercializado pela Toshiba, sistemas eletroquímicos comumente requerem espécies eletroativas, sejam compostos orgânicos ou complexos metálicos, para detectar o processo de hibridização. O uso dos indicadores redox complica a detecção do processo e encarece a análise. Assim, técnicas que não utilizam marcadores para tal finalidade são mais vantajosas e, neste contexto, a espectroscopia de impedância foi escolhida para ser usada neste trabalho de doutorado devido à capacidade de avaliar fenômenos de interface.

2.3 Transferência eletrônica em eletrodos metálicos revestidos por filmes

Ao adicionar ou formar um filme de um material semicondutor sobre a superfície do eletrodo metálico, a transferência de elétrons para as espécies em

solução ocorrerá de modo diferenciado dependendo da espessura deste filme. Quando o filme é bastante fino (até 2nm), a transferência eletrônica acontece diretamente entre o eletrodo e a espécie eletroativa por meio do mecanismo de tunelamento. Na medida em que a espessura do filme aumenta, a probabilidade de transferência eletrônica por tunelamento diminui. Desta maneira, há uma transferência indireta em que os níveis de energia do filme na superfície do eletrodo irão determinar este processo [63]. A Figura 7 ilustra as duas situações descritas acima.

Figura 7 - Ilustração dos modos de transferência eletrônica em função da espessura do filme sobre o eletrodo metálico: (a) transferência direta por efeito túnel e (b) transferência indireta em que as propriedades elétricas do filme definem o processo.



Fonte: Adaptado da ref. [63].

A adição da monocamada autoorganizada de tiol sobre a superfície de ouro é semelhante a um filme fino em que ocorre o mecanismo de tunelamento. Porém, quando este filme de tiol possui também fragmentos de DNA ou oligonucleotídeos, o filme sobre o eletrodo tem dimensão superior a 2nm. Isto significa que há transferência eletrônica indireta neste último caso e o processo dependerá dos níveis de energia da molécula de DNA. Desta maneira, modificações físico-químicas da molécula de DNA (troca de base nitrogenada, erros de pareamento, interação

com proteínas entre outros) que acarretam na mudança de sua condutividade podem ser avaliadas [63].

Considerando o primeiro caso, a transferência direta, a probabilidade de tunelamento $\omega(\varepsilon)$ depende da espessura do filme sobre a superfície do metal, seguindo a seguinte relação:

$$\ln \omega(\varepsilon) = -\frac{4\pi d \sqrt{2m_e \Delta\varepsilon}}{h} \quad (1)$$

em que d é a espessura do filme, m_e é a massa efetiva do elétron, $\Delta\varepsilon$ é a altura da barreira de energia para o tunelamento do elétron e h é a constante de Planck ($6,63 \times 10^{-34}$ m²kg/s). Analisando esta equação, tem-se que a probabilidade de haver tunelamento diminui exponencialmente com o aumento da espessura do filme, lembrando que a dimensão deste filme deve ser inferior a 2nm [63].

Em um processo redox, a medida da velocidade da reação pode ser acompanhada pela corrente catódica ou anódica do sistema. Considerando a corrente catódica de transferência de elétrons, tem-se a seguinte relação:

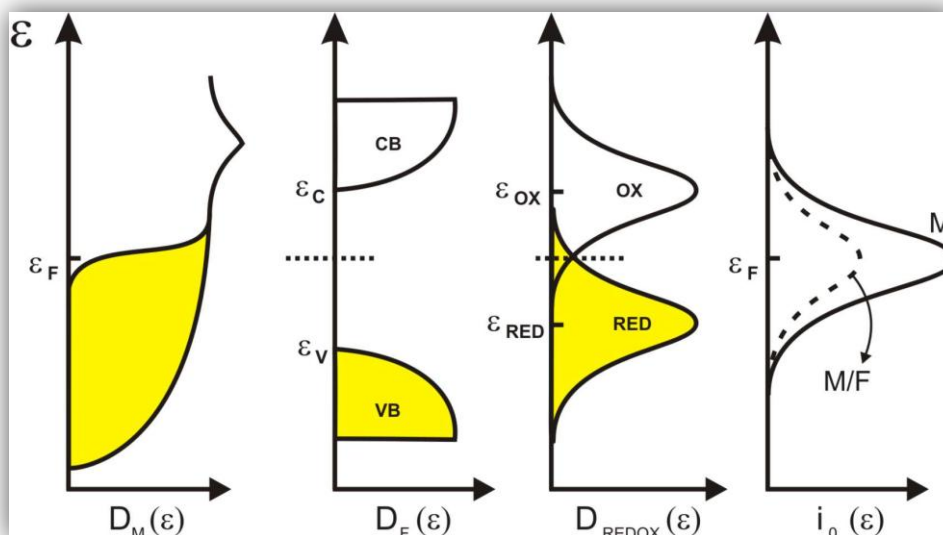
$$i^-(\varepsilon) = e k_t D_{M(e)}(\varepsilon) D_{OX}(\varepsilon) \quad (2)$$

em que e é a carga fundamental do elétron, k_t é a constante velocidade, $D_{M(e)}(\varepsilon)$ é a densidade de estados ocupados por elétrons no metal e $D_{OX}(\varepsilon)$ é a densidade de estados vacantes de elétrons redox nas espécies oxidadas hidratadas. Como pode observar, além da densidade dos estados, a velocidade com que este processo ocorre é determinada pela constante de velocidade k_t , dada por:

$$k_t = k_t^0 \omega(\varepsilon) \quad (3)$$

sendo, k_t^0 a velocidade de tunelamento sem o filme sobre o eletrodo. Sendo que a constante de velocidade é proporcional a probabilidade de tunelamento $\omega(\varepsilon)$. Desta relação, pode-se concluir que a corrente de troca anódica/catódica diminui com o aumento da espessura do filme [63]. A Figura 8 ilustra o perfil de corrente em função da energia dos elétrons para um filme fino.

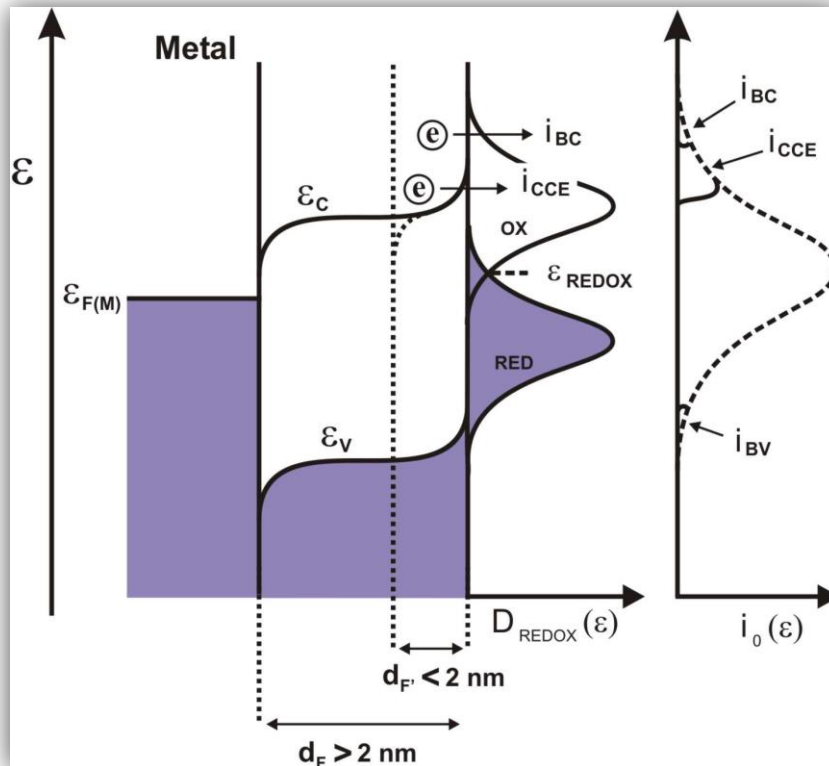
Figura 8 - Densidade de estados eletrônicos no eletrodo metálico $D_M(\epsilon)$, no filme semiconductor $D_F(\epsilon)$ e nas espécies redox em solução $D_{\text{REDOX}}(\epsilon)$ e a corrente de troca redox na transferência de carga em equilíbrio em função da energia dos estados. A corrente de troca apresentada é referente ao eletrodo metálico nu, M, e ao eletrodo coberto com um filme fino.



Fonte: Adaptado da ref. [63].

No caso de um filme espesso, as energias das bandas de valência e de condução devem ser consideradas no processo de transferência de carga. Desta maneira, tem-se a corrente de troca referente à banda de condução, i_{BC} , a corrente de troca associada a banda de valência, i_{BV} , e a corrente de troca proveniente do tunelamento dos elétrons pela barreira de cargas espaciais, i_{CCE} [63]. A Figura 9 ilustra esta situação, deixando clara a diferença do perfil de corrente de troca entre os filmes finos e espessos.

Figura 9 - Reação de transferência eletrônica de espécies redox solvatadas em equilíbrio em um eletrodo metálico coberto com um filme espesso (F, linha sólida) e com um filme fino (F', linha pontilhada).



Fonte: Adaptado da ref. [63].

O conceito de transferência eletrônica em filmes vem sendo estudado na literatura para moléculas imobilizadas com um sítio redox [64].

2.4 Transferência eletrônica em moléculas imobilizadas com um sítio redox

A transferência de carga pelo DNA acontece pela troca de elétrons/buracos entre um grupo doador e um aceitador destas cargas, configurando a biomolécula como a ponte entre eles. Há várias pesquisas na área que interpretam os resultados em termos da Teoria microscópica de Marcus [65-66], em que a constante de velocidade de transferência eletrônica κ_{ET} não adiabática é descrita por:

$$\kappa_{ET} = \frac{4\pi^2 |V_{el}|^2}{h} \sqrt{\frac{1}{4\lambda\kappa_B T}} e^{-\left(\frac{[\Delta G_{ET} + \lambda]^2}{4\lambda\kappa_B T}\right)} \quad (4)$$

em que V_{el} é o acoplamento eletrônico, λ a energia de reorganização e ΔG_{ET} a força motriz do processo de transferência eletrônica. Esta equação pode ser mais simplificada considerando os mecanismos de transferência de carga individualmente.

Se o processo de transferência de carga é via tunelamento, mediado pelo mecanismo de *superexchange*, a constante de velocidade decai exponencialmente [67] e proporcionalmente com a distância entre os grupos doador/aceitador pelo fator β como se segue:

$$\kappa_{superexchange} \propto e^{-\beta r} \quad (5)$$

em que β torna-se menor com a diminuição da energia livre de injeção da carga e r é a distância entre os grupos doador/aceitador. Conforme discutido anteriormente, quando a energia dos estados eletrônicos da ponte é próxima da energia do grupo doador, o tipo de mecanismo passa de *superexchange* para *hopping*. Com isso, a relação da constante de velocidade de transferência eletrônica com a distância decai algebricamente [67] com o número de passos do mecanismo e pelo parâmetro η

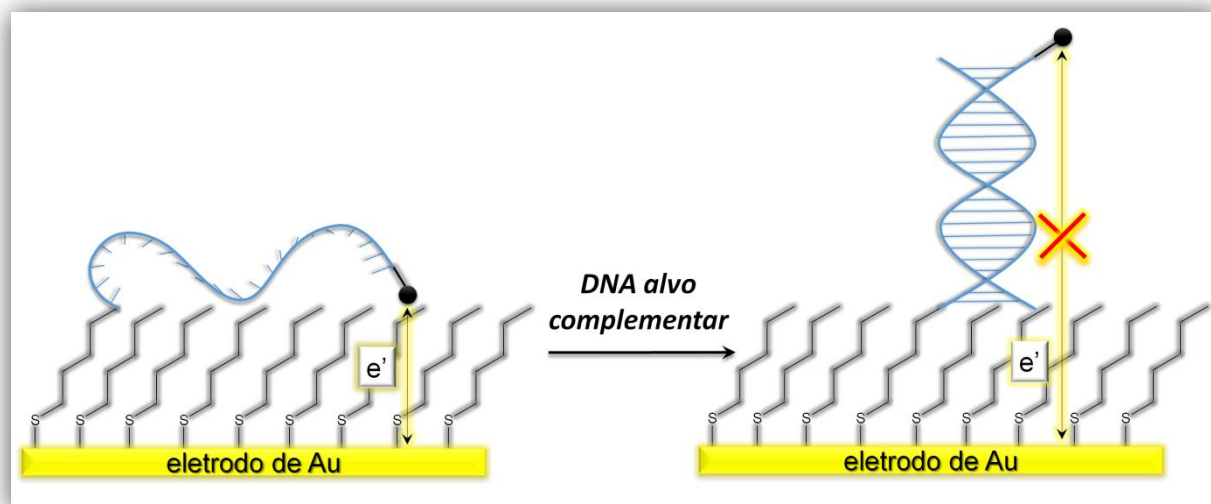
$$\kappa_{hopping} \propto N^{-\eta} \quad (6)$$

no qual N é o número de passos e η é um valor entre 1 e 2.

No artigo de Ihara e colaboradores [68] a identificação de oligonucleotídeos modificados com ferroceno é realizada com estas moléculas livres em solução. Se for analisado o sinal voltamétrico apresentado nesse trabalho fica claro que os picos redox observados são provenientes de uma transferência eletrônica direta do ferroceno com o eletrodo. Da mesma forma, Navarro e colaboradores [69] utilizam soluções de oligonucleotídeos modificados com ferroceno. Por outro lado, no trabalho de Mearns e colaboradores [70], utilizou-se a fita simples de DNA, marcadas com ferroceno, ligadas ao eletrodo de ouro por um braço extensor com o grupo tiol na extremidade para fixá-la. Ao adicionar a fita de DNA alvo complementar ao sistema, o sinal eletroquímico desaparecia. Isto acontecia porque a fita simples de DNA possui flexibilidade de modo que a molécula de ferroceno possa se aproximar do eletrodo, permitindo a transferência eletrônica entre o eletrodo e o ferroceno. Ao

adicionar a fita complementar, o DNA se torna rígido e, como consequência, a longa distância impossibilita a ocorrência do processo redox, como pode ser observado no esquema da Figura 10. O artigo de Rai e colaboradores [71] e o trabalho de Anne, Bouchardon e Moiroux [72] utilizam do mesmo princípio para a detecção de DNA.

Figura 10 - Esquemático do mecanismo “liga/desliga” do eletrodo modificado com DNA marcado com ferroceno na extremidade 5'. A marca de ferroceno está representada por um círculo preto.



Fonte: modificado de Mearns e colaboradores [70].

Como assinalado, não há relatos na literatura até o momento que descrevem o uso do DNA modificado com ferroceno para estudar a transferência de carga através do DNA. Atualmente, há somente trabalhos de monocamadas autoorganizadas de tiol com ferroceno que discutem a transferência eletrônica como é o caso do artigo de Chidsey [73]. A transferência de carga através do DNA é realizada utilizando outros tipos de moléculas. Para as moléculas ligadas covalentemente ao DNA, tem-se estudos com a daunomicina [21, 74], a qual é um intercalador redox ativo e que faz ligação cruzada com o átomo N2 da guanina. Este fato é importante, pois a localização exata de intercalação dentro de um DNA de fita dupla afeta a velocidade de transferência de elétrons através do DNA. Existem também estudos usando o azul do Nilo como sonda redox ou ainda o azul de metileno, o qual é comumente utilizado livre em solução, todavia ele foi utilizado ligado covalentemente a extremidade 5' no artigo de Pänke, Kirbs e Lisdat [75].

Mesmo não havendo relatos na literatura do estudo da transferência de carga através do DNA marcado com a molécula de ferroceno, este tipo de marcação possui a vantagem de ser independente do pH [76], propriedade que não possuem as moléculas intercalantes discutidas neste parágrafo.

A forma como o ferroceno deve estar ligado covalentemente ao DNA é muito importante se a finalidade é utilizá-lo como uma sonda no estudo da transferência de carga através da biomolécula. No artigo de Gorodetsky e colaboradores [77] foram testados para 2 moléculas sonda (antraquinona e 2,2,6,6-tetrametilpiperidina 1-oxil) duas formas de ligação (acetileno ou saturada) ao DNA e avaliado o sinal voltamétrico de onda quadrada para o sistema sem e com um erro no pareamento das bases nitrogenadas. Quanto maior o acoplamento (uso da ligação acetileno) entre o DNA e a molécula sonda, maior é a conjugação da ligação e, conseqüentemente, maior o sinal eletroquímico. Desta maneira, a distinção entre o DNA com e sem erro no pareamento é mais evidente, ficando clara a importância do acoplamento da sonda redox com o oligonucleotídeo.

2.5 Espectroscopia de Impedância eletroquímica

O termo impedância foi cunhado por Oliver Heaviside em 1872 para o tratamento de circuitos elétricos [78] e pode ser definido como a resistência ao fluxo de corrente alternada. Dependendo do elemento de circuito, ela pode ser uma resistência (resistor), reatância capacitiva (capacitor) ou ainda uma reatância indutiva (indutor).

A espectroscopia de Impedância eletroquímica (EIE) é uma técnica na qual a aplicação de uma perturbação senoidal de potencial ou corrente gera um sinal também senoidal de corrente ou potencial, respectivamente, e a razão entre o potencial e a corrente, na mesma frequência, é definida como impedância.

O tratamento dos resultados da EIE está baseado na teoria de sistemas lineares, em que a resposta frente à perturbação senoidal é linear. Além desta condição para a realização das medidas de EIE, a linearidade, tem-se ainda que existir estabilidade do sistema. Durante todo o intervalo de medida, o sistema não pode estar fora do equilíbrio ou do estado estacionário. Em adição, a medida deve

ser realizada de tal maneira que não exista variação de impedância causada por fatores externos não controlados (ex: interferência da luz proveniente da iluminação artificial). Desta maneira, a causalidade, a terceira condição para ter confiabilidade dos dados obtidos, diz que o espectro de impedância não deve variar mesmo com a mudança no sentido de varredura de frequência (da maior para a menor ou vice-versa) [79].

Esta técnica não é unívoca. Isto quer dizer que somente ela não é capaz de reconhecer entidades elétricas ou identificar tipos de mecanismos, necessitando do auxílio de outras técnicas para vislumbrar amplamente um sistema elétrico/eletroquímico [80-81]. Contudo, ela fornece uma grande riqueza de detalhes em estudos de fenômenos de interface. Com diferenças de resistência entre as fases devido às mudanças de natureza química e/ou estrutural, há o acúmulo de cargas nas interfaces que podem ser polarizadas. Os diferentes tipos de dipolos que são cargas espaciais (provenientes de acúmulo de cargas em interfaces), dipolar (que tem origem de momentos de dipolo permanente), iônico (da polarização do par cátion-ânion) ou eletrônico (associado ao efeito de polarizabilidade em sistemas pontuais - átomos e íons - ou às distribuições de densidade de estados em sistemas mais extensos - moléculas e sólidos) [82]. Devido à natureza do dipolo, a resposta frente a um campo elétrico senoidal será diferente para cada um, sendo os primeiros citados os que mais demoram em responder.

Com esta técnica pode-se estudar materiais dielétricos, baterias, células a combustível e muitos outros dispositivos elétricos ou eletroquímicos [81]. Para cada tipo de sistema, um parâmetro elétrico está em maior evidência. A capacitância para os materiais dielétricos, a condutividade em células a combustível e a resistência em varistores [83]. Diante deste fato, observa-se que às vezes a resistência, ou impedância quando aplicado uma perturbação senoidal, não é a melhor abordagem para investigar um dado sistema. A EIE, uma técnica de resposta em frequência, é expressa por uma função cuja forma complexa é dada por:

$$Z^* = Z' + j Z'' \quad (7)$$

que é denominada de maneira geral como função de imitância. Existem outras três funções típicas relacionadas com a impedância [80, 83]. A admitância Y^* é uma delas e é igual ao inverso da função de impedância Z^* , portanto:

$$Y^* = \frac{1}{Z^*} = j\omega\varepsilon^* = G + jB = Y' + jY'' \quad (8)$$

sendo G e B denominados condutância e susceptância, respectivamente, e Y' e Y'' representam, nesta ordem, a parte real e imaginária da admitância. A partir da equação anterior é possível definir a capacitância complexa como sendo:

$$C^*(\omega) = (j\omega)^{-1} Y^*(\omega) \quad (9)$$

$$C^*(\omega) = \left(\frac{Y''}{\omega}\right) - j\left(\frac{Y'}{\omega}\right) = C' + jC'' \quad (10)$$

em que ω é frequência angular e C' e C'' representam a parte real e imaginária da capacitância complexa. E o módulo elétrico M^* é dado por:

$$M^* = j\omega Z^* = M' + jM'' \quad (11)$$

tal que M' e M'' representam a parte real e imaginária do módulo elétrico, respectivamente.

Além dos espectros de impedância, neste trabalho foram bastante utilizados os espectros de capacitância complexa nos planos de Nyquist (parte imaginária em função da parte real) e Bode (parte imaginária ou real em função da frequência). Além da descrita anteriormente, a relação entre estas funções de imitância pode ser dada por:

$$Z^*(\omega) = \frac{1}{j\omega C^*(\omega)} \quad (12)$$

em que ω é a frequência angular e j o número complexo. Da mesma maneira, a capacitância complexa pode ser dada pela relação:

$$C^*(\omega) = \frac{1}{j\omega Z^*(\omega)}$$

Neste caso, $Z^*(\omega)$ é usada no lugar de $Z_c(\omega)$ devido ao fato de poder possuir uma componente resistiva além da componente capacitiva e não haver uma componente indutiva. Portanto,

$$Z^*(\omega) = Z' + jZ''$$

Substituindo esta equação naquela anterior, tem-se:

$$C^*(\omega) = \frac{1}{j\omega(Z' + jZ'')}$$

Rearranjando-a, o resultado pode ser expresso em termos da parte real e imaginária:

$$C^*(\omega) = \frac{-Z''}{\omega|Z|^2} - j\frac{Z'}{\omega|Z|^2}$$

Desta maneira, tem-se que:

$$C' = \frac{-Z''}{\omega|Z|^2} \quad \text{e} \quad -C'' = \frac{Z'}{\omega|Z|^2} \quad (13)$$

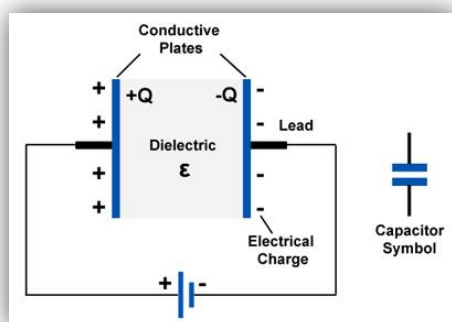
no qual $|Z|$ é o módulo de $Z^*(\omega)$. Os detalhes estão apresentados em Adendo. O uso de capacitância ao invés da impedância em alguns trabalhos na literatura pode referenciar a espectroscopia como espectroscopia de capacitância [64, 84] ou ainda espectroscopia dielétrica [85].

2.5.1 Capacitância: eletrostática, redox, química e quântica

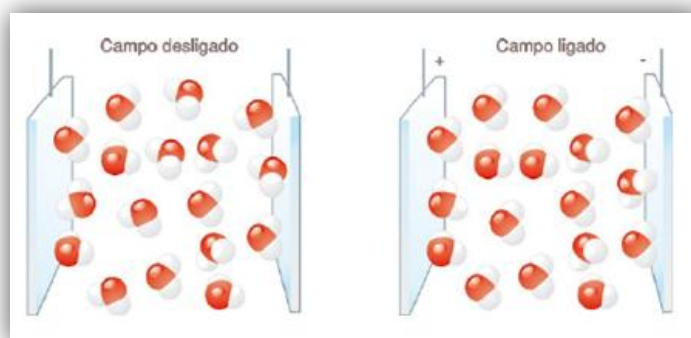
A capacitância é uma grandeza que mede a energia elétrica acumulada em um capacitor. Ela é igual à quantidade de carga acumulada por unidade de potencial aplicado, sendo a unidade de capacitância o Faraday, F. O modelo clássico de capacitor é descrito por um par de placas metálicas planas e paralelas a uma dada distância uma da outra e o acúmulo de cargas é obtido pela aplicação de uma diferença de potencial elétrico entre as placas, conforme ilustrado na Figura 11a. A capacitância deste caso é denominada de capacitância eletrostática.

Figura 11 - Ilustração (a) do modelo clássico de capacitor de placas metálicas planas e paralelas e (b) do processo de polarização do dielétrico com o campo elétrico ligado.

a)



b)



Fonte: ref. [86] para Figura 11a e ref. [87] para Figura 11b.

A capacitância de um capacitor pode ser alterada sem qualquer mudança na diferença de potencial e isto é obtido pela adição de um dielétrico entre as placas do capacitor. Ao ser adicionado, as entidades polarizáveis são polarizadas com o campo elétrico ligado, conforme mostra a Figura 11b, o que resulta em um campo elétrico induzido dentro do dielétrico. Desta maneira, o campo elétrico resultante dentro do capacitor diminui e, conseqüentemente, a relação carga/potencial aumenta, i.e., a capacitância do capacitor aumenta. Além da inserção do dielétrico, a variação da geometria do capacitor provoca mudança de capacitância pela seguinte relação:

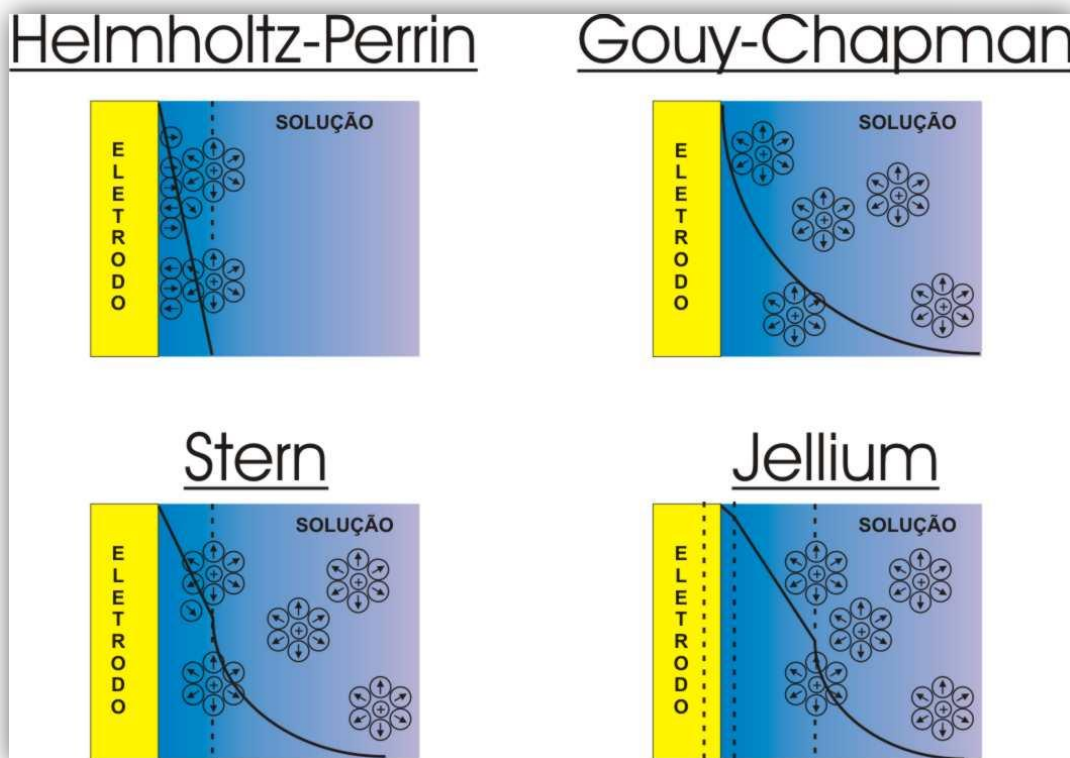
$$C = \kappa \epsilon_0 A / d \quad (14)$$

em que κ é a constante dielétrica, ϵ_0 a permissividade no vácuo, A e d são a área e a distância entre as placas do capacitor, respectivamente.

Em um sistema eletroquímico, a capacitância pode surgir de diferentes fontes. Ao adicionar um eletrodo sólido em uma solução aquosa, por exemplo, a anisotropia de forças na região interfacial conduz a uma redistribuição das espécies eletrolíticas nas proximidades do eletrodo, carregando a região de interface e induzindo uma carga no eletrodo. Desta maneira, tem-se uma camada com cargas no eletrodo e

outra na solução, constituindo o que se denomina de dupla camada elétrica [88]. A estrutura da dupla camada elétrica pode ser descrita por diferentes modelos, os quais estão ilustrados na Figura 12. O modelo de Helmholtz-Perrin descreve a dupla camada elétrica como um capacitor de placas paralelas, em que as cargas (íons solvatados) estão fixas a uma dada distância do eletrodo, estando elas localizadas no Plano Externo de Helmholtz [89].

Figura 12 - Ilustração de modelos de dupla camada elétrica para realçar o acúmulo de cargas na região próxima ao eletrodo.

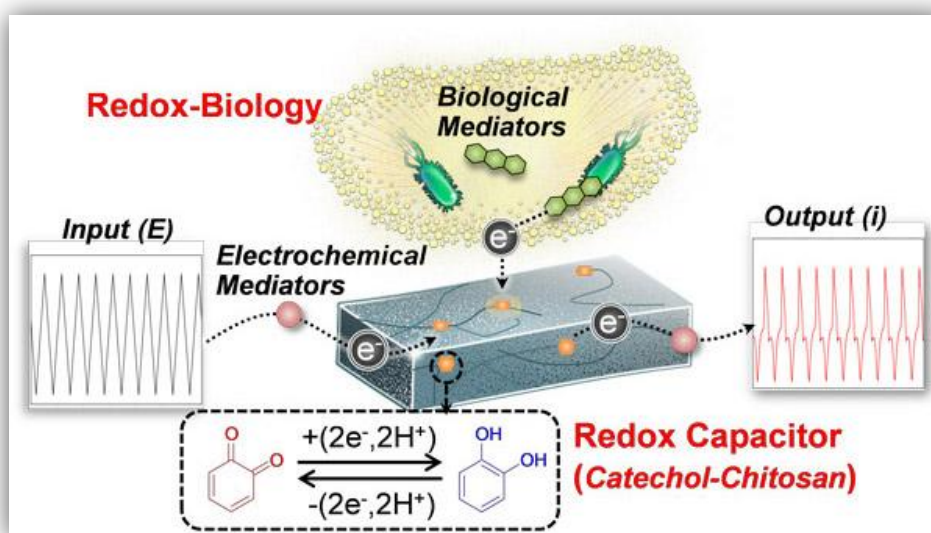


Fonte: Autor.

O modelo de Helmholtz-Perrin foi exemplificado para mostrar o comportamento clássico de um capacitor. Contudo, quando o acúmulo de carga tem origem de uma reação eletroquímica, ou faradaica (eletroadsorção, processos de intercalação ou reações redox), o sistema eletroquímico é denominado de pseudocapacitor, como descrito na literatura [90-91]. Os dispositivos de armazenamento de energia como os polímeros condutores e os óxidos metálicos são exemplos de pseudocapacitores [92-93]. Trabalhos na literatura descrevem este

tipo de capacitância como capacitância redox, sendo ilustrado na Figura 13 um sistema cujo processo faradaico envolve mediadores biológicos [94].

Figura 13 - Ilustração de um sistema de capacitância redox envolvendo mediadores biológicos no processo faradaico.



Fonte: Referência [95].

Recentemente, Bueno e colaboradores [64] descreveram, para uma camada autoorganizada com um centro eletroativo ancorado nela (denominada de camada eletroativa), como separar a contribuição de capacitância redox da capacitância eletrostática por medidas de EIE. Vários trabalhos vêm utilizando deste tratamento de dados na aplicação de biossensores [96-98] e os seus detalhes foram apresentados logo a seguir.

O carregamento da monocamada eletroativa ocorre quando um potencial é aplicado dentro da janela redox da espécie eletroativa adsorvida. Elétrons são injetados do metal na monocamada e a densidade de estados redox da espécie eletroativa ficam ocupados, em que esta ocupação depende da distribuição do nível de Fermi E_F no metal [64]. Assim sendo, a capacitância redox pode ser expressa por:

$$C_r = -\frac{dQ}{dV} = Ae^2\Gamma \frac{df}{dE_F} \quad (15)$$

tal que Γ é igual ao grau de cobertura molar (mol/cm^2), e é a carga elétrica fundamental e f é a função de distribuição de Fermi-Dirac dos elétrons do metal, dada por:

$$f(E_0 - E_F) = \frac{1}{1 + e^{[(E_0 - E_F)/\kappa_B T]}} \quad (16).$$

A equação diferencial anterior pode ser equacionada como:

$$C_r = \frac{Ae^2\Gamma}{\kappa_B T} f(1 - f) \quad (17).$$

O processo redox somente acontece quando existe um acoplamento (sobreposição) das bandas de valência/condução com a densidade dos estados (por definição, a densidade de estados (DOS ou $D(E)$ quando é uma função do potencial) é o número de estados por unidade de energia e por unidade de volume) eletrônicos da espécie redox:

$$s = \int_{-\infty}^{+\infty} D(E)f(E)dE \quad (18),$$

resultando na equação de capacitância redox por área

$$C_{r,A} = e^2 \int_{-\infty}^{+\infty} D(E) \frac{df(E)}{dE_F} dE \quad (19)$$

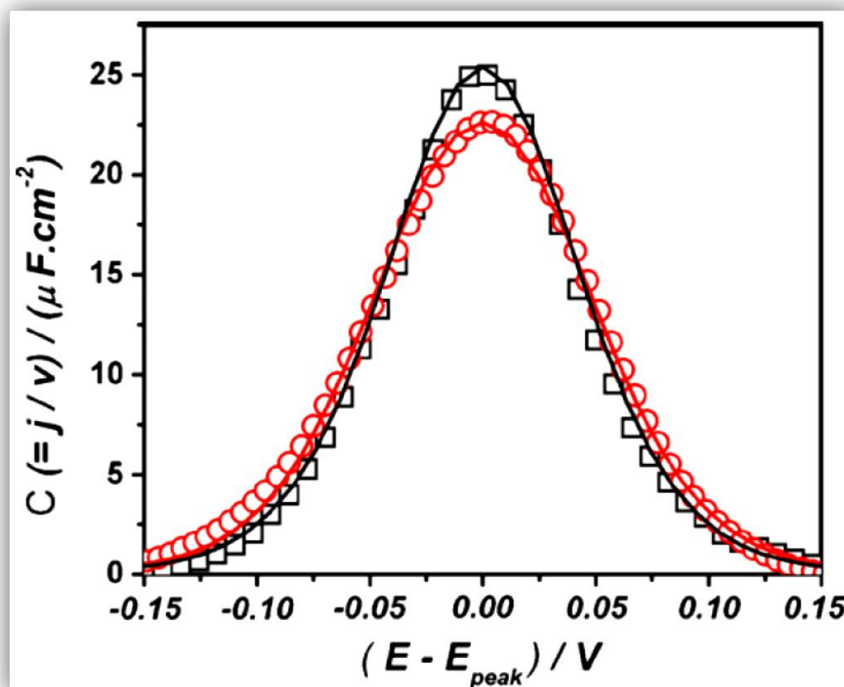
ou

$$C_{r,A} = e^2 \int_{-\infty}^{+\infty} D(E)f(1 - f)dE \quad (20).$$

Desta maneira, a integral da curva de $C_{r,A}$ em função do potencial será diretamente proporcional a DOS da molécula redox, como ilustrado na Figura 14. Esta curva pode ser ajustada como uma distribuição de Gauss por:

$$D(E) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{[-(E_0 - E_F)^2/2\sigma^2]} \quad (21)$$

Figura 14 - Curva de capacitância em função do potencial. Esta representação permite associar a área da curva com DOS da espécie redox ancorada sobre o eletrodo metálico.



Fonte: referência [99].

Dos tipos de capacitância, ainda pode ser citada a capacitância eletroquímica ou também chamada de capacitância quântica. O termo capacitância quântica foi primeiramente utilizado por Serge Luryi [100]. Por definição, ela é expressa por:

$$C_q = e^2 \rho \quad (22)$$

sendo e a carga elétrica fundamental e ρ a densidade de estados eletrônicos, DOS. Este tipo de capacitância tem origem na distribuição da densidade eletrônica do material. Em capacitores metálicos a contribuição é somente eletrostática quando há injeção ou drenagem de elétrons. Todavia, para capacitores com características semicondutoras, além da contribuição eletrostática, existe um aumento ou diminuição da densidade eletrônica da banda (preenchimento ou retirada de elétrons dos orbitais moleculares de fronteira). Estas são carregadas com velocidade diferente do capacitor puramente eletrostático e, como consequência, há o surgimento da capacitância química (ou quântica) em série com a capacitância eletrostática. Em dispositivos elétricos, a capacitância quântica possui o nome de

capacitância parasita, pois é indesejada para as aplicações ao qual foram projetadas [101].

De acordo com Bueno e Davis [102], em sistemas de filmes moleculares com um centro redox imobilizado, a capacitância redox (discutida na seção anterior) possui uma contribuição relacionada com a separação de carga advinda da reação eletroquímica, a capacitância eletrostática C_e , e outra que surge do acoplamento entre os estados quantizados de energia da molécula com o DOS do eletrodo metálico, a capacitância quântica C_q . Desta maneira, a capacitância do sistema possui duas contribuições que estão em série:

$$C_r^{-1} = C_e^{-1} + C_q^{-1} \quad (23)$$

Em nível molecular, a capacitância eletrostática é muito maior do que a quântica e, como consequência, a capacitância equivalente (capacitância redox) é praticamente a capacitância quântica. Esta está associada com a redistribuição eletrônica dos elétrons e com a DOS, sendo definida como [103]:

$$\frac{1}{C_r} = \frac{1}{C_q} = \frac{1}{e^2} \left(\frac{1}{g_{Au}(\mu_e)} + \frac{1}{g_{Fc}(\mu_e)} \right) \quad (24)$$

em que $g_{Au}(E)$ e $g_{Fc}(E)$ são as densidades de estados do eletrodo metálico e do grupo redox acoplado à monocamada (ferroceno), respectivamente. Como $g_{Au}(\mu_e) \gg g_{Fc}(\mu_e)$, a equação anterior reduz a:

$$C_q = e^2 g_{Fc}(\mu_e) \quad (25).$$

Todavia, conforme os autores do trabalho, ao invés de níveis de estados discretos, uma situação mais realística de estados de energia são distribuídos, dada por uma Gaussiana:

$$g_r(\mu_e) = \frac{1}{\sigma_g \sqrt{2\pi}} \exp \left[-\frac{(E_r - \mu_e)^2}{2\sigma_g^2} \right] \quad (26)$$

com a distribuição de E_r , que é a energia dos estados aceitadores A, e o desvio padrão σ_g . Uma vez que a dependência de C_r sobre as energias (i.e., μ_e , o potencial

eletroquímico dos estados doadores) é experimentalmente obtida, conseqüentemente a densidade eletrônica é obtida com a integração da curva de Gauss do DOS sobre todo o intervalo de energias [64].

O filme molecular é similar a um canal quântico, o qual liga os reservatórios de elétrons do eletrodo metálico e do grupo ferroceno. O transporte do elétron pelo canal começa com a transmissão por um dos reservatórios, chamado de fonte. Ao passar para o condutor quântico, outro nome dado ao canal, a resistência elétrica é dada pela forma de condução. Em uma condição ideal, o transporte eletrônico é balístico (também chamado de transporte coerente), i.e. o elétron atravessa o canal com resistência elétrica desprezível, caracterizando-o como um sistema adiabático. Na realidade, contudo, existe um sistema não adiabático, em que existe espalhamento da onda (na descrição ondulatória do elétron). Ao transferir elétrons de um reservatório para outro, existe um acúmulo de cargas em um dos reservatórios, descrito por uma capacitância, e a velocidade de transferência dada pela resistência/condutância do canal quântico. Conforme as relações das funções de admitância pode-se relacionar a capacitância imaginária C'' e a condutividade real σ' pela frequência angular ω :

$$C'' = \omega\sigma' \quad (27)$$

mostrando que são diretamente proporcionais.

Rolf Landauer, em 1957, foi o primeiro a sugerir uma fórmula, a fórmula de Landauer, que relacionasse a resistência elétrica com as propriedades de espalhamento do condutor quântico [104]

$$G(\mu) = G_0 \sum T_n(\mu) \quad (27)$$

em que $G(\mu)$ é a condutância quântica, G_0 é o quantum de condutância e $T_n(\mu)$ os autovalores de transmissão do canal quântico. Há trabalhos que discutem o transporte quântico do DNA em meio ambiente dissipativo [105-106]. Existem vários conceitos da área quântica para descrever os mecanismos de condução pelo DNA como, por exemplo, o mecanismo *superexchange* em que ocorre o tunelamento do elétron do grupo doador para o grupo aceitador através do DNA [107]. Além disso,

há trabalhos que buscam entender a condução elétrica desta biomolécula estudando sua densidade de estados eletrônicos [108] ou coeficiente de transmissão [31, 109] para identificar a influência da sequência de bases nitrogenadas [110-111] ou a conformação da estrutura [112].

No trabalho de Bueno e Davis [102] um filme molecular com um sítio redox foi descrito por um modelo de capacitância quântica em que se pode associar a resistência à transferência de carga R_{ct} das medidas de EIE com a resistência de um canal quântico R_q , definido como:

$$R_q = h/2e^2 \sim R_{ct} \quad (28)$$

sendo h a constante de Planck e e a carga fundamental do elétron.

2.5.2 Imobilização de Moléculas de DNA

A primeira etapa da confecção de um genossensor baseado em DNA é a imobilização do fragmento do DNA alvo. Na imobilização, é importante saber o grau de recobrimento desta biomolécula na superfície, pois ele pode ser adequado para proporcionar maior sinal elétrico (elevado grau de recobrimento) ou para facilitar a interação com proteínas (baixo grau de recobrimento). Steel, Herne e Tarlov [113] monitoraram o processo de imobilização de DNA por métodos eletroquímicos. Os resultados de cronocoulometria do trabalho forneceram dados para calcular o grau de recobrimento de fitas simples e duplas de DNA e também para associar a eficiência do processo de hibridização das fitas de DNA com o grau de recobrimento. O princípio da técnica cronocoulométrico consiste em contar a quantidade de carga fornecida para a reação de óxido-redução de uma espécie eletroativa marcadora que foi trocada pelo contra íon dos resíduos fosfatos do ácido nucléico.

Após a imobilização do DNA modificado com um grupo tiol em uma de suas extremidades, ainda restarão espaços no eletrodo para que ocorram reações eletroquímicas, pois o grau de recobrimento em qualquer situação será sempre menor do que 100% (na prática, sempre menor que aproximadamente 75%). Neste contexto, é interessante ter conhecimento de como as espécies químicas em solução permeiam esta monocamada autoorganizada de DNA. Li et al. [114] fizeram

o estudo de permeabilidade em monocamadas autoorganizadas de DNA obtidas em diferentes concentrações de NaCl, todavia os resultados indicaram que o sistema não era sensível a mudança de concentração do sal. O que acontecia era apenas a diminuição da capacitância do sistema com a imobilização do DNA. Contudo, o grau de recobrimento do DNA mostrou ser maior com o aumento da concentração de NaCl. Isto ocorre devido à neutralização dos grupos fosfatos por íons Na^+ , possibilitando maior aproximação entre as moléculas de DNA e possibilitando um número maior de moléculas imobilizadas por área.

No estudo da condutividade elétrica do DNA, a superfície do eletrodo em que a biomolécula está ancorada não pode sofrer processos redox, pois, caso contrário, o sinal eletroquímico não será dado exclusivamente pelo DNA. Desta maneira, a superfície do eletrodo deve ser bloqueada para evitar a transferência eletrônica. Os trabalhos nesta área de pesquisa normalmente utilizam moléculas de tiol, como o 6-mercaptop-1-hexanol, por exemplo, para tal finalidade. Arinaga e colaboradores [115] estudaram o que acontecia com uma monocamada de DNA simples fita sobre uma superfície de ouro quando era adicionada uma solução de 6-mercaptop-1-hexanol (MHO). Na adição do MHO ao eletrodo com a monocamada de DNA ocorre um efeito de mudança de conformação do ácido nucleico. Com a imobilização de MHO, elétrons são injetados no substrato pela formação da ligação entre o grupo SH do MHO com o ouro. A carga negativa injetada no eletrodo provoca a repulsão dos grupos fosfatos do DNA da superfície e, assim, a molécula desorve e fica na posição normal em relação ao eletrodo. Após 30 h de imobilização de MHO, uma parte das moléculas de DNA retornam a sua orientação inicial que é paralela a superfície do substrato. Uma segunda adição de MHO ao sistema induziu novamente o aparecimento de cargas negativas à superfície do eletrodo e, portanto, a reorientação das moléculas de DNA. No entanto, após a segunda imobilização não foi observada a reorientação do DNA. Contudo existiu uma variação da carga superficial na segunda imobilização do MHO, indicando a presença de espaços não preenchidos que poderiam ter sido formados pela desorção de moléculas durante a estocagem. Em suma, a conformação das moléculas de DNA é governada pelas interações elétricas com o eletrodo que suporta estas moléculas, sendo que

mudanças na carga da superfície, seja por adsorção de moléculas ou por potencial externo aplicado, alteram a adsorção da biomolécula [115].

A conformação dos desoxirribonucleicos suportados em eletrodos também foi discutida por Gorodetsky, Buzzeo e Barton [44]. No artigo discute-se a caracterização da superfície por diferentes técnicas: marcação radioativa, microscopias de tunelamento de varredura e de força atômica. As técnicas de microscopia trazem informações detalhadas sobre a orientação da biomolécula com o potencial do eletrodo em que a aplicação de potenciais negativos as moléculas ficam perpendiculares à superfície, potenciais positivos as moléculas permanecem “deitadas” sobre o eletrodo e em potenciais de circuito aberto as moléculas são orientadas em aproximadamente 45° . Este processo de orientação da molécula de DNA foi descrito com base no artigo de Kelley e colaboradores [116] que mostraram também o efeito do potencial aplicado à monocamada com um excelente grau de cobertura (100%) e com grau de cobertura mediano (60%).

Como anteriormente comentado, a molécula de tiol serve para bloquear a superfície do eletrodo exposta de maneira que a resposta eletroquímica deste seja suprimida, obtendo apenas o sinal eletroquímico do material biológico que, nesta pesquisa, é o DNA. No entanto, nos artigos científicos é mais comum referir-se a espaçador ao invés da denominação de bloqueador. Só se pode colocar a palavra espaçador em um dado contexto caso haja a imobilização simultânea da biomolécula e a molécula espaçadora. Por exemplo, em uma solução utilizada para modificar uma superfície de ouro contendo 6-mercaptophexan-1-ol e moléculas de DNA modificados com um grupo tiol, a molécula de tiol pode ser considerada uma molécula espaçadora.

Levando em consideração a diferença entre molécula bloqueada e espaçadora, discernida no parágrafo acima, o trabalho de Keighley e colaboradores [117] é um exemplo do uso de moléculas de tiol como espaçador. O objetivo desse trabalho foi otimizar a imobilização de DNA fita simples (ss-DNA) para identificar o processo de hibridização por espectroscopia de impedância eletroquímica sem qualquer uso de marcadores, visando a eficiência do processo de hibridização. Para tal, a razão da concentração entre o DNA e o tiol foi variada. O aumento desta razão

provoca um incremento na densidade superficial (também denominado de grau de recobrimento) de ss-DNA imobilizada, sendo que este incremento é praticamente linear de baixas razões até razão igual a 0,5. Este valor fornece o maior grau de recobrimento da superfície com o ss-DNA e acima dele o grau de recobrimento diminui. A eficiência no processo de hibridização diminui com o aumento da densidade superficial, existindo uma região intermediária em que a eficiência é praticamente igual mesmo havendo aumento na densidade superficial da fita simples de DNA. Um gráfico de porcentagem da variação da resistência à transferência de carga durante o processo de hibridização em função da razão de concentrações entre DNA e tiol forneceu um valor ótimo de 20% de DNA na fração de concentrações molares, correspondendo a uma densidade superficial de $5,4 \times 10^{12}$ moléculas/cm² [117].

3 OBJETIVOS

Mostrar a possibilidade de diferenciar a condutividade elétrica de moléculas de DNA imobilizadas em eletrodos metálicos por meio dos espectros de impedância e capacitância eletroquímica, apoiando-se nos voltamogramas cíclicos.

Como objetivo específico, aplicar duas metodologias para realizar as medidas de impedância. A primeira foi baseada no agente intercalante azul de metileno (MB), comumente usado na literatura para obter diferenças de condução elétrica para os DNAs com distinta propriedade elétrica. A segunda metodologia foi focada na modificação da fita dupla de DNA com o grupo ferroceno para distinguir a resistência elétrica de cada fita dupla de DNA.

4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

A metodologia encontra-se dividida em duas partes: a primeira corresponde àquela utilizada para investigar a resposta eletroquímica da monocamada de DNA e de tiol em solução de azul de metileno e a segunda refere-se às medidas eletroquímicas em monocamadas de DNA modificadas com um grupo ferroceno.

4.1 Monocamadas de tiol e de DNA em solução de azul de metileno

4.1.1 Materiais

O sistema eletroquímico de 3 eletrodos utilizado neste trabalho consistiu em: eletrodo de trabalho de disco rotativo de ouro da Metrohm (diâmetro de 2mm); contra-eletrodo de fio, em espiral, de Pt (área igual a $1,89\text{cm}^2$); e eletrodo de referência Ag|AgCl (KCl 3mol/L). A célula eletroquímica usada foi um béquer de vidro (volume total de aproximadamente 10mL) contendo uma tampa plástica com furos correspondentes às posições de cada eletrodo, fixando, assim, as distâncias entre eles. Este sistema foi usado em todas as medidas eletroquímicas. Todas as soluções aquosas utilizadas em todos os experimentos foram desaeradas pelo borbulhamento de N_2 por 5 min antes de qualquer medida eletroquímica.

Os materiais utilizados foram: água ultra pura (H_2O Milli-Q, Simplicity® UV, Millipore, resistividade $\geq 18.2\text{M}\Omega\text{ cm}$ a 298K), etanol absoluto puro sem aditivos (Fluka® Analytical), $\text{NaCl} \geq 99,5\%$ (Sigma®), KH_2PO_4 (Sigma-Aldrich), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} \geq 99,0\%$ (Sigma-Aldrich), 6-mercapto-hexan-1-ol 97% (Sigma-Aldrich) e azul de metileno $> 82\%$ (Sigma-Aldrich). Os oligonucleotídeos que foram utilizados possuem 20 bases nitrogenadas. Os oligonucleotídeos purificados por HPLC (sigla em inglês de cromatografia líquida de alta eficiência – *High-Performance Liquid Chromatography*), com as seguintes sequências de bases nitrogenadas, foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich:

- HS(C6)5'-AAA AAA AAA AAA AAA AA-3'

- 5'-TTT TTT TTT TTT TTT TT-3'

- HS(C6)5'-CGG GGC GGG GCG GGG CGG GG-3'

- 5'CCC CGC CCC GCC CCG CCC CG-3'

Cada fita simples de DNA será denominada de ss-DNA (termo em inglês, *single-stranded DNA*) e a fita dupla de ds-DNA (termo em inglês, *double-stranded DNA*). A sequência de DNA com adenina e timina será chamada doravante DNA

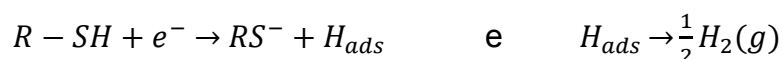
isolante (ds-DNAi) e a aquela com guanina e citosina será denominada de DNA condutor (ds-DNAc).

A hibridização da fita de ss-DNA tiolada com a sua fita simples complementar foi realizada no termociclador *PTC-100TM Programmable Thermal Controller*, de *MJ Research, Inc.*, a 72°C e resfriada lentamente. Para isto, uma alíquota de 5-10µL da solução de DNA foi adicionada a um tubo de 0,5mL e adicionada solução de MgCl₂ 0,5mol/L para obter uma solução de ds-DNA final de concentração igual a 300nmol/L pelo processo de hibridização.

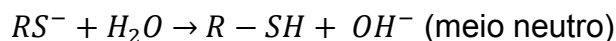
4.1.2 Preparação do eletrodo de trabalho

Antes da imobilização de qualquer tipo de molécula na superfície de eletrodos de disco de ouro (2mm de diâmetro, Metrohm), a superfície deve ser polida manualmente com suspensões de Al₂O₃ de maior para menor granulometria (1µm; 0,3µm e 0,05µm) e lavada em banho ultrassônico por 10min em água ultrapura. Os eletrodos então foram tratados eletroquimicamente em solução de NaOH 0,5mol/L (intervalo de 0 a -1,5V vs Ag|AgCl em velocidade de varredura de 100mV/s, 200 ciclos) e em solução de H₂SO₄ 0,5mol/L (intervalo de -0,2 a 1,5V Ag|AgCl em velocidade de varredura de 100mV/s, 25 ciclos), sendo este também chamado de limpeza eletroquímica [118]. A descrição detalhada dos fenômenos que ocorrem no tratamento eletroquímico está apresentada logo a seguir e podem ser encontrada em livros de eletroquímica [88].

Na dessorção redutiva (tratamento eletroquímico em NaOH) é um procedimento utilizado para remover espécies da superfície pela redução eletroquímica desta espécie. As espécies contendo o grupo tiol (-SH) que estão imobilizadas na superfície do eletrodo de ouro são agentes de transferência de prótons na evolução catódica de hidrogênio e é descrita pelas seguintes etapas de reação:



no qual a molécula contendo o grupo tiol é consumida. Contudo, ela pode ser regenerada a partir da reação química de doação de prótons por H₂O ou H₃O⁺ [2].

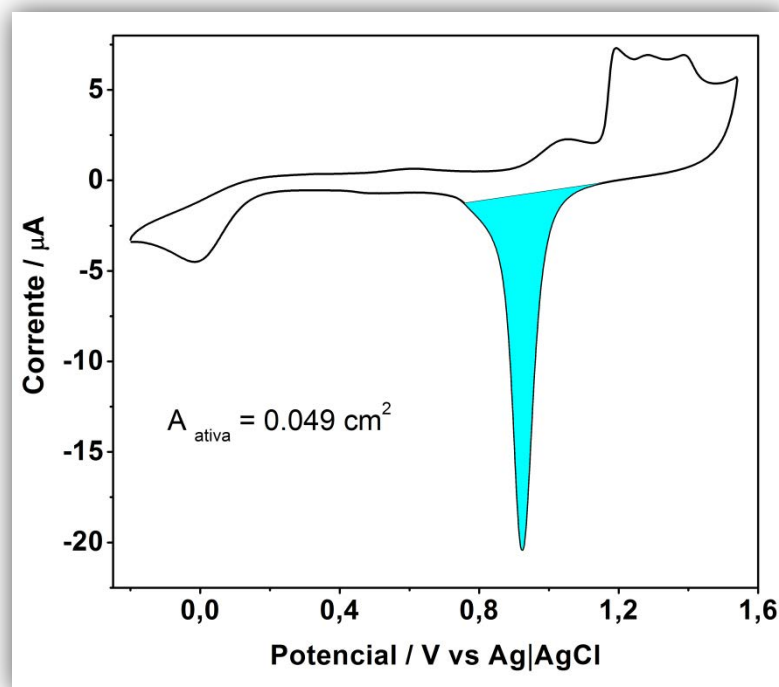


Observe que a dessorção redutiva é feita em meio alcalino, evitando a regeneração do grupo tiol, o qual pode imobilizar na superfície novamente, e também o deslocamento da reação de evolução de hidrogênio para potenciais mais catódicos. Entre o processo de dessorção redutiva e limpeza eletroquímica, o eletrodo é mergulhado em etanol absoluto para reduzir a camada de óxido que permanece. Encontra-se descrito na literatura que o álcool etílico reage com Au_2O_3 , gerando ouro metálico [119].

No processo de limpeza eletroquímica (tratamento eletroquímico em H_2SO_4), quando o eletrodo de Au é polarizado anodicamente uma camada superficial de oxigênio adsorvido é acompanhada pela dissolução anódica do Au, formando óxidos metálicos. Este processo consiste em criar uma monocamada de átomos de oxigênio sobre a superfície do eletrodo ao deslocar o sobrepotencial aplicado ao eletrodo para a região anódica, em que aparecem 3 picos de oxidação entre 1,2 e 1,4V. Posteriormente, esta monocamada é reduzida e o sobrepotencial regressa para a região catódica, associado ao pico de redução ao redor de 0,9V. Ao deslocar o sobrepotencial para regiões mais catódicas ($< +0,2V$), os íons H^+ começam a serem reduzidos a H_2 de modo que é possível observar a liberação de bolhas em sobrepotenciais catódicos fora da região usada neste trabalho. Como existe a adsorção/dessorção de oxigênio na forma atômica e formação de H_2 , a superfície do eletrodo está sendo utilizada e por tal motivo pode-se chamar este procedimento de envelhecimento da superfície.

Após o polimento eletroquímico, tratamento da superfície do eletrodo em solução de H_2SO_4 , as áreas eletroativas foram avaliadas pela integração do pico catódico do perfil voltamétrico (ver Figura 15) do ouro e convertido para a área da superfície real usando o fator de conversão de $400\mu C/cm^2$ [120].

Figura 15 - Perfil voltamétrico do último ciclo de limpeza eletroquímica em H_2SO_4 0,5 mol/L com velocidade de varredura igual a 100 mV/s. A área sombreada foi integrada para obter a área eletroativa do eletrodo. O fator de rugosidade para o eletrodo com o perfil de limpeza apresentado foi de 1,5.



Fonte: autor.

4.1.3 Imobilização das moléculas

A modificação da superfície do eletrodo com tiol consiste em incubá-lo em solução etanólica de 6-mercaptop-hexan-1-ol 20mmol/L por 12h, seguido por lavagem com etanol absoluto e água ultra pura e secado com N_2 . As medidas eletroquímicas foram realizadas imediatamente a seguir.

A modificação da superfície do eletrodo com DNA consiste de 2 etapas [121]. A primeira é a imobilização da fita dupla de DNA tiolada com concentrações de aproximadamente 300nmol/L em meio salino de MgCl_2 0,5mol/L e depois o bloqueio da superfície com uma solução etanólica 20mmol/L de 6-mercaptop-hexan-1-ol. Esse bloqueio tem como intuito ocupar os espaços vazios na superfície deixados pela imobilização do ds-DNA. Uma gota da solução de DNA (5-10 μL) foi adicionada à superfície do eletrodo e, após 12h, o eletrodo foi lavado com água ultra pura e secado com N_2 . Para o bloqueio da superfície, o eletrodo foi incubado na solução

etanólica de 6-mercapto-hexan-1-ol 20mmol/L por 12h, lavado com etanol absoluto e água Milli-Q e secado com N₂. Nos processos de imobilização, simulava-se uma câmara úmida com a vedação do sistema, impedindo a evaporação da solução adicionada à superfície do eletrodo. As medidas eletroquímicas foram realizadas imediatamente a seguir.

4.1.4 Medidas Eletroquímicas

A seguir, as condições experimentais das medidas eletroquímicas estão detalhadas para a monocamada contendo apenas moléculas de tiol e para a monocamada de DNA com bloqueio da superfície por tiol separadamente. As medidas foram realizadas no mínimo em triplicata.

As medidas de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica da monocamada de tiol em solução de azul de metileno foram realizadas com (1) solução tampão fosfato salino 0,1mol/L (solução tampão PBS) e (2) solução tampão de fosfato salino 0,1mol/L com 100µmol/L de azul de metileno, pH 7,4. As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato CH *Instruments Electrochemical Workstation* modelo 650C *series*. As medidas de voltametria cíclica foram realizadas no intervalo de varredura do potencial de -0,2V até +0,6V com 3 ciclos e a velocidade de varredura 100mV/s. O potencial inicial foi igual ao potencial de circuito aberto com tempo de espera de 300s. Nas medidas com as soluções contendo azul de metileno, o intervalo de potencial foi de 0V até -0,3V e com velocidade de varredura de 100mV/s.

A caracterização elétrica por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) foi realizada em intervalo de frequência de 100kHz a 10mHz (84 pontos) com amplitude de potencial de 10mV (*rms*). O potencial aplicado variou conforme a solução utilizada na medida. Para a solução tampão PBS, o potencial de circuito aberto foi de 0,1V vs Ag|AgCl e de -0,19V vs Ag|AgCl ao adicionar o azul de metileno na solução.

No caso de sistemas de monocamadas de DNA, as medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato (AUTOLAB PGSTAT 302N). As

medidas de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica foram realizadas com (1) solução tampão de fosfato salino 0,1mol/L (tampão PBS) e (2) solução tampão de fosfato salino 0,1mol/L com 100 μ mol/L de azul de metileno. Os detalhes das medidas estão descritos a seguir.

Na voltametria cíclica, o intervalo de varredura do potencial foi de -0,2V até +0,6V com 3 ciclos e a velocidade de varredura 100mV/s. O potencial inicial foi igual ao potencial de circuito aberto com tempo de espera de 300 s. Nas medidas com as soluções contendo azul de metileno, os voltamogramas foram obtidos na faixa de potencial de -0,3 a 0V vs Ag|AgCl sem alterar a velocidade de varredura de 100mV/s.

Na caracterização elétrica por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), a frequência de análise foi de 1 MHz a 10 mHz (80 pontos) com amplitude de potencial de 10mV (*rms*). O potencial dc aplicado variou conforme a solução utilizada na medida. Para as soluções de tampão PBS, os potenciais de circuito aberto foram próximos de 0,0V vs Ag|AgCl. Ao adicionar o azul de metileno nas soluções, medidas de impedância foram feitas no potencial de circuito aberto (valores próximos de 0,0V vs Ag|AgCl) e também no potencial de meia-onda do processo redox do azul de metileno, que é de -0,19V vs Ag|AgCl. Para verificar a validade das medidas de impedância, o teste de Kramers-Kronig foi realizado por meio de uma ferramenta no Software Nova 1.8, da AUTOLAB. Foi estipulado que o coeficiente de correlação χ^2 deveria ser inferior a 10^{-4} para que a medida de impedância satisfaça as condições de linearidade, estabilidade e causalidade, caso contrário a medida era descartada.

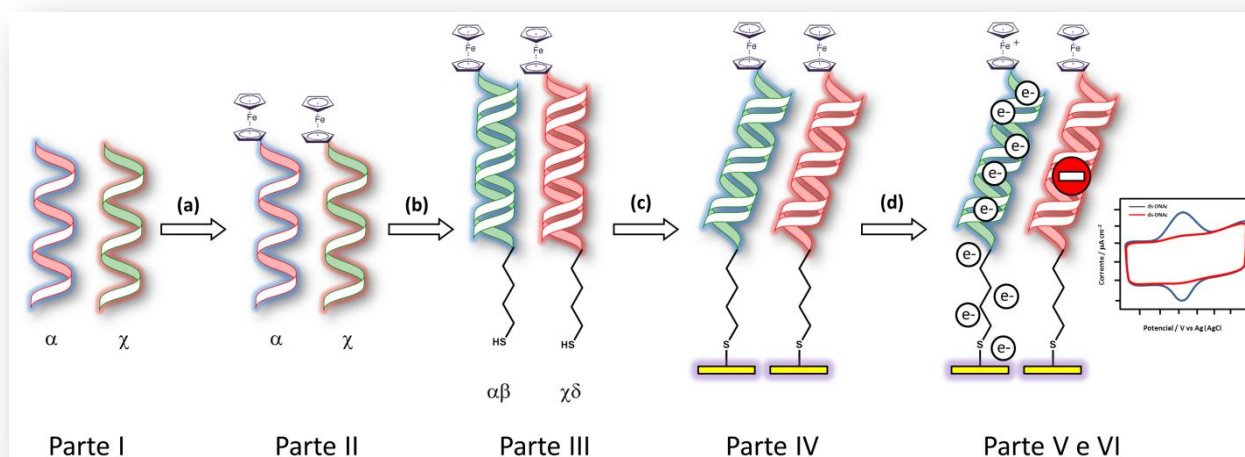
4.2 Monocamadas de DNA modificadas com um grupo ferroceno

Ao procurar em uma base de dados os artigos relacionados à DNA e ferroceno, encontrar-se-á, em sua grande maioria, trabalhos que utilizem a molécula de ferroceno como sonda redox para fins de identificação e quantificação. Portanto, a maioria das pesquisas desenvolvidas atualmente nesta área possui um foco de química analítica como, por exemplo, amplificar o sinal eletroquímico em imunoenaios [122] ou aumentar a sensibilidade na detecção de sequências

específicas de DNA de uma espécie de bactéria [71]. A transferência eletrônica entre o eletrodo e o ferroceno nestas aplicações não possui como intermediário o DNA. Isto quer dizer que o elétron associado no processo redox do ferroceno não atravessa o DNA, mas ocorre uma transferência eletrônica direta do ferroceno para o eletrodo metálico. De modo contrário, neste trabalho teve-se como tese a condução através da fita dupla de DNA.

O esquema da Figura 16 representa a obtenção de eletrodos de Au com fitas duplas de DNA modificados com ferroceno e a realização das medidas eletroquímicas (voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica) para calcular a condutividade de diferentes moléculas de DNA. Os detalhes do procedimento experimental estão expostos adiante e divididos em 6 partes.

Figura 16 - Esquema da preparação experimental de monocamadas de DNA modificadas com um grupo ferroceno. (a) Modificação das fitas simples de DNA com um grupo ferroceno, (b) hibridização da fita simples modificada com a fita simples complementar, (c) imobilização da fita dupla de DNA/bloqueio com 6-mercaptopexan-1-ol e (d) medidas eletroquímicas e tratamento dos dados.



Fonte: autor.

Parte I – Características das fitas simples de DNA

Fitas simples de DNA liofilizadas (ss-DNA) foram compradas da empresa TIB MOLBIOL Syntheselabor (Berlin, Alemanha). A quantidade adquirida foi de 1,0 OD

(a unidade de densidade óptica corresponde a 37 μg de fita simples de DNA) das seguintes moléculas com as respectivas informações do fabricante:

α) 5'-NH₂-AAA AAA AAA AAA AAA AAA AG-3'

3,3nmol, temperatura de anelamento 53,9 °C

β) 5'-SH-(CH₂)₇-CTT TTT TTT TTT TTT TTT TT-3'

6,0nmol, temperatura de anelamento 55,4 °C

χ) 5'-NH₂-GGG GGG GGG GGG GGG GGG GG-3'

4,2nmol, temperatura de anelamento 72,1 °C

δ) 5'-SH-(CH₂)₇-CCC CCC CCC CCC CCC CCC CC-3'3

7,1nmol, temperatura de anelamento 72,1 °C

Água ultrapura (resistividade $\geq 18,2\text{M}\Omega$ cm a 298K), livre de DNase, foi adicionada a cada fita simples de DNA para obter uma solução estoque de 10 $\mu\text{mol/L}$. Esta solução foi dividida em alíquotas de 50 μL e estocadas adequadamente a -20°C.

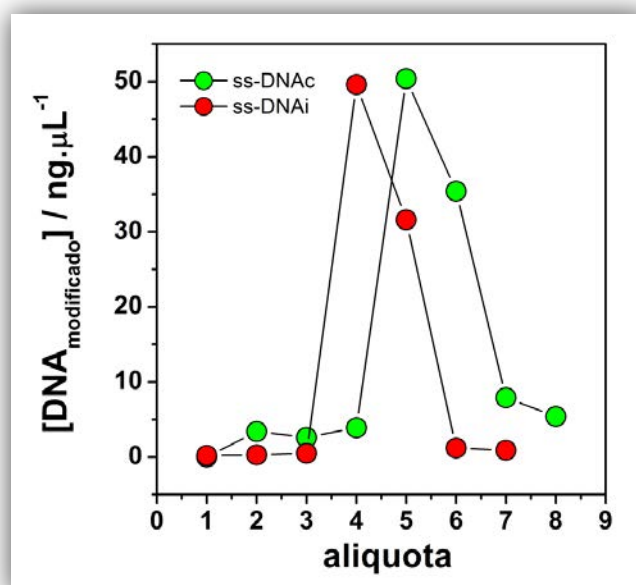
Parte II – Modificação da fita simples de DNA com ferroceno

Conforme pode ser observado na Figura 16, a etapa I envolveu a reação de modificação dos ss-DNA A e C com éster ferroceno carboxilado de N-hidroxissuccinamida (Fc-NHS, *purity above 98%*, *FIVEphoton Biochemicals*, San Diego, USA). Para esta reação 100 μL de Fc-NHS (0,175mg/mL) em dimetilformamida com 350 μL de ss-DNA (10 $\mu\text{mol/L}$) e 50 μL de tampão carbonato (0,2mol/L, pH 9,5) foram adicionados a um tubo de 1,5mL, deixando reagir por uma noite (12h) a 4 °C e ao abrigo de luz.

Após a modificação das ss-DNA com ferroceno, as soluções foram purificadas para remover todo o ferroceno que não reagiu a fim de evitar sinais eletroquímicos

indesejáveis. Para isto, utilizou-se uma coluna de exclusão molecular de dextran comprada da empresa *ThermoFisher Scientific* (Waltham, USA) com um limite de separação (em inglês chamado de *cut-off*) de 5.000Da. A separação ocorreu por gravidade com velocidade de fluxo de aproximadamente 60mL/h. A coluna foi primeiramente condicionada com solução tampão carbonato (0,22mol/L, pH 9,5), adicionando 30 alíquotas de 1mL, e posteriormente com 5 alíquotas de 1mL de H₂O ultrapura. Então, 500µL da solução de ss-DNA modificada com ferroceno foram injetadas dentro da coluna seguido por 20 alíquotas de 0,5mL de H₂O ultrapura. Alíquotas de 500µL foram coletadas e analisadas por UV-Vis (com um Fluorespectrômetro NanoDrop 3300 também da *ThermoFisher Scientific*) em comprimento de onda de 260nm. As duas alíquotas com maior absorbância, como mostrado na Figura 17. (alíquotas 4 e 5 para o ss-DNAi e alíquotas 5 e 6 para o ss-DNAc), foram reservados, misturados, liofilizados e estocados.

Figura 17 - Concentração da fita simples de DNA condutor e isolante (ss-DNAc e ss-DNAi, respectivamente) modificada com ferroceno nas diferentes alíquotas do processo de purificação por coluna de separação molecular. Cada alíquota possuía um volume de 0,5mL. O valor de concentração está relacionado com a absorbância de cada alíquota em comprimento de onda de 260nm.



Fonte: autor.

Parte III – Reação de hibridização

Uma alíquota da solução 10 μ mol/L de ss-DNA modificada com ferroceno com o mesmo volume da solução de fita simples complementar em igual concentração foram diluídas com uma mistura de solução de tampão fosfato salino 0,1mol/L e solução de cloreto de magnésio 0,5mol/L para obter uma solução de fita dupla de DNA (ds-DNA) com concentração igual a 300nmol/L e volume final de aproximadamente 0,7mL. O processo de hibridização envolveu a cadeia α com a β (sistema condutor, ds-DNAc) e cadeia χ com δ (sistema isolante, ds-DNAi), conforme descritas na Parte I.

A mistura reacional foi incubada durante 1h a 42°C e homogeneizada a 700rpm em um *Termomixer* 5436 da *Eppendorf* (Hamburg, Alemanha). A reação foi parada por choque térmico com banho de gelo. A solução resultante foi dividida em alíquotas de 50 μ L e estocadas adequadamente a -20°C.

Parte IV – Modificação do eletrodo com DNA

Antes de qualquer imobilização, o eletrodo foi polido e tratado eletroquimicamente conforme descrito na metodologia anterior. Para imobilizar o DNA de fita dupla sobre o eletrodo, uma gota (aproximadamente 5-10 μ L) da solução 300nmol/L do DNA modificado foi adicionada na superfície do eletrodo por 12 h ao abrigo da luz. O eletrodo foi lavado com H₂O ultra pura, secado com N₂ e, então, cerca de 50 μ L de solução etanólica 20mmol/L de 6-mercaptohexan-1-ol foi usada para bloquear a superfície. Depois de 12h, o eletrodo foi lavado com etanol absoluto (com baixo conteúdo de metal), H₂O ultrapura e secado com N₂. As medidas eletroquímicas foram realizadas imediatamente após a imobilização.

Parte V – Medidas eletroquímicas

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um *Electrochemical workstation* 650C da *CH instruments* (Austin, USA) com um sistema de 3 eletrodos: eletrodo de trabalho de disco de Au (área eletroativa variando de 0,04857 até 0,05672 cm²); contra-eletrodo de fio, em espiral, de Pt (área igual a 1,885cm²); e eletrodo de referência Ag|AgCl (KCl 3mol/L).

Os voltamogramas cíclicos foram obtidos em intervalo de potencial de -0,2 a +0,7V, com velocidade de varredura de 500mV/s, passo de potencial variável (1mV a 10mV) em 3 ciclos. Realizou-se também os voltamogramas cíclicos em 100mV/s (dados não apresentados devido à falta de definição do par de pico redox).

As medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica foram realizadas em intervalo de frequência de 100kHz a 10mHz, amplitude de potencial de 10 mV (*rms*), com aproximadamente 10 pontos por década, tempo de espera de 300s e potencial dc (potencial bias) que variou de 0,1 a 0,5V. Este parâmetro está destacado em cada espectro. Os ajustes dos espectros de impedância com os circuitos elétricos equivalentes foram realizados com o programa *ZView 2 version 3.2b Copyright*® Scribner Associates, Inc. Os testes preliminares de impedância para delimitar a frequência e para escolher a amplitude do potencial AC foi baseado na Tese de doutorado de Akita [123].

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

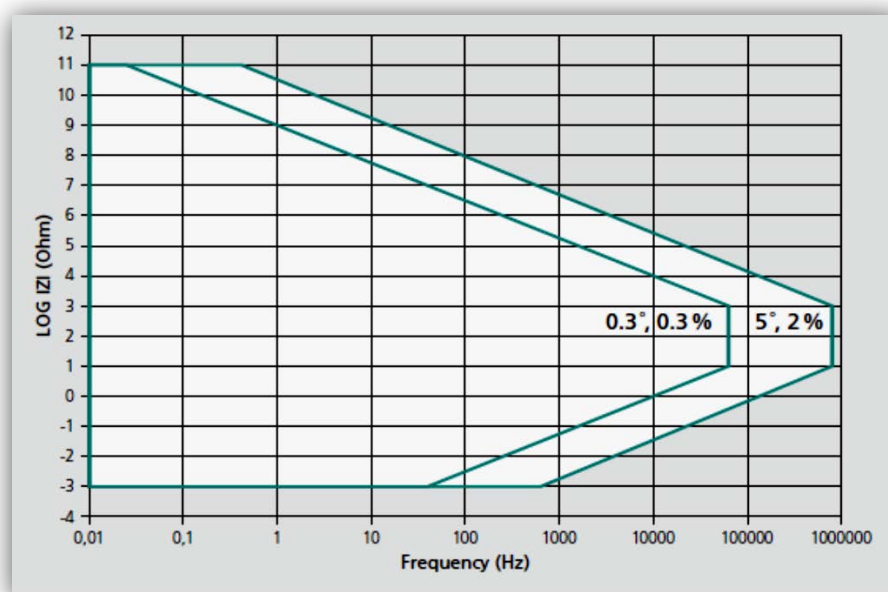
Os resultados dividem-se em duas seções principais, na mesma ordem descrita na parte experimental. A primeira refere-se às medidas de oligonucleotídeos de fita dupla imobilizados em eletrodo de ouro com solução de azul de metileno, reagente intercalante com propriedades redox bastante usado na literatura para investigar eletroquimicamente a cinética de transferência de carga por meio do ds-DNA. Na segunda parte está descrito as fitas duplas e curtas desta biomolécula, modificadas com um grupo ferroceno, imobilizadas em eletrodos de ouro em solução de NaClO₄. Antes de apresentar os resultados de ds-DNA imobilizado, há uma seção de testes preliminares de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) para definir a amplitude de potencial AC e o intervalo de frequência.

5.1 Testes preliminares de EIS para delimitar o intervalo de frequência e a escolha da amplitude de potencial AC.

Antes de iniciar as medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica, é necessário verificar se o equipamento utilizado possui precisão suficiente para a investigação do sistema desejado. Esta análise se faz por meio do gráfico de contorno de precisão. Para maiores detalhes do gráfico de contorno de precisão, ver

a referência [123]. Na Figura 18 está apresentado o gráfico de contorno de precisão disponibilizado pelo fornecedor do equipamento, o qual delimita o módulo de impedância mínimo e máximo em função da frequência com erro de 0,3 ou 2%. É possível ainda estimar a capacitância mínima mensurável pela equação de reatância capacitiva. Os valores dos parâmetros aqui mencionados estão relatados na legenda da Figura 18.

Figura 18 - Gráfico de contorno de precisão típico de um modo potenciostático PGSTAT302N/FRA2, com amplitude AC 350mV (rms), em que a máxima impedância mensurável é de $10^{11}\Omega$; a capacitância mínima mensurável não é apresentada, mas um cálculo aproximado segundo o gráfico de contorno de precisão apresentado abaixo permite estimar que está compreendido no intervalo 10-100nF; a região de baixa impedância em alta frequência é de aproximadamente 10 em 1MHz e 10^{-3} em 10mHz; e a menor impedância mensurável é de $10^{-3}\Omega$. Para que a medida tenha uma boa precisão, os valores de impedância devem estar compreendidos na área branca destacada no gráfico.

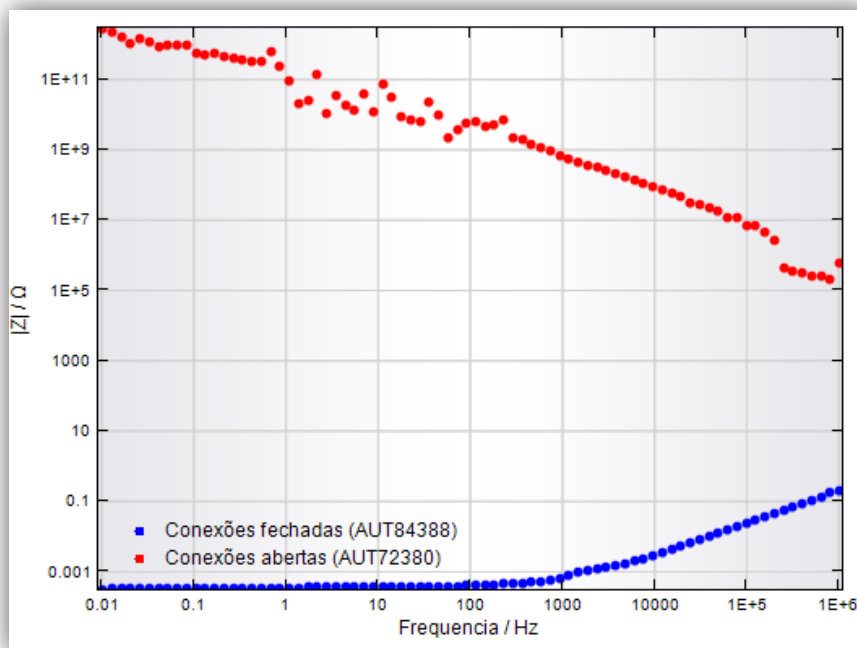


Fonte: Nota técnica AUTOLAB: *Modular electrochemical and surface plasmon resonance instruments*.

O contorno de precisão não mostra os valores de impedância máximo ou mínimo, mas sim valores com desvio máximo de 0,3 ou 2% para o potenciostato da AUTOLAB. Para ter as limitações de impedância e capacitância do equipamento em valores absolutos, devem-se realizar medidas de impedância com os conectores do potenciostato abertos (curva superior), espaçados o máximo possível, e também

fechados (curva inferior), i.e., em curto-circuito, cujos resultados estão expostos na Figura 19.

Figura 19 - Curva de contorno de precisão real do equipamento em que se realizaram as medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica. Amplitude do potencial AC usada foi de 350 mV.



Fonte: autor.

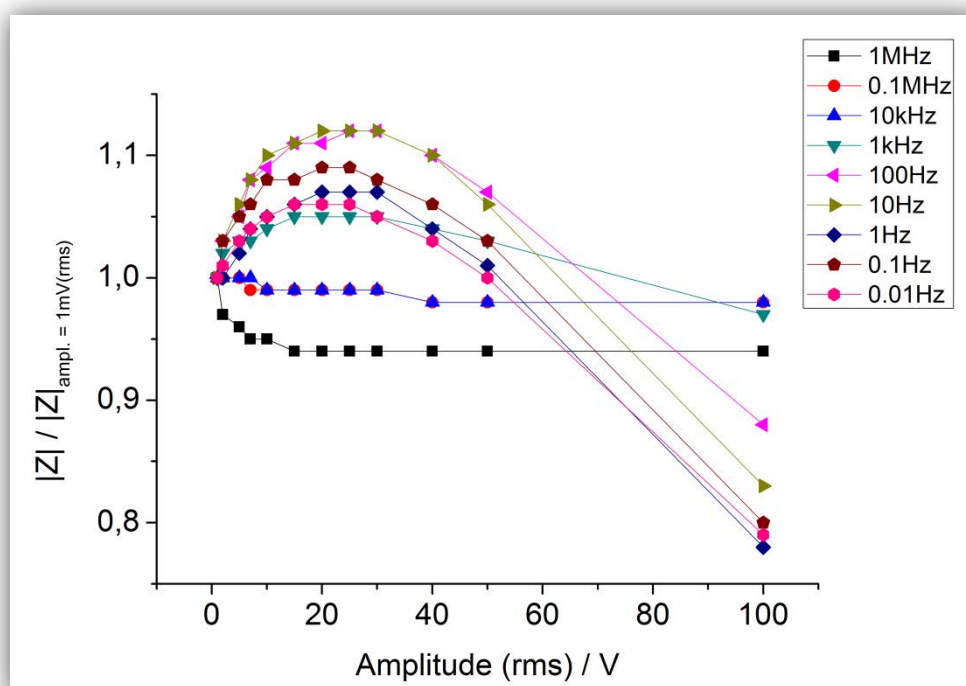
Com os conectores abertos a impedância máxima e capacitância mínima obtidas foram $3 \times 10^{12} \Omega$ e $5 \times 10^{-12} F$. Já com os conectores em curto-circuito, a impedância mínima foi de $3 \times 10^{-4} \Omega$. Estes valores foram obtidos pela simulação da situação de impedância tendendo ao infinito ou à zero, respectivamente.

Além de verificar os limites de medida do equipamento, um ponto bastante importante que deve ser feito antes de analisar os espectros de impedância eletroquímica é a escolha da amplitude do potencial AC. Este valor deve ser alto o suficiente para que a razão sinal/ruído seja a máxima possível, contudo respeitando a condição de linearidade do sinal aplicado com a resposta obtida. A amplitude AC, por exemplo, pode variar grandemente de um sistema altamente condutor, como de células a combustível [124] (potencial AC de 10mV ou ainda menor), para outro

altamente resistivo, igual ao biodiesel [123] (potencial AC de 1,2V). Portanto, deve-se analisar qual é a melhor amplitude AC para cada sistema eletroquímico.

A escolha da amplitude AC pode ser feita analisando as curvas do módulo de impedância em função da amplitude de potencial AC em que quanto mais próxima à curva estiver da unidade e quanto mais os dados em uma dada amplitude AC convergirem, o sistema tende mais à linearidade [125]. Para o sistema do eletrodo de ouro desnudo imerso em solução tampão fosfato salino (PBS) 0,1mol/L, pH 7,4, e aplicando um potencial DC de 0,1V vs Ag|AgCl, conforme apresentado na Figura 20, notou-se que a linearidade é seguida em amplitudes AC inferiores a 50mV. Observou-se ainda que o desvio da unidade é mais acentuado nas curvas de frequências inferior a 10kHz e que as curvas em alta frequência são mais constantes (tendem a uma assíntota horizontal) em amplitude igual e superior a 10mV.

Figura 20 - Curvas do módulo de impedância em diferentes frequências em função da amplitude AC, utilizando como referência a medida realizada em amplitude de 1mV. O sistema eletroquímico usado nas medidas foi em solução tampão fosfato salino (PBS) 0,1mol/L, pH=7,4, e aplicando um potencial DC de 0,10 V vs Ag|AgCl..



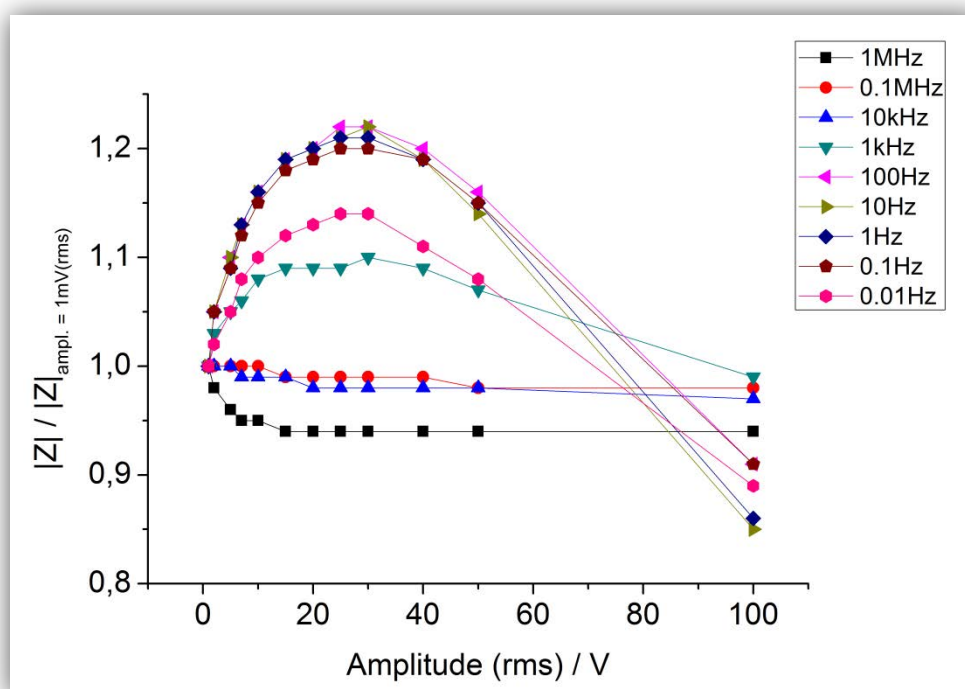
Esta medida foi realizada 5 vezes e a média e desvio padrão dos valores estão apresentados na Tabela 1. Conforme apresentado nesta tabela, foi possível observar claramente que, em amplitude AC de 100mV, o desvio da unidade é maior que as demais amplitudes, principalmente em baixas frequências. De acordo com a média e desvio padrão, qualquer amplitude AC inferior a 50mV segue a linearidade e, portanto, pode ser utilizada nas medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica. A média e desvio padrão global, destacado em negrito, exclui a referência (1mV) que não possui desvio.

Tabela 1 - Valores médios de $|Z|/|Z|_{\text{ampl.} = 1\text{mV (rms)}}$ em função da amplitude do potencial AC, obtidos para eletrodos de ouro em solução tampão fosfato salino (PBS) 0,1mol/L, pH 7,4, e aplicando um potencial DC de 0,1 V vs Ag|AgCl.

Amplitude (mV rms)	Frequência / Hz									Média	Desv. Pad.
	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	10	1	10^{-1}	10^{-2}		
1	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
2	0.97	1.00	1.00	1.02	1.03	1.03	1.00	1.03	1.01	1.01	0.02
5	0.96	1.00	1.00	1.03	1.05	1.06	1.02	1.05	1.03	1.02	0.03
7	0.95	0.99	1.00	1.03	1.08	1.08	1.04	1.06	1.04	1.03	0.04
10	0.95	0.99	0.99	1.04	1.09	1.10	1.05	1.08	1.05	1.04	0.05
15	0.94	0.99	0.99	1.05	1.11	1.11	1.06	1.08	1.06	1.04	0.06
20	0.94	0.99	0.99	1.05	1.11	1.12	1.07	1.09	1.06	1.05	0.06
25	0.94	0.99	0.99	1.05	1.12	1.12	1.07	1.09	1.06	1.05	0.06
30	0.94	0.99	0.99	1.05	1.12	1.12	1.07	1.08	1.05	1.04	0.06
40	0.94	0.98	0.98	1.04	1.10	1.10	1.04	1.06	1.03	1.03	0.05
50	0.94	0.98	0.98	1.03	1.07	1.06	1.01	1.03	1.00	1.01	0.04
100	0.94	0.98	0.98	0.97	0.88	0.83	0.78	0.80	0.79	0.88	0.09
										1.02	0.05

O mesmo foi realizado para o sistema de eletrodo de ouro desnudo imerso em uma solução de PBS 0,1mol/L, pH 7,4, e aplicando um potencial DC de 0,25V vs Ag|AgCl, sendo apresentada na Figura 21. A análise estatística para este conjunto de dados está exposta na Tabela 2. Notou-se que o aumento do potencial DC (de 0,10V para 0,25V) provoca maior desvio da linearidade, independente da amplitude AC. Há também um desvio da unidade maior para as medidas em baixa frequência ($\leq 1\text{kHz}$).

Figura 21 - Curvas do módulo de impedância em diferentes frequências em função da amplitude AC, utilizando como referência a medida realizada em amplitude de 1mV. O sistema eletroquímico usado nas medidas foi em solução tampão fosfato salino (PBS) 0,1mol/L, pH 7,4, e aplicando um potencial DC de 0,25V vs Ag|AgCl.



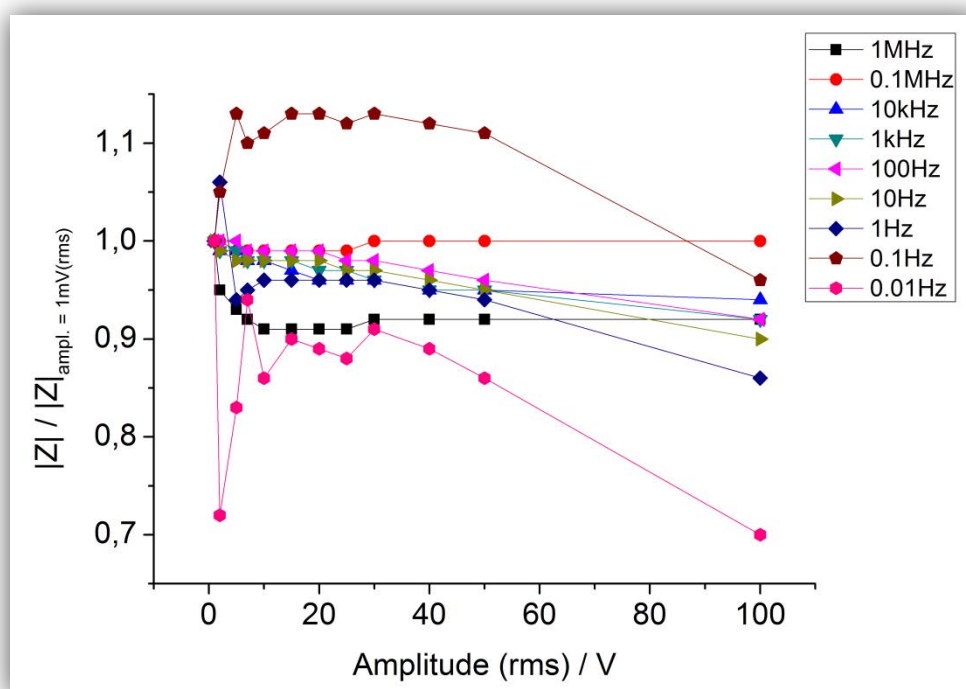
Fonte: autor.

Tabela 2 - Valores médios de $|Z|/|Z|_{\text{ampl.} = 1\text{mV (rms)}}$ em função da amplitude do potencial AC, obtidos para eletrodos de ouro em solução de PBS 0,1mol/L e aplicando um potencial DC de 0,25V vs Ag|AgCl.

Amplitude (mV rms)	Frequência / Hz										Média	Desv. Pad.
	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	10	1	10^{-1}	10^{-2}			
1	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
2	0.98	1.00	1.00	1.03	1.05	1.05	1.05	1.05	1.05	1.02	1.02	0.03
5	0.96	1.00	1.00	1.05	1.10	1.10	1.09	1.09	1.09	1.05	1.05	0.05
7	0.95	1.00	0.99	1.06	1.13	1.13	1.13	1.12	1.12	1.08	1.07	0.07
10	0.95	1.00	0.99	1.08	1.16	1.16	1.16	1.15	1.15	1.10	1.08	0.09
15	0.94	0.99	0.99	1.09	1.19	1.19	1.19	1.18	1.18	1.12	1.10	0.10
20	0.94	0.99	0.98	1.09	1.20	1.20	1.20	1.19	1.19	1.13	1.10	0.11
25	0.94	0.99	0.98	1.09	1.22	1.21	1.21	1.20	1.20	1.14	1.11	0.11
30	0.94	0.99	0.98	1.10	1.22	1.22	1.21	1.20	1.20	1.14	1.11	0.11
40	0.94	0.99	0.98	1.09	1.20	1.19	1.19	1.19	1.19	1.11	1.10	0.11
50	0.94	0.98	0.98	1.07	1.16	1.14	1.15	1.15	1.15	1.08	1.07	0.09
100	0.94	0.98	0.97	0.99	0.91	0.85	0.86	0.91	0.89	0.92	0.92	0.05
											1.07	0.08

O mesmo procedimento foi realizado para o eletrodo de ouro desnudo imerso em solução de NaClO_4 0,5mol/L em situações eletroquímicas em que se variou o potencial DC aplicado: 0,10V (Figura 22 e Tabela 3) e 0,25V (Figura 23 e Tabela 4) vs Ag|AgCl. Destes sistemas, pode-se destacar o maior desvio da linearidade para os dados em baixa frequência, principalmente em 10mHz. Note-se que o desvio padrão global, destacado em negrito, para o potencial DC 0,25V está elevado devido ao alto desvio da unidade em 10mHz.

Figura 22 - Curvas do módulo de impedância em diferentes frequências em função da amplitude AC, utilizando como referência a medida realizada em amplitude de 1mV. O sistema eletroquímico usado nas medidas foi em solução NaClO_4 0,5mol/L e aplicando um potencial DC de 0,10V vs Ag|AgCl.

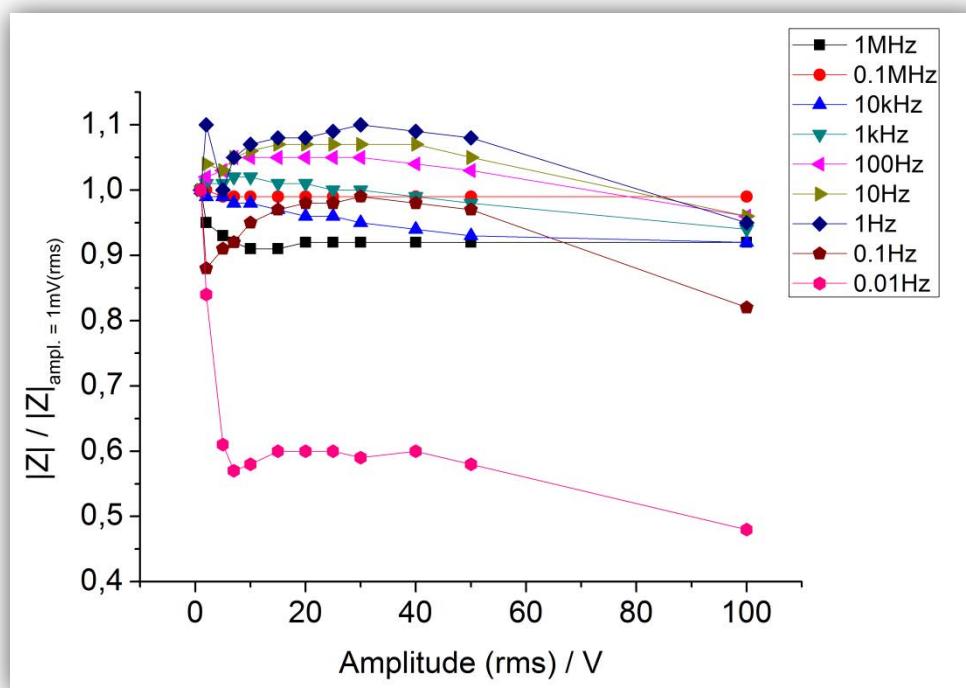


Fonte: autor.

Tabela 3 - Valores médios de $|Z|/|Z|_{\text{ampl.} = 1\text{mV (rms)}}$ em função da amplitude do potencial AC, obtidos para eletrodos de ouro em solução de NaClO_4 0,5mol/L e aplicando um potencial DC de 0,10V vs Ag|AgCl.

Amplitude (mV rms)	Frequência / Hz									Média	Desv. Pad.	
	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	10	1	10^{-1}	10^{-2}			
1	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
2	0.95	1.00	0.99	0.99	1.00	0.99	1.06	1.05	0.72	0.97	0.10	
5	0.93	0.99	0.99	0.99	1.00	0.98	0.94	1.13	0.83	0.97	0.08	
7	0.92	0.99	0.98	0.98	0.99	0.98	0.95	1.10	0.94	0.98	0.05	
10	0.91	0.99	0.98	0.98	0.99	0.98	0.96	1.11	0.86	0.97	0.07	
15	0.91	0.99	0.97	0.98	0.99	0.98	0.96	1.13	0.90	0.98	0.07	
20	0.91	0.99	0.96	0.97	0.99	0.98	0.96	1.13	0.89	0.97	0.07	
25	0.91	0.99	0.96	0.97	0.98	0.97	0.96	1.12	0.88	0.97	0.07	
30	0.92	1.00	0.96	0.96	0.98	0.97	0.96	1.13	0.91	0.98	0.06	
40	0.92	1.00	0.95	0.95	0.97	0.96	0.95	1.12	0.89	0.97	0.06	
50	0.92	1.00	0.95	0.95	0.96	0.95	0.94	1.11	0.86	0.96	0.07	
100	0.92	1.00	0.94	0.92	0.92	0.90	0.86	0.96	0.70	0.90	0.08	
										0.97	0.06	

Figura 23 - Curvas do módulo de impedância em diferentes frequências em função da amplitude AC, utilizando como referência a medida realizada em amplitude de 1mV. O sistema eletroquímico usado nas medidas foi em solução NaClO_4 0,5 mol/L e aplicando um potencial DC de 0,25V vs Ag|AgCl.



Fonte: autor.

Tabela 4 - Valores médios de $|Z|/|Z|_{\text{ampl.} = 10\text{mV (rms)}}$ em função da amplitude do potencial AC, obtidos para eletrodos de ouro em solução de NaClO_4 0,5mol/L e aplicando um potencial DC de 0,25V vs Ag|AgCl.

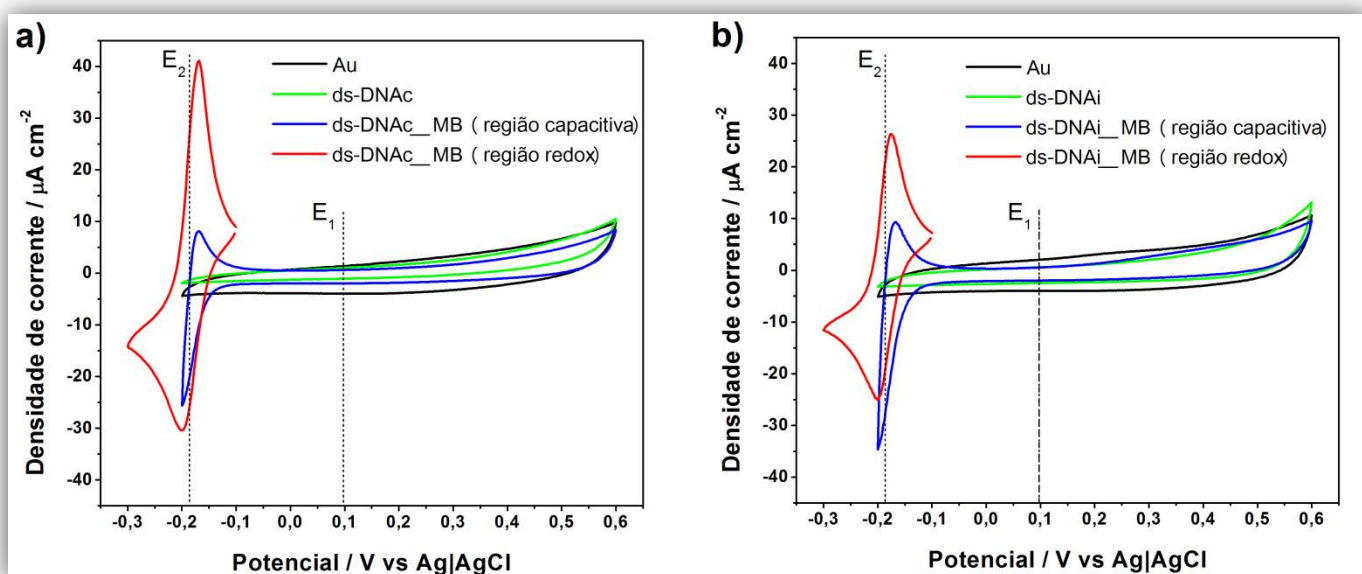
Amplitude (mV rms)	Frequência / Hz									Média	Desv. Pad.
	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	10	1	10^{-1}	10^{-2}		
1	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
2	0.95	1.00	0.99	1.01	1.02	1.04	1.10	0.88	0.84	0.98	0.08
5	0.93	0.99	0.99	1.01	1.03	1.03	1.00	0.91	0.61	0.94	0.13
7	0.92	0.99	0.98	1.02	1.05	1.05	1.05	0.92	0.57	0.95	0.15
10	0.91	0.99	0.98	1.02	1.05	1.06	1.07	0.95	0.58	0.96	0.15
15	0.91	0.99	0.97	1.01	1.05	1.07	1.08	0.97	0.60	0.96	0.15
20	0.92	0.99	0.96	1.01	1.05	1.07	1.08	0.98	0.60	0.96	0.14
25	0.92	0.99	0.96	1.00	1.05	1.07	1.09	0.98	0.60	0.96	0.15
30	0.92	0.99	0.95	1.00	1.05	1.07	1.10	0.99	0.59	0.96	0.15
40	0.92	0.99	0.94	0.99	1.04	1.07	1.09	0.98	0.60	0.96	0.15
50	0.92	0.99	0.93	0.98	1.03	1.05	1.08	0.97	0.58	0.95	0.15
100	0.92	0.99	0.92	0.94	0.96	0.96	0.95	0.82	0.48	0.88	0.16
										0.95	0.14

Como resumo dos testes preliminares, pode-se considerar que o sistema responde linearmente para amplitudes AC $\leq 50\text{mV}$. Para o sistema de PBS 0,1mol/L, isto é válido para todo intervalo de frequência. Contudo, para o sistema de NaClO_4 0,5mol/L, os testes indicam que a resposta não é linear em 10mHz e, portanto, os resultados em frequência menor do que 100mHz para este sistema devem ser desconsiderados na análise de impedância. Em adição, para amplitudes AC $< 10\text{mV}$ há uma variação grande da razão do módulo de impedância, podendo indicar que a resposta é prejudicada pela baixa razão sinal/ruído. Desta maneira, qualquer amplitude AC no intervalo de 10mV a 50mV pode ser usada nas medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica. Para as análises que seguem, foi escolhida a menor amplitude AC possível.

5.2 Monocamadas de tiol e de DNA: resposta eletroquímica em solução de azul de metileno

Após o tratamento eletroquímico do eletrodo e a obtenção da área ativa (ver descrição e variação de valores na parte experimental), medidas voltamétricas dos eletrodos limpos e modificados com o DNA foram realizadas. Os resultados estão apresentados na Figura 24.

Figura 24 - Voltamogramas cíclicos do eletrodo de ouro limpo em PBS 0,1mol/L (pH 7,4) (Au) e do eletrodo modificado com o (a) DNA condutor e (b) DNA isolante e bloqueados com 6-mercaptop-hexan-1-ol 20mmol/L em PBS 0,1mol/L (ds-DNAc e ds-DNAi) e em uma mistura de PBS 0,1mol/L (pH=7,4) com azul de metileno 100 μ mol/L (ds-DNAc_MB e ds-DNAi_MB). Medidas realizadas com velocidade de varredura de 100mV/s. Os potenciais E_1 e E_2 em destaque nas curvas representam os potenciais de circuito aberto e redox do azul de metileno, respectivamente. Estes valores foram usados para realizar as medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica.



Fonte: autor.

Em ambos os sistemas, ds-DNAc (Figura 24a) e ds-DNAi (Figura 24b), o bloqueio da superfície com o DNA foi observado pela diminuição da densidade de corrente capacitiva do sistema em relação à resposta do ouro limpo (Au) quando a medida foi realizada em solução tampão de fosfato salino 0,1mol/L (PBS) sem (curva verde) ou com (curva azul) azul de metileno 100 μ mol/L (MB). Os potenciais E_1 e E_2 , destacados na figura, são os potenciais fora da janela de potencial redox (curva azul) e dentro do potencial redox do azul de metileno (curva vermelha), respectivamente, potenciais utilizados nas medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica. Os termos dentro e fora da janela de potencial redox significam que as medidas eletroquímicas foram realizadas usando valores de potenciais que se encontravam na região do aparecimento do pico redox (dentro da janela de potencial redox) ou então na região em que somente há a resposta capacitiva do sistema (fora da janela de potencial redox).

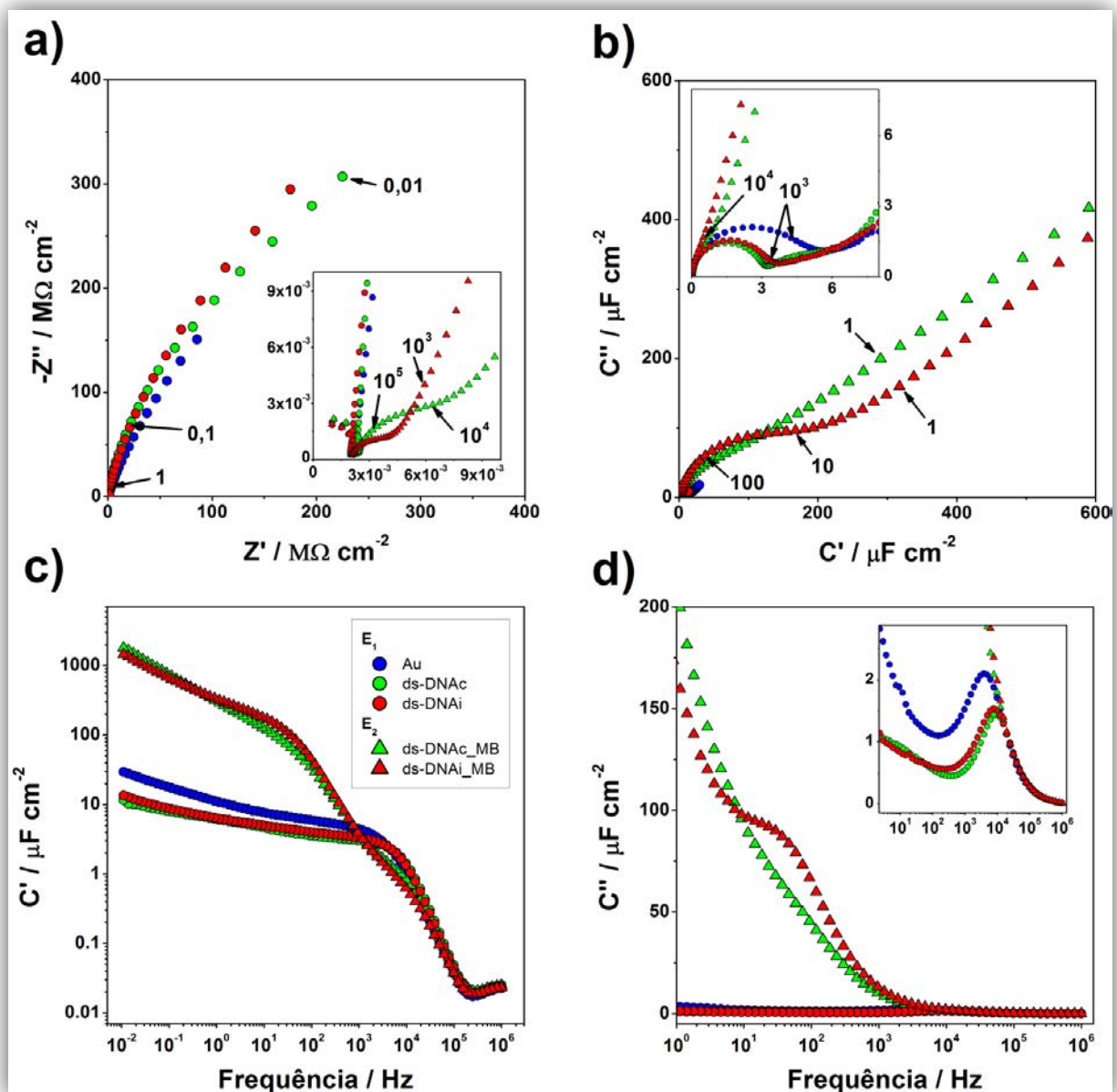
No voltamograma cíclico obtido do DNA em solução PBS com MB, especificamente na região em que se tem a resposta redox desta espécie, observaram-se picos redox em $-0,19\text{V}$ (potencial E_2) com valores de densidade de corrente de $26\mu\text{A}/\text{cm}^2$ e $41\mu\text{A}/\text{cm}^2$ para ds-DNAi e ds-DNAc, respectivamente. Notou-se que a densidade de corrente dos picos redox é maior para o ds-DNAc o que significa que é possível reduzir um maior número de moléculas de MB para o sistema rotulado como condutor. De acordo com Meggers e colaboradores [38], o transporte de carga em ds-DNA é dependente da distância entre o par de bases CG e a velocidade de transferência eletrônica diminui cerca de uma ordem de grandeza com cada par de bases AT adicionada entre os pares de bases CG. O aumento da quantidade de adenina e timina causa o decréscimo exponencial da resposta elétrica e, portanto, os sítios AT agem como barreiras isolantes [40-42]. Como consequência, quanto maior a quantidade de pares de bases AT menor a condução da fita dupla de DNA. Assim, tem-se claro o motivo pelo qual a densidade de corrente é maior no sistema ds-DNAc.

Como pode se observar na curva de ds-DNA obtida em solução PBS com MB (curva azul), há uma corrente não nula fora da janela de potencial redox. Isto indica que o processo de oxidação (potencial $> -0,1\text{V}$) no potencial indicado é controlado por difusão. O azul de metileno na sua forma oxidada MB, possui maior afinidade de intercalação ao DNA em comparação a sua forma reduzida chamada de azul de metileno leuco (LB) [26]. Desta maneira, MB difunde até o DNA e se intercala para que haja a sua redução por meio de uma transferência de carga através do DNA. Assim, o LB formado difunde-se para a solução devido à menor interação com o DNA em comparação ao MB. Em termos de potencial, em um sobrepotencial superior a $-0,1\text{V}$ ocorre preferencialmente a oxidação e o MB se intercala ao DNA. Todavia, mesmo intercalado o MB não é reduzido, pois o sobrepotencial catódico aplicado não é o suficiente. Apenas com a aplicação de sobrepotencial mais catódico é que será obtido o LB, sendo em $-0,19\text{V}$ o valor de equilíbrio da reação redox. Assim, têm-se dois panoramas em função do potencial do eletrodo, conforme realçados na Figura 24: E_1 , em que existe apenas o acúmulo de cargas na superfície do eletrodo; E_2 , no qual a reação redox MB/LB está em equilíbrio.

Os sobrepotenciais descritos anteriormente foram utilizados nas análises de espectroscopia de impedância. O potencial E_1 (+0,10V vs Ag|AgCl) foi aplicado quando a resposta eletroquímica não faradaica da espécie eletroativa MB era desejável. Já o potencial E_2 (-0,19V vs Ag|AgCl) foi usado para estudar a resposta faradaica do MB intercalado ao DNA.

Os espectros de impedância apresentados na Figura 25a mostram as medidas realizadas em uma mistura de PBS 0,1mol/L com MB 100 μ mol/L nos potenciais de E_1 e E_2 , conforme estabelecidos anteriormente. Foi observado na região de mais baixa frequência que a diferença entre as curvas é muito pequena mesmo variando o potencial. Contudo, na região de alta frequência (ver ampliação do espectro de impedância na figura inserida na Figura 25a), observa-se o aparecimento de semicírculos na medida realizada em E_2 indica que o ds-DNA_c valor de impedância é maior em comparação ao ds-DNA_i (7,5k Ω /cm² e 4,5k Ω /cm², respectivamente) segundo a extrapolação dos semicírculos até a interceptação no eixo da abscissa (eixo de impedância real). Estes são valores aproximados e não foram feitos os ajustes das curvas segundo circuitos elétricos equivalentes até este momento. Para a obtenção destes valores, um semicírculo foi desenhado sobre as curvas de impedância para extrapolar o valor de resistência por área. Conforme a premissa de que o ds-DNA_c (rico em CG) possui menor resistência era de se esperar que a impedância observada fosse menor em comparação ao ds-DNA_i.

Figura 25 - Espectros de (a) impedância e (b) capacitância complexas no plano de Nyquist e espectros de capacitância (c) real e (d) imaginária no plano de Bode do eletrodo de ouro limpo (Au) e eletrodos modificados com DNA e bloqueados com 6-mercaptop-hexan-1-ol 20mmol/L em solução tampão fosfato salino (PBS) 0,1mol/L (ds-DNAi e ds-DNAc) e em uma mistura de PBS 0,1mol/L com azul de metileno 100 μ mol/L (ds-DNAi_MB e ds-DNAc_MB). Os dados foram obtidos em intervalo de frequência de 1MHz a 10mHz, potencial de oscilação de 10mV (*rms*), 12 pontos por década e tempo de estabilização de 300s. Medidas realizadas em pH=7,4. Os espectros para o eletrodo de ouro limpo foram obtidos apenas em 0,10 V vs Ag|AgCl (E_1) enquanto que os espectros do eletrodo modificado com ds-DNAi ou ds-DNAc foram obtidos em 0,10V vs Ag|AgCl (E_1) e em -0,19V vs Ag|AgCl (E_2), que é o potencial redox do azul de metileno. Os valores destacados para alguns pontos nos espectros de impedância e capacitância correspondem aos valores de frequência linear. OBS: Onde se lê C'' , leia-se $-C''$.



Com este resultado de resistência inesperado advindo do espectro de impedância, decidiu-se explorar os espectros de capacitância (Figura 25b, c e d) para ter maiores informações. Conforme o trabalho de Bueno, Mizzon e Davis [64] é possível estudar a cinética de transferência eletrônica entre outros parâmetros a partir da análise dos espectros de capacitância de sistemas de monocamadas autoorganizadas contendo espécies eletroativas ligadas covalentemente. De acordo com os autores, este estudo também é aplicável a qualquer interface com um centro redox. O sistema de DNA em estudo poderia encaixar no perfil descrito se a intercalação do azul de metileno fosse considerada uma molécula eletroativa ligada ao DNA, mesmo que por um tempo curto. Levando isto em consideração pode-se analisar os espectros de capacitância da mesma maneira que fez Bueno, Mizzon e Davis [64]. Os conceitos da espectroscopia de capacitância eletroquímica em monocamadas eletroativas já foram discutidos e aplicados em trabalhos científicos que utilizam espécies redox em solução [97-98, 126-127].

Observando os espectros de capacitância complexa no plano de Nyquist, apresentados na Figura 25b, notou-se que existem 2 processos de relaxação. O processo em alta frequência ($10^3 - 10^4$ Hz) que é bem visível em E_1 e, por isso, pode ser associado à resposta dos fenômenos não faradaicos (ver figura inserida na Figura 25b). O segundo processo de relaxação está na região de baixa frequência (10-100Hz) e é relacionado com o aparecimento de semicírculos maiores na mudança do potencial E_1 para E_2 , o qual está associado ao processo redox do MB intercalado ao DNA. Lembra-se neste ponto que, de acordo com os teste preliminares de espectroscopia de impedância eletroquímica, os valores obtidos em frequência inferior a 100mHz não são possíveis de se analisar devido ao desvio da linearidade do sistema. Nos espectros de capacitância real, presentes na Figura 25c, estes 2 processos que armazenam cargas são caracterizados pelos platôs de capacitância real: um no potencial E_1 e outro em E_2 . Em realidade, as curvas em E_2 possuem 2 platôs, todavia aquele localizado entre 10^3 e 10^4 Hz não está nítido.

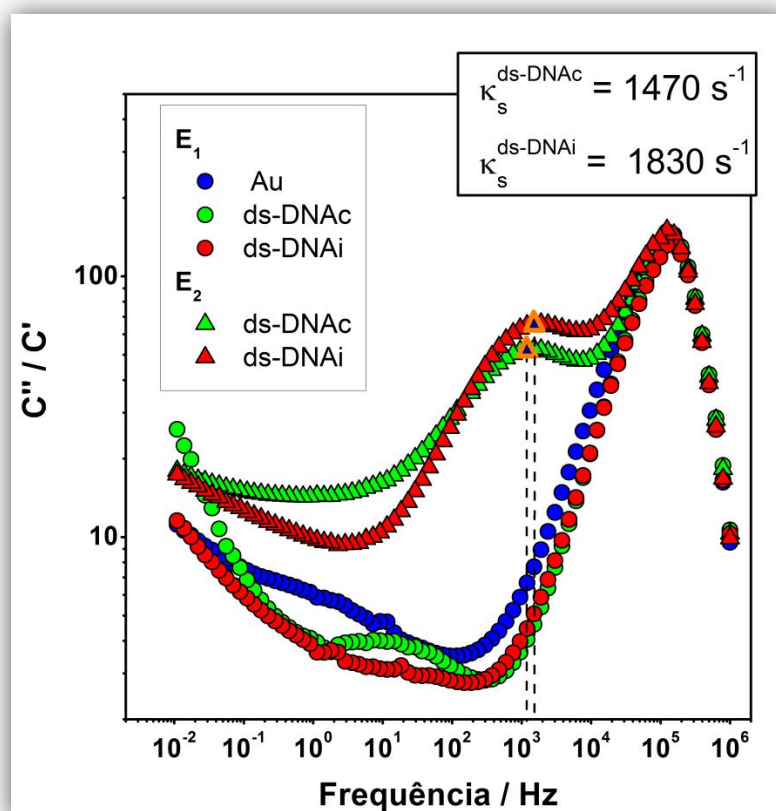
Já os espectros de capacitância imaginária, Figura 25d, um patamar aparece somente para o ds-DNAi. O gráfico inserido na Figura 25d é uma ampliação para observar picos de capacitância na região de alta frequência (aprox. 10^4 Hz) das

medidas realizadas em potencial igual a E_1 . Imaginava-se que apenas para sistemas mais condutores este pico surgiria ou que ele aparecesse com maior intensidade. Porém, os resultados aqui apresentados evidenciaram outro contexto. De acordo com o trabalho de Bueno, Mizzon e Davis [64] ou de Góes e colaboradores [128] os picos de capacitância imaginária se deslocam para a região de mais baixa frequência com o aumento da capacitância redox ou da resistência à transferência de carga. Como pode se observar na Figura 25c, independente do potencial aplicado, a capacitância dos sistemas ds-DNAc e ds-DNAi é praticamente a mesma e, segundo discutido na voltametria da Figura 24 e a descrição feita na literatura, o primeiro sistema (ds-DNAc) é mais condutor, i.e, possui menor resistência. Portanto, o pico do ds-DNAc em E_2 na Figura 25d deveria ser maior e estar posicionado em mais alta frequência.

Conforme apresentado por Benites [126] em seu trabalho de mestrado e em trabalho publicado [127], a relação entre a frequência do pico das curvas de $-C''/C'$ pode ser diretamente relacionada com a cinética de espécies redox em solução. No caso utilizado por ele, houve uma diminuição da constante heterogênea de transferência eletrônica (k_s) em um sistema eletroquímico contendo ferri/ferro (1mmol/L de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3+/4+}$) ao variar o número de carbonos de uma monocamada autoorganizada de tiol sobre a superfície de um eletrodo de ouro. Em outras palavras, quanto maior a resistência do sistema, mais lenta é a reação redox. Os espectros apresentados na Figura 26 exibem a razão entre a capacitância imaginária e real em função da frequência para os sistemas em estudo nesta tese. Nesta figura, observou-se um pico próximo a 10^5Hz em todas as curvas, um pico ao redor de 10^3Hz apenas nas curvas quando aplicado o potencial E_2 e um terceiro pico em aproximadamente 10Hz somente na curva ds-DNAc em potencial E_1 . Em altas frequências, o fenômeno de indutância de cabos ou outros fatores inerentes ao sistema eletroquímico utilizado na análise podem contribuir para uma resposta nos espectros e que não tem relação com o sistema estudado. Deste modo, o pico próximo a 10^5Hz pode ter esta origem e não ser de interesse. Fazendo uso da mesma análise realizada por Benites [126], tem-se que as constantes para os sistemas ds-DNAc e ds-DNAi são bem parecidas e ligeiramente maiores para o ds-DNAi, conforme os dados inseridos na parte superior direita da Figura 26. Estes

resultados indicam que praticamente não há diferença de condutividade entre as diferentes fitas duplas de DNA estudadas ou que o ds-DNAi é um pouco mais condutor. As conclusões tomadas com as respostas voltamétricas e impedimétricas apresentadas anteriormente não permite afirmar que um sistema é melhor condutor elétrico do que o outro.

Figura 26 - Espectros da razão entre a capacitância imaginária pela real no plano de Bode do eletrodo de ouro limpo (Au) e eletrodos modificados com DNA em solução tampão fosfato salino (PBS) 0,1mol/L (ds-DNAi e ds-DNAc) e em uma mistura de PBS 0,1mol/L com azul de metileno 100 μ mol/L (ds-DNAi_MB e ds-DNAc_MB). Os dados foram obtidos em intervalo de frequência de 1MHz a 10mHz, potencial de oscilação de 10 mV (rms), 12 pontos por década e tempo de espera de 300s. Medidas realizadas em pH=7,4. Os espectros para o eletrodo de ouro limpo foram obtidos apenas em 0,10V vs Ag|AgCl (E_1) enquanto que os espectros do eletrodo modificado com ds-DNAi ou ds-DNAc foram obtidos em 0,10V vs Ag|AgCl (E_1) e em -0,19V vs Ag|AgCl (E_2), que é o potencial redox do azul de metileno. OBS: Onde se lê C'' , leia-se - C'' .

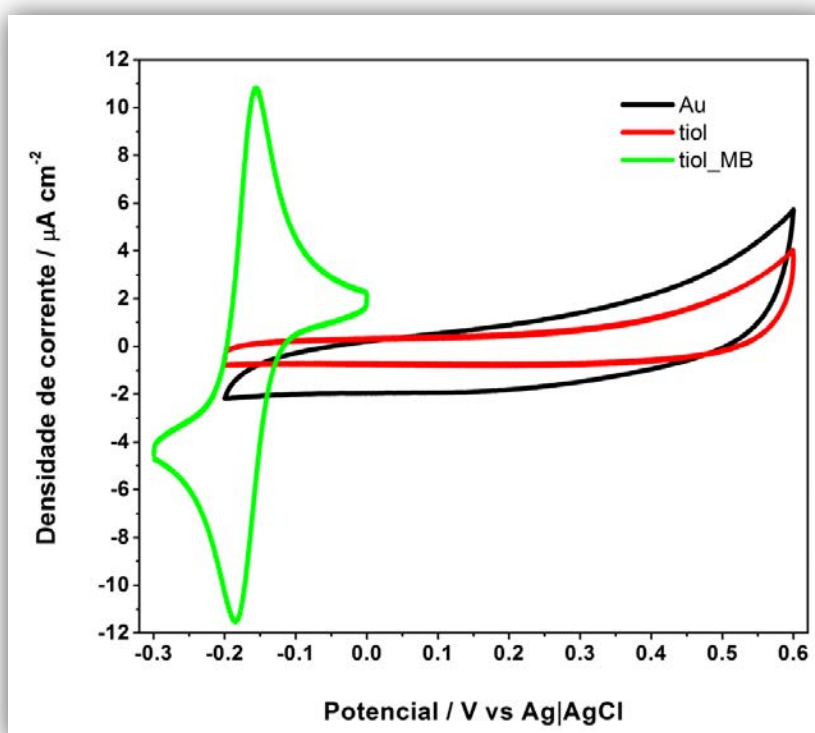


Fonte: autor.

Até este ponto não foi mostrada a resposta eletroquímica da monocamada de tiol que bloqueia o eletrodo, o que poderia contribuir pela transferência eletrônica do MB via tunelamento pela monocamada de tiol, ou ainda pela própria superfície do

eletrodo em contato direto com a solução devido a um defeito da SAM como *pinholes*. Para tanto, após o pré-tratamento da superfície (polimento manual e tratamento eletroquímico), o eletrodo de ouro desnudo e imobilizado com 6-mercaptop-hexan-1-ol foi caracterizado eletroquimicamente em solução PBS $0,1\mu\text{molL}^{-1}$ e também em solução PBS $0,1\text{molL}^{-1}$ com MB $100\mu\text{molL}^{-1}$. Este processo foi acompanhado por voltametria cíclica como observado na Figura 27, nesta figura mostra-se uma diminuição da densidade de corrente capacitiva do sistema devido à imobilização. Em seguida, a resposta do eletrodo modificado foi testada com uma solução tampão PBS $0,1\text{mol/L}$ com azul de metileno $100\mu\text{mol/L}$ para observar apenas a região de resposta redox do azul de metileno por voltametria cíclica. Os picos de óxido-redução ao redor de $-0,2\text{V}$ vs Ag|AgCl (o valor exato encontrado foi de $-0,17\text{V}$ vs Ag|AgCl) caracterizam o processo de transferência de carga correspondente ao azul de metileno, conforme comentado anteriormente, e confirmam uma contribuição faradaica da monocamada de tiol para os sistemas contendo DNA. A fim de verificar esta contribuição de maneira quantitativa, os valores de densidade de corrente de pico para o sistema somente com 6-mercaptop-hexan-1-ol (Figura 27) e com monocamada de DNA (para o sistema condutor e isolante, ver Figura 24) foram comparados, calculando a porcentagem do primeiro em relação ao segundo. Deste modo, foi possível estimar que a monocamada de tiol contribuiu de 26 a 41% na resposta voltamétrica. Esta contribuição foi maior quando analisado o sistema de DNA isolante e, portanto, a resposta impedimétrica em testes feitos anteriormente está sofrendo interferência da reação redox em paralelo do azul de metileno sem intercalação.

Figura 27 - Voltamogramas cíclicos em PBS 0,1mol/L (pH 7,4) do eletrodo de ouro antes (Au) e depois (tiol) da modificação com 6-mercaptop-hexan-1-ol e também em PBS 0,1mol/L (pH 7,4) com azul de metileno 100 μ mol/L (MB) (tiol_MB). Há a resposta redox do MB em monocamadas auto-organizadas de 6-mercaptop-hexan-1-ol de acordo com o par de picos na curva tiol_MB.



Fonte: autor.

De acordo com Pheeney e Barton [58], a utilização de sondas redox que se ligam não covalentemente ao DNA, como é o caso do agente intercalante azul de metileno, não permite a localização exata da posição de interação com o DNA. Além disso, destacou-se o requerimento indubitável de filmes de DNA de elevada qualidade, o que significa que a monocamada autoorganizada da biomolécula deve ser altamente densa e o bloqueio da superfície deve ser eficiente. Como observado na Figura 27, a SAM de 6-mercaptop-hexan-1-ol não foi suficiente para o bloqueio da superfície e evitar a transferência eletrônica do MB. Além disso, a resposta de impedância indica que o filme de DNA não era altamente denso.

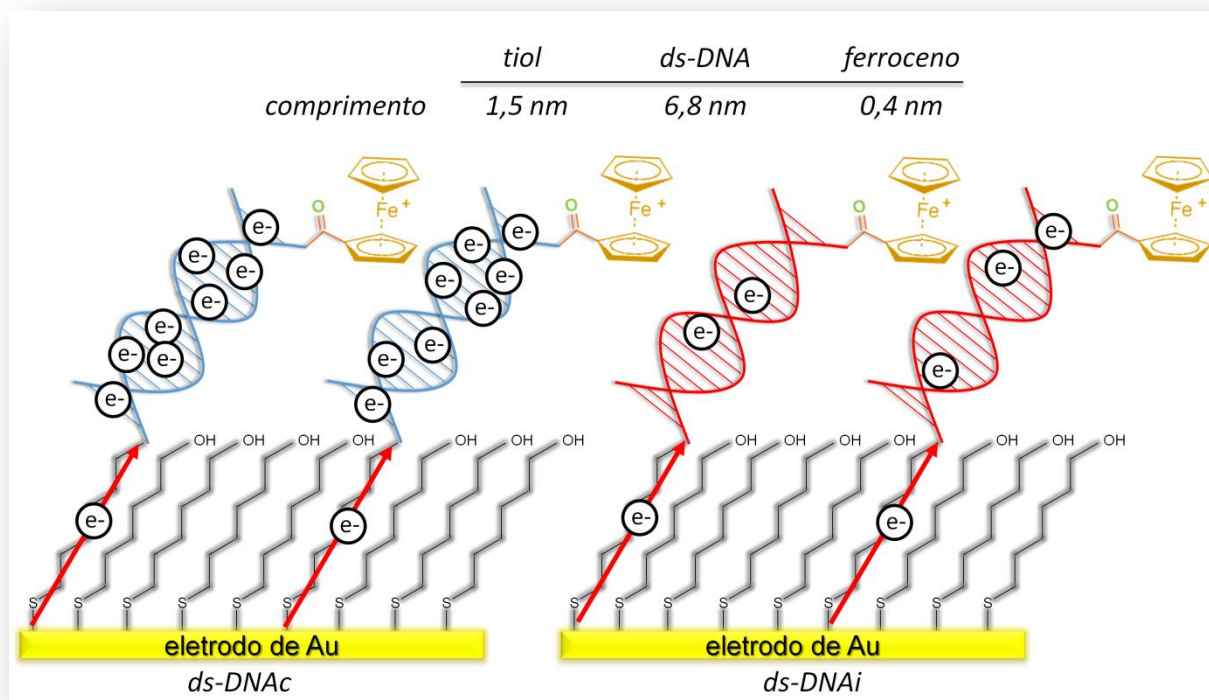
Os dados de impedância obtidos da SAM de 6-mercaptop-hexan-1-ol em solução de PBS 0,1mol/L com MB 100 μ mol/L não foram analisados devido ao fato que o sistema de interesse é a monocamada de DNA e também porque com este

meio eletroquímico não foi possível distinguir a condução entre ds-DNA_c e ds-DNA_i. Outra forma de análise destes sistemas apresenta-se mais adiante, consistindo na modificação do DNA com um grupo ferroceno.

5.3 Monocamadas de DNA modificadas com um grupo ferroceno

Como foi comentado, o processo de transferência de carga via tunelamento entre o eletrodo com a monocamada de tiol e a espécie eletroativa azul de metileno prejudica a visualização do processo de condutividade da fita dupla de DNA por ser um processo que ocorre em paralelo. Como consequência, as respostas eletroquímicas do azul de metileno observadas devido à transferência eletrônica com a monocamada de tiol e pela intercalação no DNA foram indistinguíveis por espectroscopia de impedância eletroquímica. Desta maneira, foi necessário adicionar ao sistema uma espécie eletroativa com especificidade para obter a resposta eletroquímica pura do DNA e analisá-la por EIE. Com este propósito, a molécula de ferroceno foi escolhida para ser ligada ao DNA pela extremidade 5' modificada com um grupo -NH₂. Os detalhes experimentais foram apresentados anteriormente. O resultado final da metodologia foi duas diferentes configurações em que a principal diferença foi a condutividade do DNA. Como esquematizado na Figura 28, existe um ds-DNA_c, rico em citosina e guanina (CG), e um ds-DNA_i, rico em adenina e timina (AT). Em tese, como já descrito anteriormente, um fluxo de elétrons atravessa com maior facilidade o ds-DNA_c quando um potencial de varredura anódico é aplicado e o grupo ferroceno é oxidado. Note que a denominação para os DNAs é a mesma que utilizada para as medidas com azul de metileno, todavia a sequência de bases nitrogenadas muda ligeiramente. Contudo, a tese levantada de que um oligonucleotídeo é mais condutor do que o outro não é alterada.

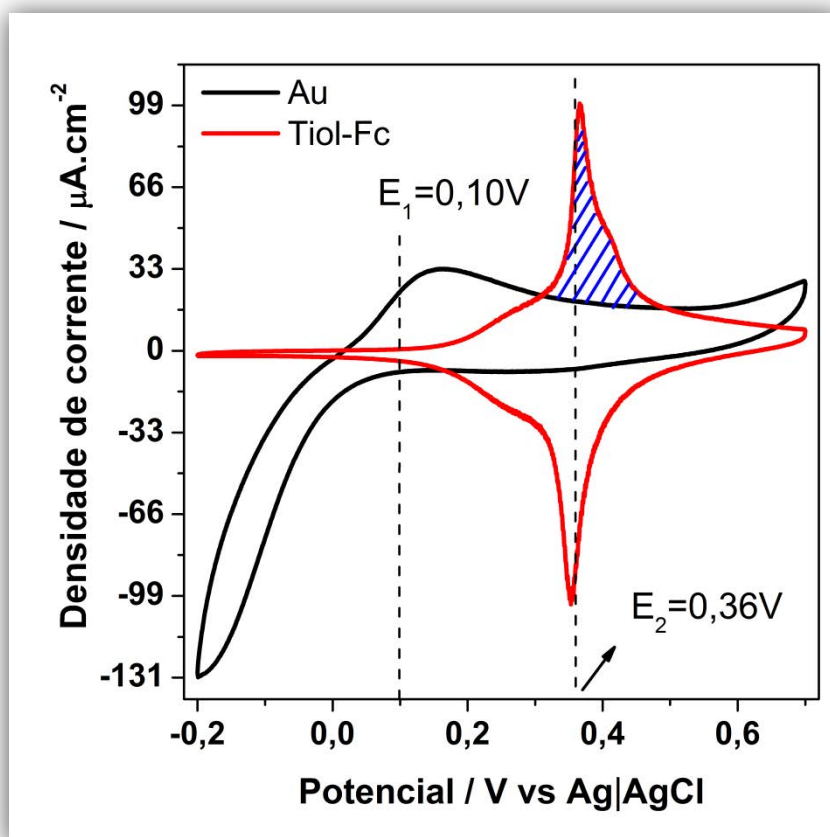
Figura 28 - Representação esquemática dos sistemas ds-DNAc (à esquerda) e ds-DNAi (à direita) modificados com ferroceno e immobilizados na superfície do eletrodo de ouro. A tese levantada é exemplificada neste esquema com a maior quantidade de elétrons que atravessam o DNA no sistema ds-DNAc. O comprimento de cada molécula também é apresentado.



Fonte: autor.

A caracterização do sistema foi efetuada eletroquimicamente por voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE). Primeiramente foi caracterizada a monocamada de tiol com o 6-ferrocenil-hexano-1-tiol (Tiol-Fc) em meio de NaClO_4 0,5M, antes e após a modificação do eletrodo, como é apresentada na Figura 29. O par de picos redox bastante acentuado ao redor de 0,36 V evidenciou a presença da molécula de ferroceno na monocamada autoorganizada sobre a superfície do eletrodo e a pequena variação de potencial entre os picos de oxidação e redução ($\Delta E = 7\text{mV}$) evidenciou a reversibilidade do sistema.

Figura 29 - Voltamogramas cíclicos em NaClO_4 0,5M do eletrodo de ouro antes (Au) e depois (Tiol-Fc) da modificação com 6-ferrocenil-hexano-1-tiol. A separação entre picos redox do tiol com ferroceno de 7mV demonstra a reversibilidade do sistema estudado. Apresentado o último voltamograma cíclico de uma série de 3 ciclos. A área hachurada em azul corresponde à oxidação do ferro de todos os grupos ferroceno na superfície do eletrodo. Em outras palavras, a integral desta área se refere à densidade superficial de moléculas no eletrodo, que é igual a $7,5 \times 10^{12}$ moléculas/cm².



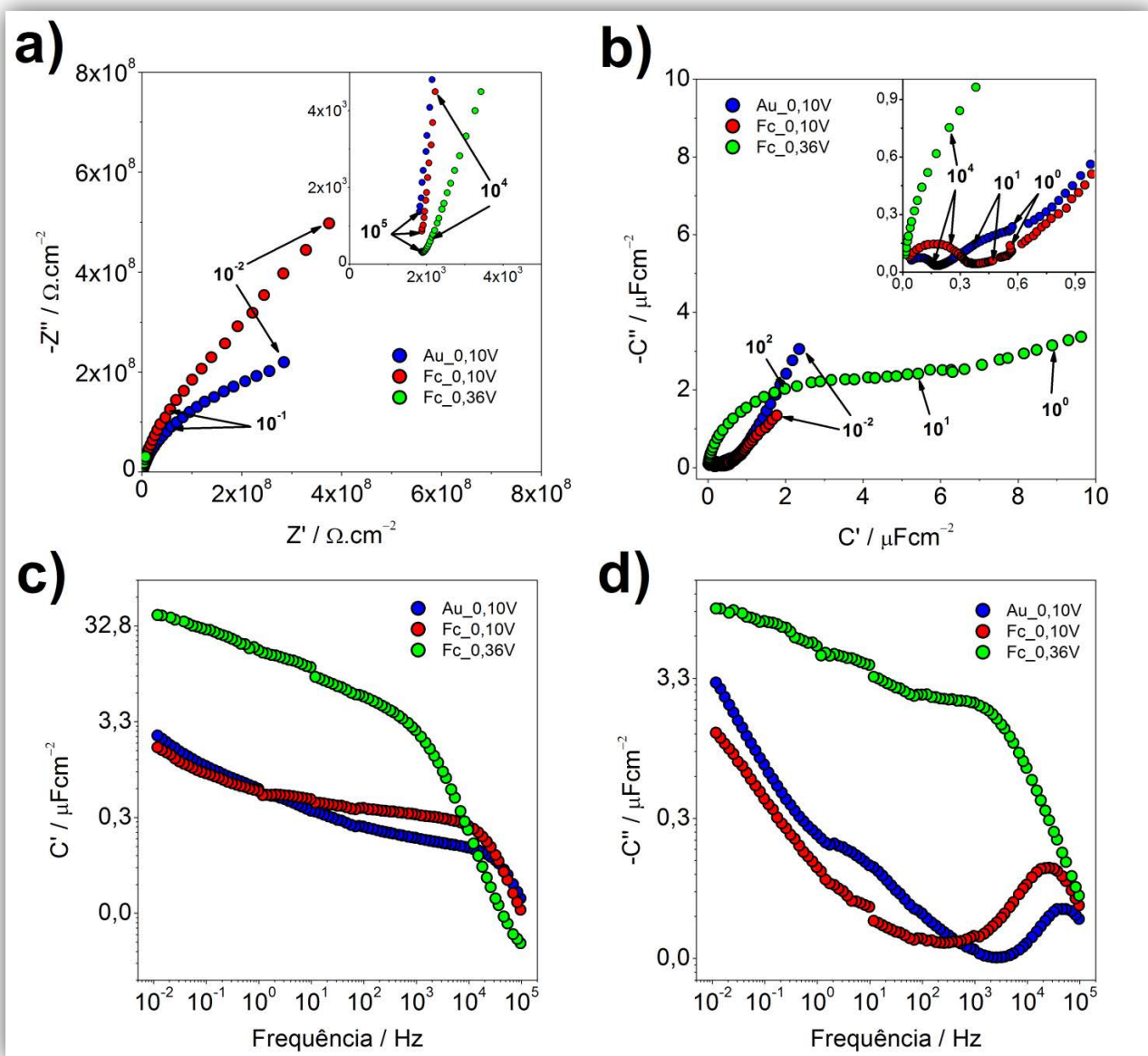
Fonte: autor.

O sinal voltamétrico encontrado é muito parecido com o descrito na literatura para o 11-ferrocenil-undecano-1-tiol immobilizado em uma superfície de ouro com orientação (111) [129], indicando boa organização local do 6-ferrocenil-hexano-1-tiol segundo a resposta mostrada na Figura 29. Os ombros associados ao par de pico redox indicam defeitos na superfície, sendo mais acentuados com o aumento destes defeitos. Realizando a integral da área hachurada em azul, obteve-se a densidade superficial de moléculas do sistema, sendo de $7,5 \times 10^{12}$ moléculas/cm². Este valor será importante na discussão da densidade de estados por molécula de ferroceno mais adiante.

Os diagramas de Nyquist dos espectros de impedância e capacitância estão apresentados nas Figura 30a e 30b, respectivamente. Os dados foram obtidos em intervalo de potencial DC entre 0,10 a 0,60V, mas foram graficados somente as curvas com potencial destacados na Figura 29: E_1 (0,10V) e E_2 (0,36V). Note que o potencial E_2 realçado na Figura 29 não é o mesmo daquele apresentado na Figura 24, contudo a nomenclatura é a mesma, pois possuem o mesmo significado. E_1 e E_2 representam, nesta ordem, o potencial fora e dentro da janela de potencial redox da espécie eletroativa (ferroceno imobilizado). Deve-se apenas ficar atento de qual espécie eletroativa está sendo analisada e quais são os valores de E_1 e E_2 correspondentes para não gerar confusão.

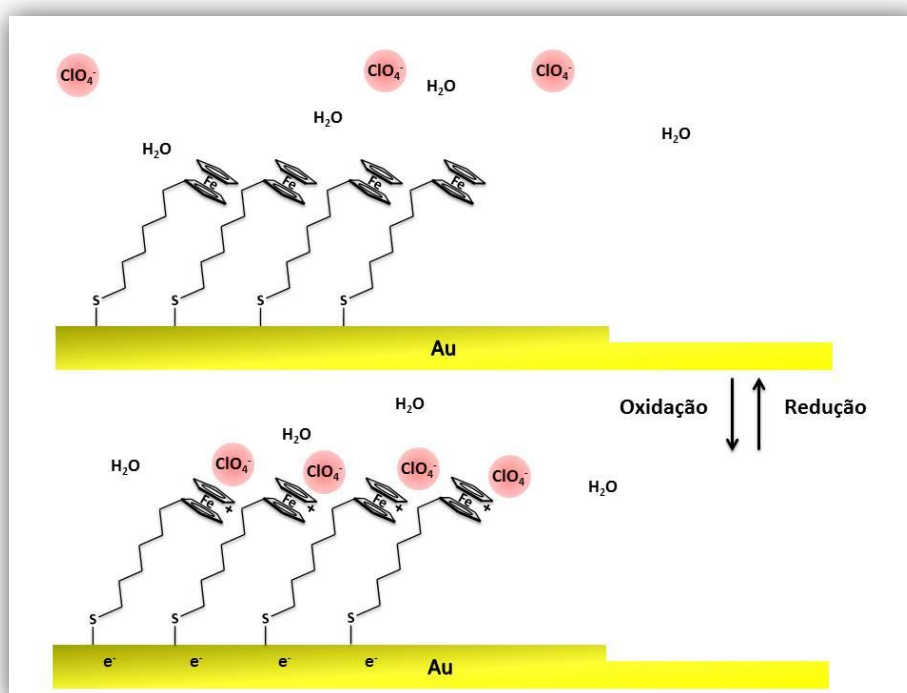
O espectro de impedância do TioI-Fc é apresentado na Figura 30a. Observou-se que a extrapolação das curvas de impedância para a região de baixa frequência de modo que o semicírculo se fecha e intercepta o eixo de impedância real podem apresentar uma ideia qualitativa dos valores de impedância. Por meio deste procedimento, tem-se que a impedância do eletrodo de ouro desnudo é inferior ao do sistema de TioI-Fc. Segundo a figura inserida (ampliação da região de alta frequência) na Figura 30a, a resposta impedimétrica deste sistema da região redox (medida em potencial E_2) é menor em relação a resposta da região capacitiva (medida em potencial E_1). Contudo, pelos espectros de impedância no Plano de Nyquist a diferença da resposta entre as regiões capacitiva e redox é pouco clara. Por outro lado, o efeito do potencial DC é mais perceptível nos espectros de capacitância complexa no diagrama de Nyquist, apresentados na Figura 30b. Notou-se que o semicírculo na região de alta frequência aumenta de modo acentuado ao se aproximar do valor de potencial de meia-onda ($E_2 = 0,36V$), indicando maior acúmulo de carga, conforme indica o aumento do platô da Figura 30c e também pela maior perda capacitiva (condução elétrica do sistema aumenta) segundo exibido na Figura 30d. A capacitância que surge de um processo redox é denominado de pseudocapacitância ou capacitância redox e este é o tipo de capacitância observado no sistema TioI-Fc.

Figura 30 - Espectros de (a) impedância e (b) capacitância complexas no plano de Nyquist e espectros de capacitância (c) real e (d) imaginária no plano de Bode do eletrodo de ouro limpo (Au) e eletrodos modificados com Tiol-Fc, ou simplesmente Fc, em solução aquosa de NaClO_4 0,5mol/L. Os dados foram obtidos em intervalo de frequência de 100kHz a 10mHz, potencial de oscilação de 10mV (rms), 12 pontos por década e tempo de espera de 300s. Os espectros de impedância e capacitância para o eletrodo de ouro limpo foram obtidos em 0,10V vs Ag|AgCl (E_1), fora da janela da reação redox do ferroceno, enquanto que os espectros do eletrodo modificado com Tiol-Fc foram obtidos também no potencial de meia onda de 0,36V vs Ag|AgCl (E_2). Os valores destacados para alguns pontos nos espectros de impedância e capacitância correspondem aos valores de frequência linear.



Em um sistema eletroquímico contendo uma monocamada com o grupo ferroceno ligado, como aquele em que a resposta voltamétrica foi exposta na Figura 29, ao ocorrer a oxidação do grupo ferroceno, a monocamada de Tiol-Fc fica carregada positivamente e os ânions ClO_4^- aproximam-se para formar um par iônico. Desta maneira, além da diminuição da impedância, a quantidade de carga próxima à superfície do eletrodo aumenta e, como consequência, a capacitância redox (pela oxidação do ferro) e não compensada (aumento de íons ClO_4^- próximos da monocamada) do sistema, conforme é ilustrado na Figura 31. O efeito da carga não compensada explica o leve aumento de capacitância sem o sistema estar na janela de potencial redox do grupo ferroceno no Tiol-Fc. Além disso, a sugestão da oxidação do grupo ferroceno é adequada para explicar o aumento de capacitância real juntamente com a capacitância imaginária (relacionada com fenômenos dissipativos como a condução elétrica) apresentados para o sistema em potencial DC igual a 0,36V.

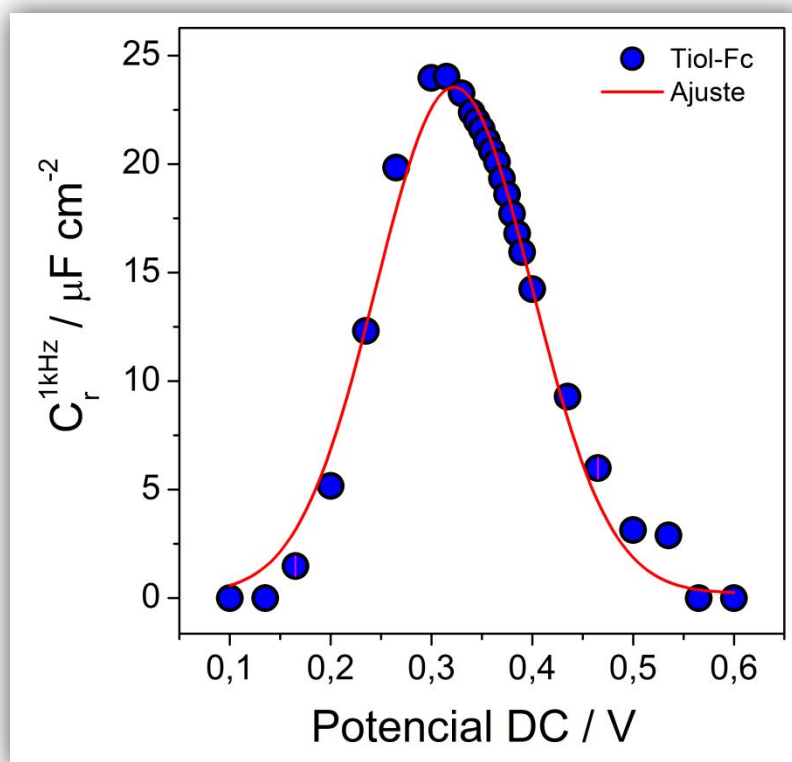
Figura 31 - Ilustração da oxidação do grupo ferroceno e a formação do par iônico na monocamada autoorganizada de 6-ferrocenil-hexano-1-tiol immobilizada em eletrodo de ouro.



Fonte: Adaptado de Rudnev, Yoshida e Wandlowski [129].

Conforme Bueno Mizzon e Davis [64], a partir dos resultados de capacitância redox (sendo igual a parte real da capacitância complexa na região redox subtraída da região capacitiva em frequência igual a 1kHz) em diferentes potenciais DC é possível obter o perfil da densidade de estados (DOS) acessíveis, sendo muito parecida àquela curva apresentada na Figura 14. Para o sistema Tiol-Fc este perfil está apresentado na Figura 32. A integração desta curva forneceu uma quantidade de densidade de estados de $2,9 \times 10^{13}$ estados/cm².

Figura 32 - Capacitância redox, obtida a 1kHz, em função do potencial DC para o sistema 6-ferrocenil-hexano-1-tiol em meio aquoso de NaClO₄. A área da curva Gaussiana foi usada para calcular a densidade de estados, sendo de $2,9 \times 10^{13}$ estados/cm². O ajuste da curva Gaussiana apresentou χ^2 igual a 0,99.

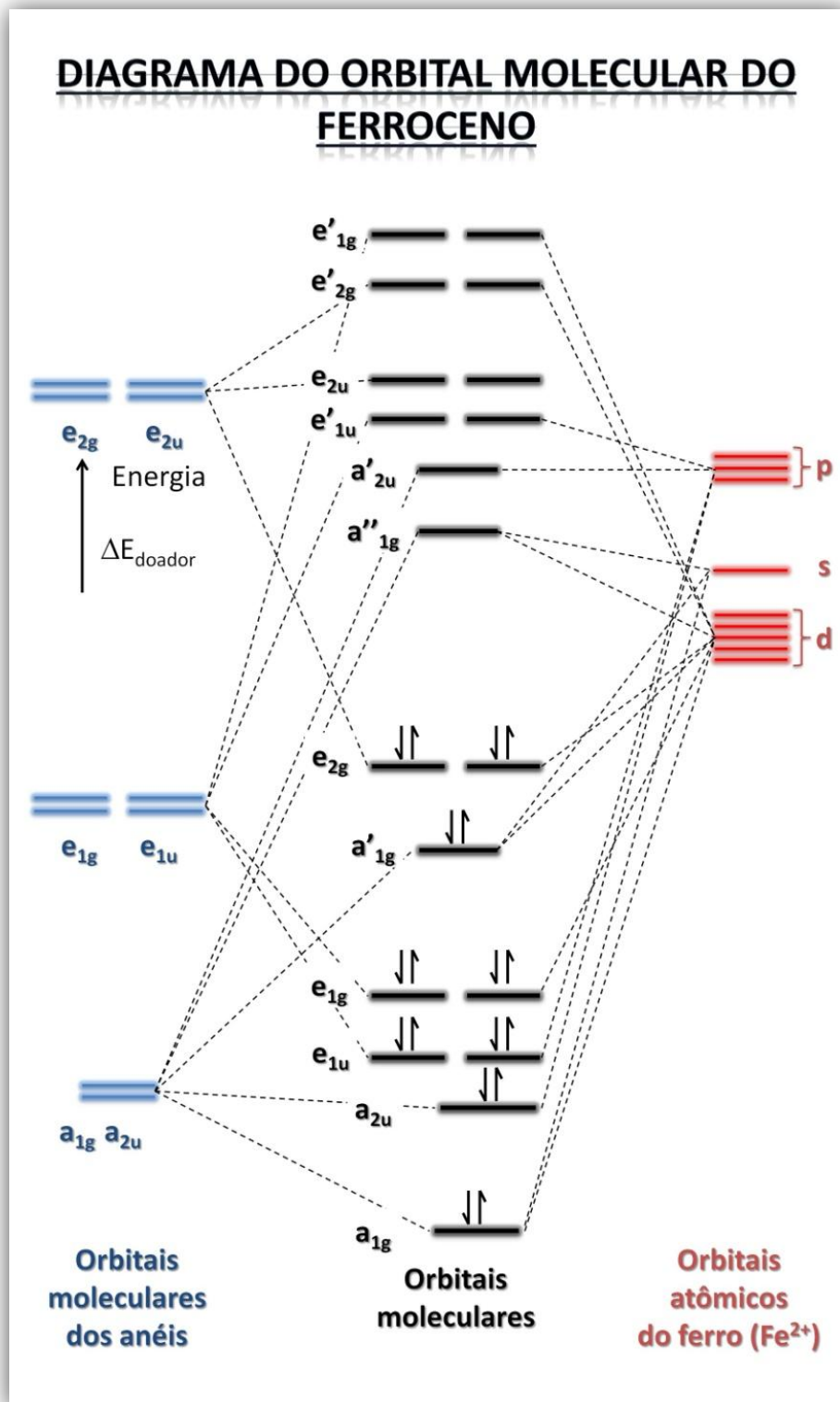


Fonte: autor.

Ao comparar a densidade de estados de energia, obtida da Figura 32, com a densidade de moléculas por unidade de área, calculada a partir da área hachurada da Figura 29, há uma razão de 4:1. Isto quer dizer que para cada molécula de ds-DNA com o grupo ferroceno existam 4 formas diferentes do elétron ocupar os orbitais moleculares do ferroceno.

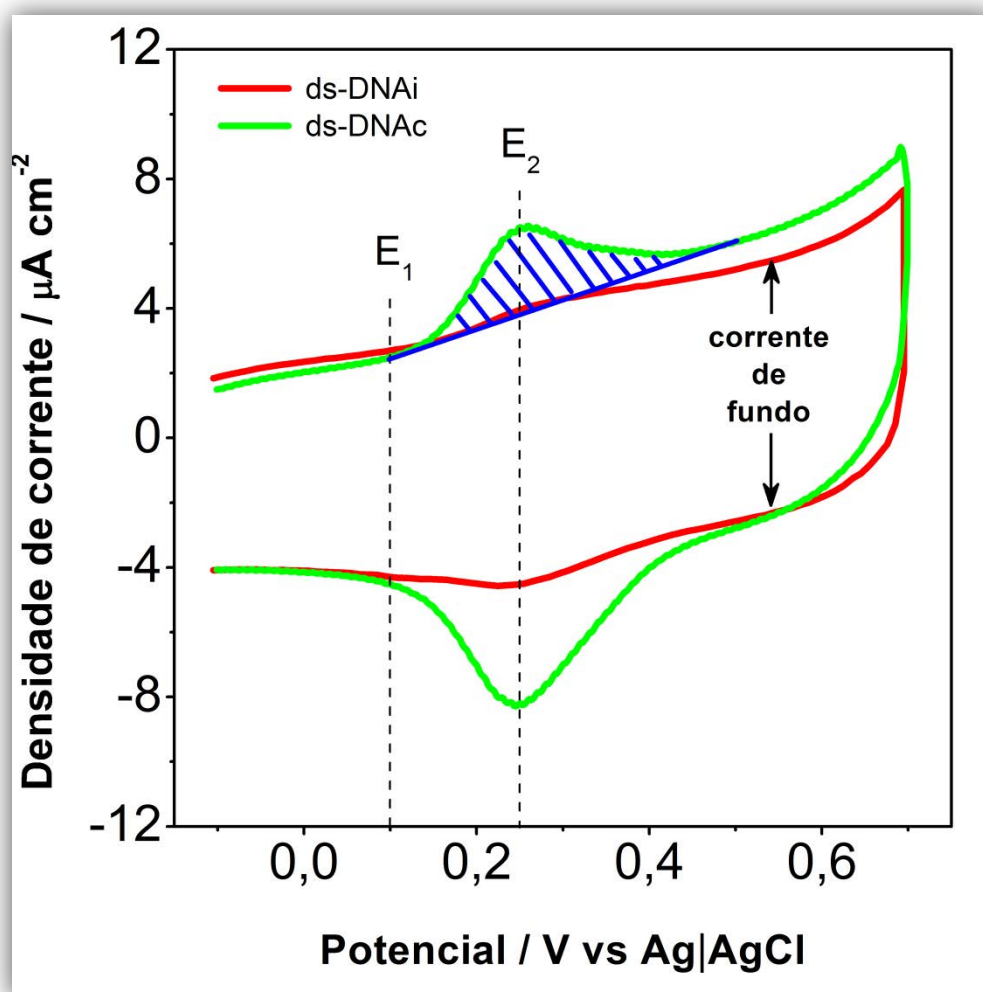
Para maior clareza foi feito uso do diagrama de orbital molecular do grupo ferroceno, que é ilustrado na Figura 33. Sugere-se aqui que, ao ser oxidado, a molécula de ferroceno perde um elétron localizado no orbital molecular e_{2g} , ficando com um elétron desemparelhado neste mesmo orbital molecular. Desta maneira, o elétron desemparelhado pode assumir duas configurações de momento de spin ($+1/2$ e $-1/2$). Além disso, a simbologia usada para descrever este orbital molecular indica que ele é duplamente degenerado, significando que existe 2 orbitais moleculares com a mesma energia. Portanto, existem duas configurações correspondente ao momento de spin do elétron e mais 2 provenientes da degenerescência do orbital molecular e_{2g} , totalizando 4 configurações possíveis em orbitais moleculares acessíveis com a oxidação do Fe^{2+} a Fe^{3+} . Isto poderia explicar a relação entre a área da curva da Figura 29 com a da Figura 32. Uma melhor compreensão e também sustentação desta tese levantada pode ser feita com a avaliação da configuração eletrônica da molécula, a qual não será aprofundada nesta tese de doutorado.

Figura 33 - Diagrama de orbital molecular do ferroceno com o ferro no estado de oxidação Fe^{2+} .



A caracterização do filme de DNA foi iniciada realizando voltamogramas cíclicos. A Figura 34 mostra o VC de ds-DNAC e ds-DNAi em que a curva ds-DNAC exibe um pico reversível ao redor de 0,25V vs Ag|AgCl (potencial E_2 destacado na Figura 34) descrito pela reação redox do grupo ferroceno. Segundo trabalhos publicados, o pico redox do ferroceno ligado ao DNA pode variar de aproximadamente 0,15V [72] a valores próximos de 0,5V [131] em relação ao eletrodo de referência Ag|AgCl. Com relação à diferença de potencial entre os picos anódicos e catódicos, o valor foi de somente 14mV. Os valores de pico e as curvas de voltametria não variaram com as replicatas. Estes fatos juntos indicam um sistema redox reversível. O voltamograma cíclico do ds-DNAi mostra um pico pouco perceptível, podendo se confundir uma resposta capacitiva do sistema apenas. Esta resposta pode ser denominada de corrente de fundo, proveniente de processos não faradaicos [45]. O valor da densidade de corrente de pico, seja ela anódica ou catódica, é proporcional a acessibilidade dos grupos ferroceno e, conseqüentemente, da resistência da molécula de DNA. Quanto menor a resistência, maior a acessibilidade. Da mesma maneira observada para o sistema Tiol-Fc, a oxidação do grupo ferroceno gera o acúmulo de cargas positivas, o que significa uma capacitância redox.

Figura 34 - Voltamogramas cíclicos do ds-DNAc e ds-DNAi em solução aquosa de 0,5mol/L de NaClO₄, realizadas entre -0,1 e +0,7V vs Ag|AgCl e em velocidade de varredura de 500mV/s. O ferroceno é reversivelmente oxidado quando uma varredura de potencial anódica é aplicada no caso do ds-DNAc e tal processo não ocorre com o ds-DNAi. Os potenciais E₁ e E₂ em destaque nas curvas representam os potenciais de circuito aberto e redox do ferroceno ligado ao DNA, respectivamente. Estes valores foram usados para realizar as medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica. A área hachurada é proporcional à densidade de carga fornecida para reduzir os grupos ferroceno oxidados e, conseqüentemente, o número de moléculas de DNA na superfície do eletrodo. De acordo com as áreas dos picos de oxidação, ds-DNAc e ds-DNAi possuem, respectivamente, 4,8 x 10¹² e 7,2 x 10¹¹ moléculas/cm².

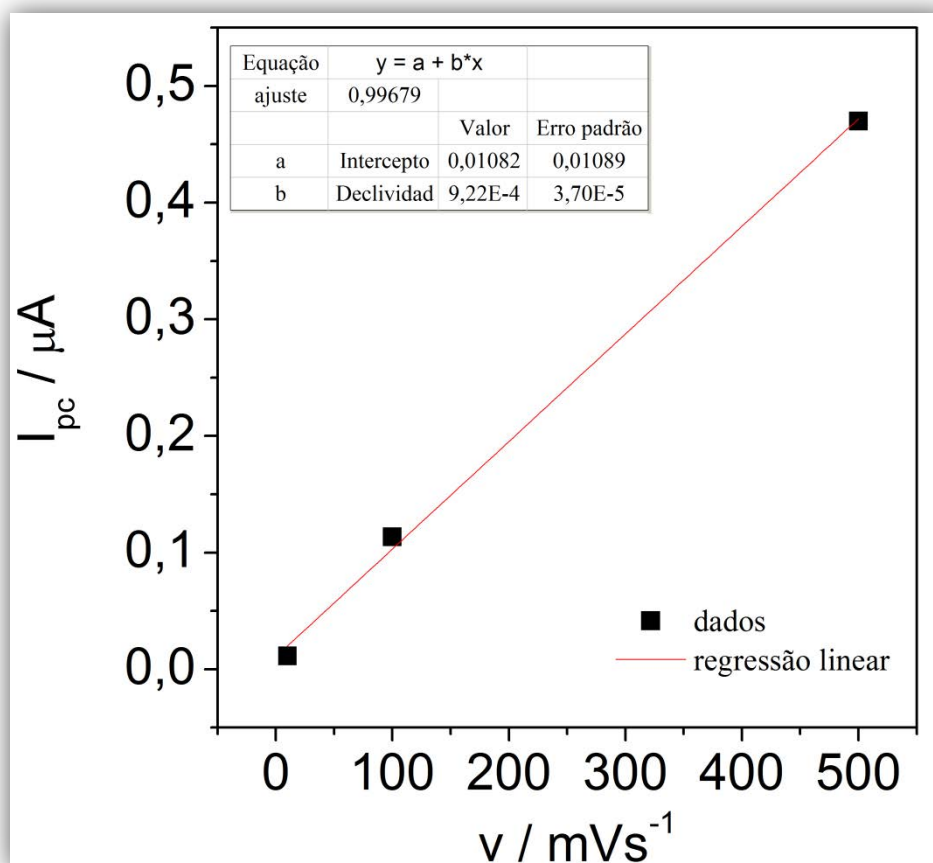


Fonte: autor.

Analisando a curva de variação corrente de pico catódico em função da velocidade de varredura da Figura 35, existe uma relação direta entre os parâmetros, indicando que o grupo ferroceno está ligado ao DNA por se tratar de uma transferência de carga controlada por adsorção. Caso o grupo ferroceno

estivesse em solução e houvesse a transferência de carga, o processo poderia ser controlado por difusão e a densidade de corrente iria variar com a raiz quadrada da velocidade de varredura.

Figura 35 - A curva de densidade de corrente do pico catódico do ds-DNAc em função da velocidade de varredura indica um processo de transferência de carga controlado por adsorção conforme indicado pela relação direta entre os parâmetros.



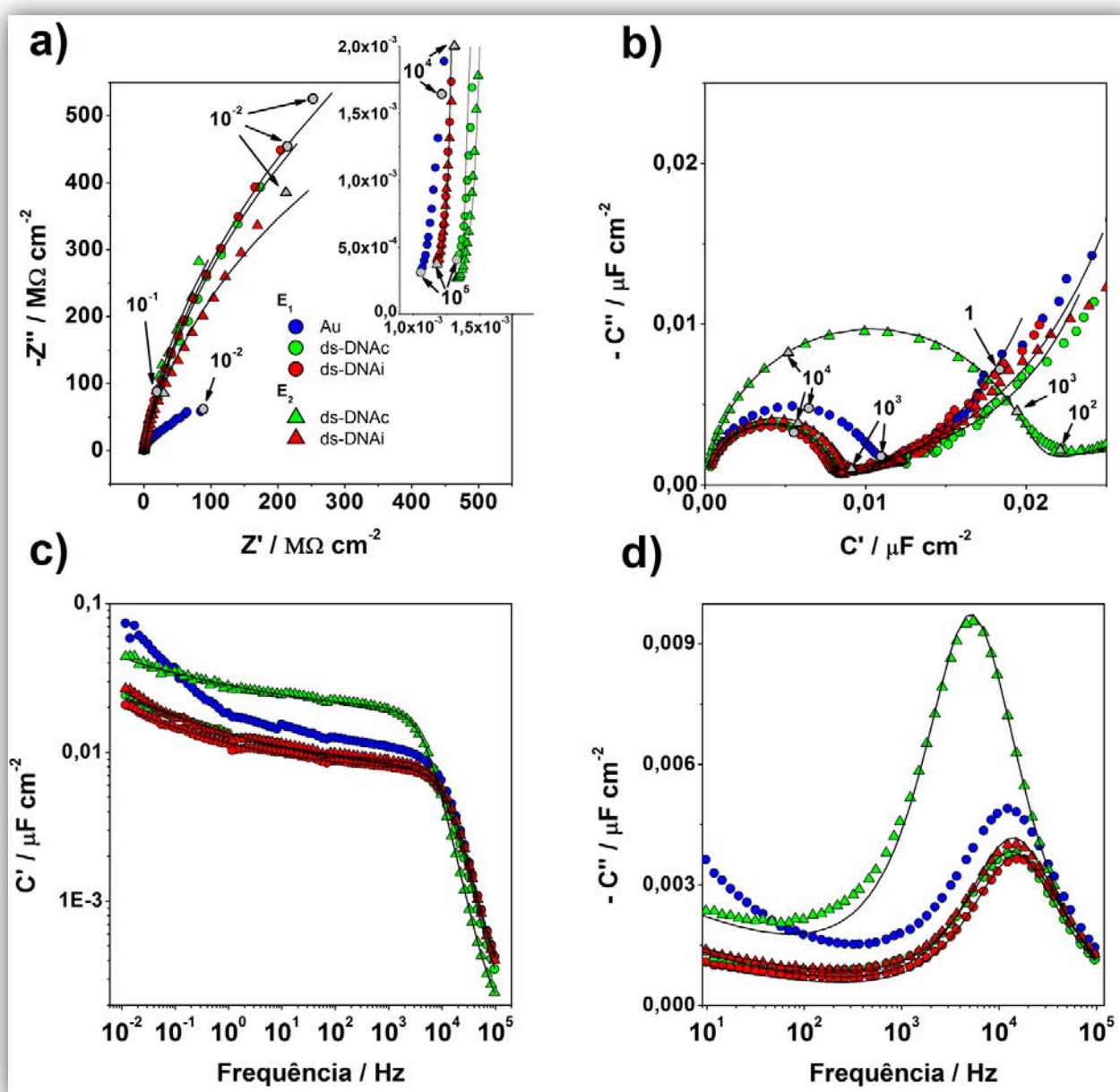
Fonte: autor.

De acordo com os voltamogramas da Figura 34, a resistência do ds-DNAc é menor do que a do ds-DNAi e, portanto, se esperaria o mesmo comportamento para as medidas de impedância cujo potencial foi próximo ou igual a E_2 (0,25V). Os diagramas de Nyquist dos espectros de impedância e capacitância são apresentados nas Figura 36a e 36b, respectivamente. Os dados foram obtidos nos potenciais destacados na Figura 34: E_1 (0,10V) e E_2 (0,25V). Os potenciais E_1 e E_2 possuem o mesmo significado descrito anteriormente. Eles representam o potencial fora e dentro da janela de potencial redox da espécie eletroativa. Doravante irá se

tratar apenas das medidas do DNA com ferroceno. Qualquer medida que não se trate do DNA modificado com ferroceno será assinalada para que não haja confusão.

Realizando a extrapolação das curvas de impedância na Figura 36a, tem-se que a impedância referente à resposta do eletrodo de ouro desnudo é menor do que a do ds-DNA imobilizado, evidenciando o bloqueio da superfície do eletrodo com a biomolécula. Depois de confirmada a presença do DNA na superfície, verificou-se o efeito da mudança do potencial. Como resultado, não existiu uma clara diferença entre as curvas de impedância entre ds-DNA_c e ds-DNA_i. Conforme comentado, na região redox o grupo ferroceno é oxidado e a capacitância redox surge. Analisando o espectro de capacitância na Figura 36b foi observado que o ds-DNA_i responde praticamente do mesmo modo tanto na região capacitiva (potencial E_1) quanto na região redox (potencial E_2). Entretanto, para o ds-DNA_c, a resposta na região redox é 2,5 vezes superior à resposta na região capacitiva. Este resultado sustenta a análise feita nos voltamogramas da Figura 34 e corrobora a menor resistência do ds-DNA_c. O aumento no valor do patamar em C' vs f da resposta de ds-DNA_c na região redox confirma o aumento de capacitância. Associada à capacitância existe a diminuição de resistência (maior energia dissipada, o que significa maior condução elétrica), segundo o aumento do valor de pico na região redox em C'' vs f do ds-DNA_c.

Figura 36 - Espectros de (a) impedância e (b) capacitância complexas no plano de Nyquist e espectros de capacitância (c) real e (d) imaginária no plano de Bode do eletrodo de ouro limpo (Au) e eletrodos modificados com ds-DNAi e ds-DNAc em solução aquosa de NaClO_4 0,5mol/L. Os dados foram obtidos em intervalo de frequência de 100kHz a 10mHz, potencial de oscilação de 10mV (rms), 12 pontos por década e tempo de espera de 300s. Os espectros de impedância e capacitância para o eletrodo de ouro limpo foram obtidos apenas em 0,10V vs Ag|AgCl (E_1), fora da janela da reação redox do ferroceno, enquanto que os espectros do eletrodo modificado com ds-DNAi ou ds-DNAc foram obtidos também no potencial de meia onda de 0,25V vs Ag|AgCl (E_2). Os valores destacados para alguns pontos nos espectros de impedância e capacitância correspondem aos valores de frequência linear e as linhas são os ajustes das curvas realizadas pelo programa Zview.

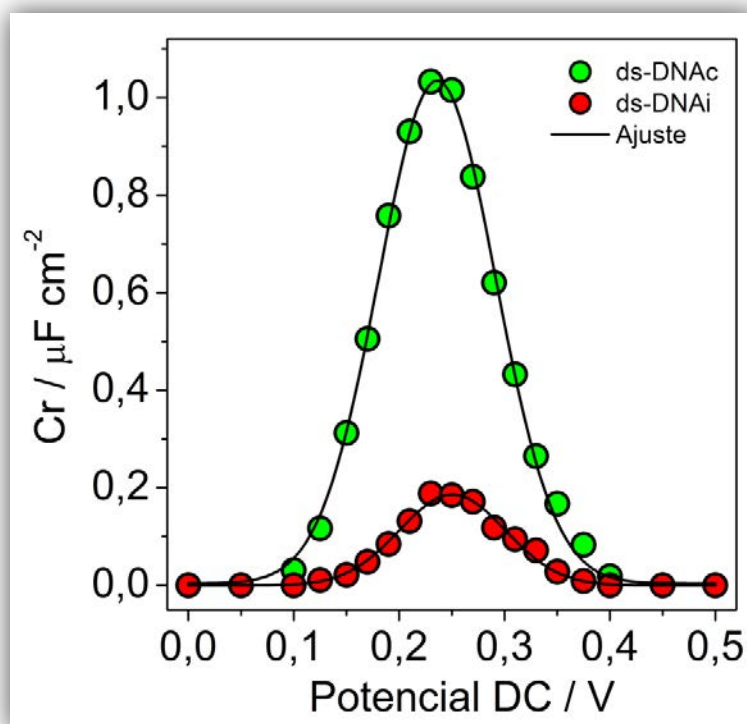


Fonte: autor.

Os espectros de impedância e capacitância foram ajustados utilizando o circuito elétrico equivalente descrito na referência [132] e variações. Todavia, os resultados não foram conclusivos e por tal motivo não estão apresentados nesta Tese.

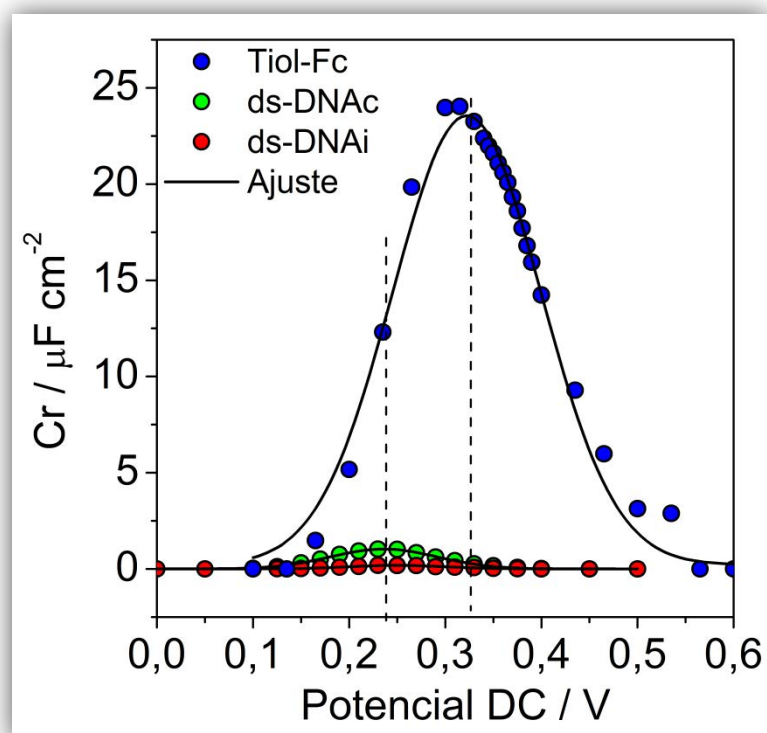
Os perfis de densidade de estados para o ds-DNAc e ds-DNAi estão apresentados Figura 37. A densidade eletrônica por área pode ser obtida pela integração do pico de capacitância redox em função do sobrepotencial aplicado ao eletrodo [64] e obtiveram-se os valores de densidade de estados/cm² de $2,0 \times 10^{12}$ e $3,4 \times 10^{11}$ para ds-DNAc e ds-DNAi, respectivamente.

Figura 37 - Capacitância redox em função do potencial DC. O valor de C_r (refletindo o DOS da molécula de ferroceno ancorado ao DNA) foi calculado seguindo os procedimentos previamente descritos [64, 132] e a área da curva Gaussiana foi usada para obter a densidade de estados. Para melhor resolução os dados foram corrigidos considerando os termos parasíticos não faradaicos [64, 128, 132]. Os ajustes das curvas Gaussianas para estes dados são bons ($\chi^2 = 0,99$). A maior área da Gaussiana para ds-DNAc em comparação ao ds-DNAi é reflexo de elevada transmitância eletrônica e maior quantidade de DOS ocupados.



De acordo com a discussão a respeito da transferência de carga em filmes finos e espessos, exposta na Figura 7, e dos valores de comprimento de cada molécula presente no sistema, descritos na Figura 28, a monocamada de ds-DNA possui uma transferência eletrônica indireta e o processo depende dos níveis de energia da molécula. Para confirmar de maneira qualitativa a transferência eletrônica indireta do ds-DNA, os perfis de densidade de estados da Figura 32 e 37 estão reunidas na Figura 38. A grande similaridade entre os perfis de corrente da Figura 9 e de capacitância real do 6-ferrocenil-hexano-1-tiol e dos ds-DNAs, mostrada na Figura 38, evidenciam o processo de transferência eletrônica indireto.

Figura 38 - Comparação dos perfis de capacitância redox (Tiol-Fc e ds-DNAs) em função do potencial DC.



Fonte: autor.

6 CONCLUSÃO

A investigação da condução elétrica de fitas duplas e curtas (20 pares de base) de DNA (ds-DNA) imobilizadas em eletrodos de ouro e caracterizadas por medidas eletroquímicas, principalmente por espectroscopia de impedância eletroquímica, foram feitas de duas maneiras. A primeira pelo uso do azul de metileno (MB), uma espécie eletroativa intercalante, e a segunda pela modificação do ds-DNA por um grupo ferroceno, que possui propriedades redox. O objetivo foi diferenciar ds-DNAs com conteúdo distinto de bases nitrogenadas: uma rica em guanina e citosina e outra em adenina e timina, denominadas de DNA condutor (ds-DNAc) e DNA isolante (ds-DNAi), respectivamente

Na primeira metodologia, a transferência eletrônica do MB para o ds-DNA ocorrendo simultaneamente ao processo redox do MB com a superfície do eletrodo inviabilizou a análise por esta metodologia. Portanto, a metodologia em que se usou MB não foi adequada para averiguar a condução elétrica de moléculas de fita dupla de DNA imobilizadas em eletrodos metálicos. Deste modo, a modificação do DNA com uma molécula redox foi necessária, pois ancorar as moléculas diretamente à fita dupla de DNA evitaria a reação em paralelo.

Realizando a modificação com um grupo ferroceno foi possível diferenciar os sistemas de ds-DNA imobilizado em eletrodo de ouro. A resistência elétrica da molécula de DNA está relacionada com a acessibilidade do grupo ferroceno, sendo possível obter maior capacitância devido ao processo redox do ferroceno quanto menor a resistência do ds-DNA. Identificou-se que o ds-DNAc, oligonucleotídeo rico em CG, possui menor resistência elétrica e os espectros de capacitância mostram claramente a diferença de condução elétrica entre os ds-DNAs imobilizados. A comparação dos perfis de densidade de estados confirmam uma transferência eletrônica indireta para os ds-DNAs.

Foi levantada uma hipótese sobre a razão entre densidade de estados e a densidade de moléculas com o diagrama de orbital molecular do ferroceno, grupo redox usado na modificação do ds-DNA.

REFERÊNCIAS

- 1 NASCIMENTO, F. A. M. **As primeiras máquinas**. Disponível em: <http://www.assis.pro.br/public_html/hcomp/PrimeirasMaquinas.html>. Acesso em: 21 ago. 2014.
- 2 GONÇALVES, J. **ENIAC - o primeiro computador**. 2010. Disponível em: <<http://www.neuronio20.com/2010/10/eniac-o-primeiro-computador.html>>. Acesso em: 27 jun. 2014.
- 3 HISTÓRIA do primeiro computador. Foto 1, eniac1. Disponível em: <<https://sites.google.com/site/historiasobreossitesdebusca/Historia-da-tecnologia/historia-do-primeiro-computador>>. Acesso em: 21 ago. 2014.
- 4 ROSE, B. **Samsung Galaxy Gear: um smartwatch que dói no pulso**. 2013. Disponível em: <<http://gizmodo.uol.com.br/review-samsung-galaxy-gear/>>. Acesso em: 20 ago. 2014.
- 5 WOHLGAMUTH, C. H.; McWILLIAMS, M. A.; SLINKER, J. D. DNA as a molecular wire: distance and sequence dependence. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 18, p. 8634-8640, 2013.
- 6 GAMA, A. A. S. Condutância molecular e biomolecular. **Química Nova**, v. 23, n. 3, p. 380-383, 2000.
- 7 MIHAILOVIC, D. Inorganic molecular wires: physical and functional properties of transition metal chalcogenide polymers. **Progress in Materials Science**, v. 54, n. 3, p. 309-350, 2009.
- 8 MORARI, C. et al. Electronic transport properties of 1,1'-ferrocene dicarboxylic acid linked to Al(111) electrodes. **ACS Nano**, v. 3, n. 12, p. 4137-4143, 2009.
- 9 LÖRTSCHER, E. et al. Bonding and electronic transport properties of fullerene and fullerene derivatives in break-junction geometries. **Small**, v. 9, n. 2, p. 209-214, 2013.
- 10 MoSI molecular wires. Disponível em: <<http://f7-2.ijs.si/Home.html>>. Acesso em: 27 jun. 2014.
- 11 ROBERTSON, N.; MCGOWAN, C. A. A comparison of potential molecular wires as components for molecular electronics. **Chemical Society Reviews**, v. 32, n. 2, p. 96-103, 2003.
- 12 NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1202 p.
- 13 GRABOWSKA, I. et al. A highly sensitive electrochemical genosensor based on Co-porphyrin-labelled DNA. **Chemical Communications**, v. 50, n. 32, p. 4196-4199, 2014.

14 LUO, L. Q. et al. Label-free electrochemical impedance genosensor based on 1-aminopyrene/graphene hybrids. **Nanoscale**, v. 5, n. 13, p. 5833-5840, 2013.

15 ZHANG, Y. et al. Insulating behavior of λ -DNA on the micron scale. **Physical Review Letters**, v. 89, n. 19, p. 198102/1-198102/4, 2002.

16 STORM, A. J. et al. Insulating behavior for DNA molecules between nanoelectrodes at the 100 nm length scale. **Applied Physics Letters**, v. 79, n. 23, p. 3881-3883, 2001.

17 PABLO, P. J. et al. Absence of dc-conductivity in λ -DNA. **Physical Review Letters**, v. 85, n. 23, p. 4992-4995, 2000.

18 BRAUN, E. et al. DNA-templated assembly and electrode attachment of a conducting silver wire. **Nature**, v. 391, n. 19, p. 775-778, 1998.

19 CAI, L.; TABATA, H.; KAWAI, T. Self-assembled DNA networks and their electrical conductivity. **Applied Physics Letters**, v. 77, n. 19, p. 3105-3106, 2000.

20 PORATH, D. et al. Direct measurement of electrical transport through DNA molecules. **Nature**, v. 403, n. 10, p. 635-638, 2000.

21 KELLEY, S. O. et al. Long-range electron transfer through DNA films. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 38, n. 7, p. 941-945, 1999.

22 FINK, H. W.; SCHÖNENBERGER, C. Electrical conduction through DNA molecules. **Nature**, v. 398, n. 1, p. 407-410, 1999.

23 OKAHATA, Y. et al. Anisotropic electric conductivity in an aligned DNA cast film. **Journal of American Chemical Society**, v. 120, n. 24, p. 6165-6166, 1998.

24 KASUMOV, A. Y. et al. Proximity-induced superconductivity in DNA. **Science**, v. 291, n. 5502, p. 280-282, 2001.

25 WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. **Nature**, v. 171, n. 4356, p. 737-738, 1953.

26 BOON, E. M. **Electrochemical sensors based on DNA-mediated charge transport chemistry**. 2002. 282 f. Thesis (Doctor of Philosophy in Chemistry) - Division of Chemistry and Chemical Engineering, California Institute of Technology, Pasadena, 2002.

27 BIOLOGY EXAMS 4 U. **Different forms of DNA**. Disponível em: <http://www.biologyexams4u.com/2012/11/different-forms-of-dna.html#.U6257_15OQY>. Acesso em: 27 jun. 2014.

28 ATDBio. **Purification of oligonucleotides**. Disponível em: <<http://www.atdbio.com/content/7/Purification-of-oligonucleotides>>. Acesso em: 27 jun. 2014.

- 29 ROCHE, S. Sequence dependent DNA-mediated conduction. **Physical Review Letters**, v. 91, n. 10, p. 108101/1-108101/4, 2003.
- 30 NOGUES, C. et al. Sequence dependence of charge transport properties of DNA. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 18, p. 8910-8913, 2006.
- 31 RUI-XIN, D.; XUN-LING, Y.; BING, Y. Effects of sequence on transmission properties of DNA molecules. **Communications in Theoretical Physics**, v. 50, n. 2, p. 532-536, 2008.
- 32 RATNER, M. Photochemistry: electronic motion in DNA. **Nature**, v. 397, n. 6719, p. 480-481, 1999.
- 33 MUREN, N. B.; OLMON, E. D.; BARTON, J. K. Solution, surface, and single molecule platforms for the study of DNA-mediated charge transport. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 14, n. 40, p. 13754-13771, 2012.
- 34 BAKHSHI, A. K. et al. On the electronic structure and conduction properties of aperiodic DNA and proteins. II. Electronic structure of aperiodic DNA. **Chemical Physics**, v. 108, n. 2, p. 215-222, 1986.
- 35 SONG, J. et al. Density of states of DNA molecules with varied itinerant electrons. **Synthetic Metals**, v. 155, n. 3, p. 607-610, 2005.
- 36 KLEINE-OSTMANN, T. et al. Conductivity of single-stranded and double-stranded deoxyribose nucleic acid under ambient conditions: the dominance of water. **Applied Physics Letters**, v. 88, p. 102101/1-102102/3, 2006.
- 37 ZHANG, L.; WANG, P. Y. Effect of electron correlation and solvent on the conformational transition of DNA. **Modern Physics Letters B**, v. 23, n. 15, p. 1861-1870, 2009.
- 38 MEGGERS, E.; MICHEL-BEYERLE, M. E.; GIESE, B. Sequence dependent long range hole transport in DNA. **Journal of the American Chemical Society**, v. 120, n. 49, p. 12950-12955, 1998.
- 39 XU, B. et al. Direct conductance measurement of single DNA molecules in aqueous solution. **Nano Letters**, v. 4, n. 6, p. 1105-1108, 2004.
- 40 MAHAPATRO, A. K. et al. Sequence specific electronic conduction through polyion-stabilized double-stranded DNA in nanoscale break junctions. **Nanotechnology**, v. 18, n. 19, p. 195202/1-195202/6, 2007.
- 41 YOO, K. H. et al. Electrical conduction through poly(dA)-poly(dT) and poly(dG)-poly(dC) DNA molecules. **Physical Review Letters**, v. 87, n. 19, p. 198102/1-198102/4, 2001.

- 42 CAI, L. T.; TABATA, H.; KAWAI, T. Self-assembled DNA networks and their electrical conductivity. **Applied Physics Letters**, v. 77, n. 19, p. 3105-3106, 2000.
- 43 XIE, P. et al. Electronic states of mixed base pairs systems of DNA and the effect of base composition and sequences on the band structures using screw axis translational symmetry. **International Journal of Quantum Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 489-496, 2013.
- 44 GORODETSKY, A. A.; BUZZEO, M. C.; BARTON, J. K. DNA-mediated electrochemistry. **Bioconjugate Chemistry**, v. 19, n. 12, p. 2285-2296, 2008.
- 45 BUENO, P. R.; DAVIS, J. J. Elucidating redox-level dispersion and local dielectric effects within electroactive molecular films. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 4, p. 1997-2004, 2014.
- 46 WAGENKNECHT, H. A. **Charge transfer in DNA: from mechanism to application**. Weinheim: Wiley-VCH, 2005. 229 p.
- 47 BIXON, M. et al. Long-range charge hopping in DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 21, p. 11713-11716, 1999.
- 48 MURPHY, C. J. et al. Long-range photoinduced electron transfer through a DNA helix. **Science**, v. 262, n. 5136, p. 1025-1029, 1993.
- 49 KELLEY, S. O.; BARTON, J. K. DNA-mediated electron transfer from a modified base to ethidium: π -stacking as a modulator of reactivity. **Chemistry & Biology**, v. 5, n. 8, p. 413-425, 1998.
- 50 ARKIN, M. R. et al. Long-range oxidation of guanine by Ru(III) in duplex DNA. **Chemistry & Biology**, v. 4, n. 5, p. 389-400, 1997.
- 51 NÚÑEZ, M. E.; HALL, D. B.; BARTON, J. K. Long-range oxidative damage to DNA: effects of distance and sequence. **Chemistry & Biology**, v. 6, n. 2, p. 85-97, 1999.
- 52 KENDRICK, T.; GIESE, B. Charge transfer through DNA triggered by site selective charge injection into adenine. **Chemical Communications**, n. 18, p. 2016-2017, 2002.
- 53 GIESE, B. et al. Direct observation of hole transfer through DNA by hopping between adenine bases and by tunnelling. **Nature**, v. 412, n. 6844, p. 318-320, 2001.
- 54 SEIDEL, C. A. M.; SCHULZ, A.; SAUER, M. H. M. Nucleobase-specific quenching of fluorescent dyes. 1. Nucleobase one-electron redox potentials and their correlation with static and dynamic quenching efficiencies. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 100, n. 13, p. 5541-5553, 1996.

55 TANI, A.; THOMSON, A. J.; BUTT, J. N. Methylene blue as an electrochemical discriminator of single- and double-stranded oligonucleotides immobilised on gold substrates. **Analyst**, v. 126, n. 10, p. 1756-1759, 2001.

56 KELLEY, S. O.; BOON, E. M.; BARTON, J. K. Single-base mismatch detection based on charge transduction through DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 24, p. 4830-4837, 1999.

57 RICCI, F.; LAI, R. Y.; PLAXCO, K. W. Linear, redox modified DNA probes as electrochemical DNA sensors. **Chemical Communications**, n. 36, p. 3768-3770, 2007.

58 PHEENEY, C. G.; BARTON, J. K. DNA electrochemistry with tethered methylene blue. **Langmuir**, v. 28, n. 17, p. 7063-7070, 2012.

59 BARTON, J. K. Metals and DNA: molecular left-handed complements. **Science**, v. 233, n. 4765, p. 727-734, 1986.

60 FRIEDMAN, A. E. et al. Molecular "light switch" for DNA: Ru(bpy)₂(dppz)²⁺. **Journal of American Chemical Society**, v. 112, n. 12, p. 4960-4962, 1990.

61 TOSHIBA CORPORATION. **Features of Toshiba's technology**. Disponível em: <<http://www3.toshiba.co.jp/ddc/eng/dnachip/index.htm>>. Acesso em: 18 jul. 2014.

62 KAFKA, J. et al. A label-free DNA sensor based on impedance spectroscopy. **Electrochimica Acta**, v. 53, n. 25, p. 7467-7474, 2008.

63 SATO, N. **Electrochemistry at metal and semiconductor electrodes**. Amsterdam: Elsevier Science, 1998. 400 p.

64 BUENO, P. R.; MIZZON, G.; DAVIS, J. J. Capacitance spectroscopy: a versatile approach to resolving the redox density of states and kinetics in redox-active self-assembled monolayers. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 116, n. 30, p. 8822-8829, 2012.

65 VOITYUK, A. A. Quantum chemical modeling of charge transfer in DNA. In: STARIKOV, E. B.; LEWIS, J. P.; TANAKA, S. (Ed.). **Modern methods for theoretical physical chemistry of biopolymers**. Amsterdam: Elsevier Science, 2006. Chap. 5, p. 99-119.

66 VENKATRAMANI, R. et al. Nucleic acid charge transfer: black, white and gray. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 255, n. 7/8, p. 635-648, 2011.

67 BIXON, M. et al. Long-range charge hopping in DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 21, p. 11713-11716, 1999.

68 IHARA, T. et al. Ferrocene-oligonucleotide conjugates for electrochemical probing of DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 24, n. 21, p. 4273-4280, 1996.

- 69 NAVARRO, A. E. et al. Supported synthesis of ferrocene modified oligonucleotides as new electroactive DNA probes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, n. 10, p. 2439-2441, 2004.
- 70 MEARNS, F. J. et al. DNA biosensor concepts based on a change in the DNA persistence length upon hybridization. **Electroanalysis**, v. 18, n. 19-20, p. 1971-1981, 2006.
- 71 RAI, V. et al. Electrochemically amplified molecular beacon biosensor for ultrasensitive DNA sequence-specific detection of Legionella sp. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 32, n. 1, p. 133-140, 2012.
- 72 ANNE, A.; BOUCHARDON, A.; MOIROUX, J. 3'-ferrocene-labeled oligonucleotide chains end-tethered to gold electrode surfaces: novel model systems for exploring flexibility of short DNA using cyclic voltammetry. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 5, p. 1112-1113, 2003.
- 73 CHIDSEY, C. E. D. Free energy and temperature dependence of electron transfer at the metal-electrolyte interface. **Science**, v. 251, n. 4996, p. 919-922, 1991.
- 74 LIU, T.; BARTON, J. K. DNA electrochemistry through the base pairs not the sugar-phosphate backbone. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 29, p. 10160-10161, 2005.
- 75 PÄNKE, O.; KIRBS, A.; LISDAT, F. Voltammetric detection of single base-pair mismatches and quantification of label-free target ssDNA using a competitive binding assay. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, n. 11, p. 2656-2662, 2007.
- 76 FREIRE, R. S.; PESSOA, C. A.; KUBOTA, L. T. Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 381-389, 2003.
- 77 GORODETSKY, A. A. et al. Coupling into the base pair stack is necessary for DNA-mediated electrochemistry. **Bioconjugate Chemistry**, v. 18, n. 5, p. 1434-1441, 2007.
- 78 YAVETZ, I. **From obscurity to enigma: the work of Oliver Heaviside, 1872-1891**. Berlin: Birkhäuser Verlag, 1995. 334 p.
- 79 ORAZEM, M. E. et al. Development of physico-chemical models for electrochemical impedance spectroscopy. **Electrochimica Acta**, v. 38, n. 14, p. 1903-1911, 1993.
- 80 BARSOUKOV, E.; MacDONALD, J. R. **Impedance spectroscopy theory, experiment, and applications**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2005. 616 p.

- 81 ORLANDI, M. O. **Caracterização de sistemas varistores a base de SnO₂**. 2002. 107 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) - Departamento de Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2002.
- 82 KINGERY, W. D. **Introduction to ceramics**. New York: John Wiley & Sons, 1976. 1032 p.
- 83 RIBEIRO, W. C. **Estudo da correlação entre propriedades não-ôhmicas, processos de relaxação dielétrica e microestrutura de cerâmicas policristalinas do tipo (Ca_{1/4}Cu_{3/4})TiO₃**. 2010. 103 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.
- 84 SANTOS, A. et al. Impedance-derived electrochemical capacitance spectroscopy for the evaluation of lectin–glycoprotein binding affinity. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 62, p. 102-105, 2014.
- 85 BUENO, P. R. et al. Dielectric spectroscopy analysis of CaCu₃Ti₄O₁₂ polycrystalline systems. **Applied Physics Letters**, v. 89, n. 19, p. 1117-1119, 2006.
- 86 CONSTRUCTION of the capacitor. Disponível em: <<http://pixgood.com/capacitor-diagram.html>>. Acesso em: 17 mai. 2014.
- 87 GARRAFA de Leyden - construa um capacitor experimental. **Mecatrônica Atual**, n. 23, 2005. Figura 4. Disponível em: <<http://www.mecatronicaatual.com.br/educacao/1781-garrafa-de-leyden-construa-um-capacitor-experimental>>. Acesso em: 17 mai. 2014.
- 88 BAGOTZKY, V. S. **Fundamentals of electrochemistry**. New York: Plenum Press, 1993. 589 p.
- 89 BOCKRIS, J. O. M.; REDDY, A. K. N.; GAMBOA-ALDECO, M. E. **Modern electrochemistry 2A: fundamentals of electrochemistry**. New York: Kluwer Academic, 2002. 2053 p.
- 90 ZHANG, Y. Q. et al. Synthesis of porous Co₃O₄ nanoflake array and its temperature behavior as pseudo-capacitor electrode. **Journal of Power Sources**, v. 256, p. 200-205, 2014.
- 91 KHAIRY, M.; EL-SAFETY, S. A. Nanosized rambutan-like nickel oxides as electrochemical sensor and pseudocapacitor. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 193, p. 644-652, 2014.
- 92 PARK, H.-S. et al. Kinetically enhanced pseudocapacitance of conducting polymer doped with reduced graphene oxide through a miscible electron transfer interface. **Nano Energy**, v. 3, p. 1-9, 2014.

- 93 KURZWEIL, P. Capacitors: electrochemical polymer capacitors. In: GARCHE, J. (Ed.). **Encyclopedia of electrochemical power sources**. Amsterdam: Elsevier, 2009. p. 679-684.
- 94 KIM, E. et al. Redox-capacitor to connect electrochemistry to redox-biology. **Analyst**, v. 139, n. 1, p. 32-43, 2014.
- 95 KIM, E. [Redox-biology]. In: THE MARYLAND BIOCHIP COLLABORATIVE. **The Payne group**. Disponível em: <<http://biochip.umd.edu/payne/index.html>>. Acesso em: 17 mai. 2014.
- 96 LEHR, J. et al. Label-free capacitive diagnostics: exploiting local redox probe state occupancy. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 5, p. 2559-2564, 2014.
- 97 FERNANDES, F. C. B. et al. Label free redox capacitive biosensing. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 50, p. 437-440, 2013.
- 98 FERNANDES, F. C. B. et al. Comparing label free electrochemical impedimetric and capacitive biosensing architectures. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 57, p. 96-102, 2014.
- 99 TAGLIAZUCCHI, M.; CALVO, E. J.; SZLEIFER, I. A molecular theory of chemically modified electrodes with self-assembled redox polyelectrolyte thin films: Reversible cyclic voltammetry. **Electrochimica Acta**, v. 53, n. 23, p. 6740-6752, 2008.
- 100 LURYI, S. Quantum capacitance devices. **Applied Physics Letters**, v. 52, n. 6, p. 501-503, 1988.
- 101 BERTEMES FILHO, P.; STIZ, R. A. Sistema de compensação da capacitância parasita para tomografia de impedância elétrica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA, 21., 2008, Salvador. **Anais...**[S.l.: s.n.], 2008. Disponível em: <http://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0CB8QFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Fprofile%2FPedro_Bertemes-Filho%2Fpublication%2F236660370_SISTEMA_DE_COMPENSAO_DA_CAPACITANCIA_PARASITA_PARA_TOMOGRAFIA_DE_IMPEDANCIA_ELTRICA%2Flinks%2F0c960518c0b8528758000000&ei=BogEVPOrF5eTgwTz-4DoBA&usg=AFQjCNEarYP5u3R8tY5qulxPKjxTDR3edQ&sig2=ex0EM4Rk7TW2J2DBj5SS3A&bvm=bv.74115972,d.eXY>. Acesso em: 01 set. 2014.
- 102 BUENO, P. R.; DAVIS, J. J. Measuring quantum capacitance in energetically addressable molecular layers. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 3, p. 1337-1341, 2014.
- 103 BUTTIKER, M.; THOMAS, H.; PRÊTRE, A. Mesoscopic capacitors. **Physics Letters A**, v. 180, n. 4/5, p. 364-369, 1993.

- 104 LANDAUER, R. Spatial variation of currents and fields due to localized scatterers in metallic conduction. **IBM Journal of Research and Development**, v. 1, n. 3, p. 223-231, 1957.
- 105 XU, B. et al. Direct conductance measurement of single DNA molecules in aqueous solution. **Nano Letters**, v. 4, n. 6, p. 1105-1108, 2004.
- 106 GUTIÉRREZ, R.; MANDAL, S.; CUNIBERTI, G. Quantum transport through a DNA wire in a dissipative environment. **Nano Letters**, v. 5, n. 6, p. 1093-1097, 2005.
- 107 ZIKIC, R. et al. Characterization of the tunneling conductance across DNA bases. **Physical Review E**, v. 74, n. 1, p. 011919/1-011919/9, 2006.
- 108 SONG, J. et al. Density of states of DNA molecules with varied itinerant electrons. **Synthetic Metals**, v. 155, n. 3, p. 607-610, 2005.
- 109 DAVIES, O. R.; INGLESFIELD, J. E. Electronic structure and conductance of large molecules and DNA. **Progress in Surface Science**, v. 74, n. 1, p. 161-176, 2003.
- 110 BAKHSHI, A. K. et al. On the electronic structure and conduction properties of aperiodic DNA and proteins. II. Electronic structure of aperiodic DNA. **Chemical Physics**, v. 108, n. 2, p. 215-222, 1986.
- 111 KLOTSKA, D.; RÖMER, R. A.; TURNER, M. S. Electronic transport in DNA. **Biophysical Journal**, v. 89, n. 4, p. 2187-2198, 2005.
- 112 ADESSI, C.; WALCH, S.; ANANTRAM, M. P. Environment and structure influence on DNA conduction. **Physical Review B**, v. 67, p. 081405/1-081405/4, 2003.
- 113 STEEL, A. B.; HERNE, T. M.; TARLOV, M. J. Electrochemical quantitation of DNA immobilized on gold. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 15, p. 4670-4677, 1998.
- 114 LI, Z. et al. Electrochemical studies on the permeable characteristics of thiol-modified double-stranded DNA self-assembled monolayers on gold. **Analyst**, v. 136, p. 2090-2099, 2011.
- 115 ARINAGA, K. et al. The role of surface charging during the coadsorption of mercaptohexanol to DNA layers on gold: direct observation of desorption and layer reorientation. **Langmuir**, v. 22, n. 13, p. 5560-5562, 2006.
- 116 KELLEY, S. O. et al. Orienting DNA helices on gold using applied electric fields. **Langmuir**, v. 14, n. 24, p. 6781-6784, 1998.
- 117 KEIGHLEY, S. D. et al. Optimization of DNA immobilization on gold electrodes for label-free detection by electrochemical impedance spectroscopy. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 23, p. 1291-1297, 2008.

118 TKAC, J.; DAVIS, J. J. An optimised electrode pre-treatment for SAM formation on polycrystalline gold. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 621, p. 117-120, 2008.

119 RON, H.; RUBINSTEIN, I. Self-assembled monolayers on oxidized metals. 3. Alkylthiol and dialkyl disulfide assembly on gold under electrochemical conditions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 120, n. 51, p. 13444-13452, 1998.

120 TRASATTI, S.; PETRII, O. A. Real surface area measurements in electrochemistry. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 327, n. 1/2, p. 353-376, 1992.

121 BOON, E. M.; SALAS, J. E.; BARTON, J. K. An electrical probe of protein–DNA interactions on DNA-modified surfaces. **Nature Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 282-286, 2002.

122 SU, H. et al. Ferrocenemonocarboxylic–HRP@Pt nanoparticles labeled RCA for multiple amplification of electro-immunosensing. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 11, p. 4601-4604, 2011.

123 AKITA, A. H. **Estudo eletroquímico da corrosividade de biodiesel para aço carbono e outros materiais metálicos usados em veículos automotores**. 2013. 183 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

124 AARON, D. S. **Transport in fuel cells**: electrochemical impedance spectroscopy and neutron imaging studies. 2010. 249 f. Dissertation (Doctor of Philosophy) - School of Civil and Environmental Engineering, Georgia Institute of Technology, Atlanta, 2010.

125 FERREIRA, A. A. P. et al. Preparation and characterization of immunosensors for disease diagnosis. In: SERRA, P. A. (Ed.). **Biosensors for health, environment and biosecurity**. Rijeka: InTech, 2011. Chap. 8, p. 183-214.

126 BENITES, T. A. **Estudo das propriedades dielétricas e de bloqueio de monocamadas automontadas**. 2013. 104 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

127 BUENO, P. R. et al. A facile measurement of heterogeneous electron transfer kinetics. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 22, p. 10920-10926, 2013.

128 GÓES, M. S. et al. A dielectric model of self-assembled monolayer interfaces by capacitive spectroscopy. **Langmuir**, v. 28, n. 25, p. 9689-9699, 2012.

129 RUDNEV, A. V.; YOSHIDA, K.; WANDLOWSKI, T. Electrochemical characterization of self-assembled ferrocene-terminated alkanethiol monolayers on low-index gold single crystal electrodes. **Electrochimica Acta**, v. 87, p. 770-778, 2013.

130 COTTON, F. A. **Chemical applications of group theory**. 3rd ed. New York: Wiley-Interscience, 1990. 480 p.

131 AOKI, H.; TAO, H. Label- and marker-free gene detection based on hybridization-induced conformational flexibility changes in a ferrocene-PNA conjugate probe. **Analyst**, v. 132, n. 8, p. 784-791, 2007.

132 BUENO, P. R.; FABREGAT-SANTIAGO, F.; DAVIS, J. J. Elucidating capacitance and resistance terms in confined electroactive molecular layers. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 1, p. 411-417, 2012.