

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP
Faculdade de Ciências e Tecnologia

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais
(POSMAT)

Victoria Midori Katata

**Modelos de membrana biológica para estudos de
interação molecular e detecção de azul de metileno**

Presidente Prudente

2024

Victoria Midori Katata

**Modelos de membrana biológica para estudos de interação molecular e
detecção de azul de metileno**

Monografia apresentada como requisito à obtenção do título de Mestre à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, sob orientação da Profa. Dra. Priscila Aléssio Constantino.

Presidente Prudente
2024

K19m

Katata, Victoria Midori

Modelos de membrana biológica para estudos de interação molecular e detecção de azul de metileno / Victoria Midori Katata. - Presidente Prudente, 2024

102 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Tecnologia, Presidente Prudente
Orientadora: Priscila Aléssio Constantino

1. Sensor eletroquímico. 2. Membrana de Impressão molecular. 3. Corante. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Tecnologia, Presidente Prudente. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

FOLHA DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Presidente Prudente

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE VICTORIA MIDORI KATATA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA - CÂMPUS DE PRESIDENTE PRUDENTE.

Aos 07 dias do mês de agosto do ano de 2024, às 14:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de VICTORIA MIDORI KATATA, intitulada **Modelos de membrana biológica para estudos de interação molecular e detecção de azul de metileno**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. PRISCILA ALESSIO CONSTANTINO (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Departamento de Física / Faculdade de Ciências e Tecnologia - Unesp/Câmpus de Presidente Prudente, Prof. Dr. FERNANDO JOSEPETTI FONSECA (Participação Virtual) do(a) Escola Politécnica / UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, Prof. Dr. LEONARDO NEGRI FURINI (Participação Virtual) do(a) Departamento de Física / Universidade Federal de Santa Catarina. Após a exposição pela mestranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: APROVADA. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Profa. Dra. PRISCILA ALESSIO CONSTANTINO

documento assinado digitalmente
 PRISCILA ALESSIO CONSTANTINO
Data: 08/08/2024 12:05:23 -0300
url(que valida a assinatura): https://validar.jb.gov.br

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Resumo

Sensores eletroquímicos são essenciais para diversas áreas, contribuindo para a detecção e monitoramento de diversas moléculas e compostos, incluindo aqueles que podem ser danosos à saúde humana e ao ambiente. Esses sensores são geralmente de baixo custo, rápida detecção e possuem alta especificidade e sensibilidade. Um dos métodos de fabricar os sensores eletroquímicos é a impressão molecular, que produz impressões moleculares, ou seja, cavidades do composto a ser detectado. A tecnologia mais conhecida e reportada é baseada em um polímero, o Polímero Molecularmente Impresso (MIP). No entanto, a fabricação de MIPs pode envolver processos complexos e o uso de materiais potencialmente tóxicos, além de apresentar limitações na uniformidade dos sítios de reconhecimento molecular e na biocompatibilidade dos materiais. Uma alternativa promissora aos MIPs são as Membranas de Impressões Moleculares (MIM), que seguem os princípios dos MIPs, porém utilizando diferentes materiais para a obtenção delas, como por exemplo membranas fosfolipídicas que podem oferecer maior controle na nanoestruturação das cavidades, maior biocompatibilidade e um processo de fabricação menos tóxico e complexo. Sendo assim o objetivo deste trabalho é investigar a interação entre o azul de metileno (AM) e o fosfolipídio 1,2-dipalmitoil-sn-3-glicerofosfatidilcolina (DPPC) e o cloridrato de poli alilamina (PAH) para formação de filmes de Langmuir, e posteriormente, produzir um filme Langmuir- Schaefer (LS) sobre substrato de óxido de estanho dopado com índio (ITO), e fabricar um sensor utilizando a MIM para a detecção do AM. As isotermas $\pi - A$ demonstraram uma interação entre o AM, PAH e o DPPC, devido ao fosfolipídio ser zwitteriônico e o AM e o PAH serem catiônicos fazendo com que o AM não fosse expulso da interface ar-água e possibilitando a fabricação dos filmes LS contendo AM, PAH e DPPC. Eletrodos ITO/DPPC+PAH+AM foram fabricados com 3 camadas de filme. Os espectros de UV-Vis e Raman demonstraram a presença do AM no filme após a deposição e a remoção dele, produzindo o eletrodo ITO/MIM, após serem ciclados utilizando voltametria cíclica. A análise eletroquímica em eletrólito inerte confirmou a presença de AM no filme ITO/DPPC+PAH+AM pela presença do par redox do AM. Após a remoção eletroquímica do MB do filme, tais picos ficaram ausentes para o ITO/MIM. O teste de detecção em solução de AM demonstrou a detecção do corante, e o limite de detecção foi de $3,4 \times 10^{-7}$ mol/L. O teste de seletividade realizado com a quercetina demonstrou que o ITO/MIM é seletivo, não apresentando resposta para o flavonoide. As imagens de AFM demonstraram uma rugosidade maior para o DPPC+PAH+AM do que para a MIM, condizendo com o

esperado. Conclui-se que o sensor fabricado é seletivo e sensível, proporcionando detecção do AM em baixas concentrações, além de se utilizar de uma metodologia menos complexa e menos tóxica que os MIP. Destaca-se que esta metodologia pode ser otimizada para produzir MIMs visando a detecção de outras moléculas alvo, alterando o fosfolípido utilizado.

Palavras-chave: sensor eletroquímico, membrana de impressão molecular, corante.

Abstract

Electrochemical sensors are essential for several areas, contributing to the detection and monitoring of various molecules and compounds, including those that can be harmful to human health and the environment. These sensors are generally low cost, fast detection and have high specificity and sensitivity. One of the methods of manufacturing electrochemical sensors is molecular printing, which produces molecular impressions, that is, cavities of the compound to be detected. The best-known and reported technology is based on a polymer, the Molecularly Imprinted Polymer (MIP). However, the manufacture of MIPs can involve complex processes and the use of potentially toxic materials, in addition to presenting limitations in the uniformity of molecular recognition sites and the biocompatibility of materials. A promising alternative to MIPs are Molecular Imprinting Membranes (MIM), which follow the principles of MIPs, but use different materials to obtain them, such as phospholipid membranes that can offer greater control in the nanostructuring of cavities, greater biocompatibility and a less toxic and complex manufacturing process. Therefore, the objective of this work is to investigate the interaction between methylene blue (MB) and the phospholipid 1,2-dipalmitoyl-sn-3-glycero-phosphatidylcholine (DPPC) and polyallylamine hydrochloride (PAH) for film formation. of Langmuir, and subsequently, produce a Langmuir-Schaefer (LS) film on an indium-doped tin oxide (ITO) substrate, and manufacture a sensor using MIM for MB detection. The π -A isotherms demonstrated an interaction between MB, PAH and DPPC, due to the phospholipid being zwitterionic and MB and PAH being cationic, meaning that MB was not expelled from the air-water interface and enabling the fabrication of LS films containing MB, PAH and DPPC. ITO/DPPC+PAH+MB electrodes were manufactured with 3 layers of film. The UV-Vis and Raman spectra demonstrated the presence of MB in the film after its deposition and removal, producing the ITO/MIM electrode, after being cycled using cyclic voltammetry. Electrochemical analysis in inert electrolyte confirmed the presence of MB in the ITO/DPPC+PAH+MB film due to the presence of the MB redox couple. After electrochemical removal of MB from the film, such peaks were absent for ITO/MIM. The detection test in MB solution demonstrated the detection of the dye, and the detection limit was 3.4×10^{-7} mol/L. The selectivity test carried out with quercetin demonstrated that ITO/MIM is selective, showing no response to the flavonoid. The AFM images demonstrated a greater roughness for DPPC+PAH+MB than for MIM, consistent with expectations. It is concluded that the manufactured sensor is selective and sensitive, providing MB detection at low concentrations, in addition to using a less complex and

less toxic methodology than MIP. It is noteworthy that this methodology can be optimized to produce MIMs aiming at the detection of other target molecules, changing the phospholipid used.

Keywords: electrochemical sensor, molecularly imprinted membrane, dye.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Ilustração do modelo de mosaico fluido de uma membrana celular [20].	22
Figura 2: Isoterma π -A ilustrando as três fases de compressão do filme de Langmuir até seu colapso. Ao lado, um modelo de uma molécula anfifílica.	27
Figura 3: Representação esquemática da deposição via Langmuir-Schaefer (LS) na cuba de Langmuir.	29
Figura 4: O espectro eletromagnético, desde raios gama até ondas de rádio, tendo como imagem ampliada o espectro visível da luz.	30
Figura 5: Diagrama de energia de diferentes transições de uma molécula considerando dois estados eletrônicos de energia.	31
Figura 6: Diagrama de energia para os espalhamentos Rayleigh, Raman-Stokes e Raman anti-Stokes.	33
Figura 7: Ilustração do microscópio de força atômica (AFM) [49].	34
Figura 8: a) imagem de uma sonda; b) zoom da ponta da sonda, podendo observar a alavanca; c) zoom da alavanca, onde observa-se a ponta [50-52].	35
Figura 9: Diferentes geometrias de ponta de AFM, utilizadas para diferentes tipos de varredura ou amostras [53].	35
Figura 10: Tipos de voltametria para diferentes formas de potencial aplicado.	37
Figura 11: Representação esquemática de uma célula eletroquímica convencional, contendo o eletrodo de referência (ER), o eletrodo de trabalho (ET) e o eletrodo auxiliar (EA).	38
Figura 12: Representação de um voltamograma obtido por meio de voltametria cíclica. [54].	40
Figura 13: Representação a) da aplicação de potencial em função do tempo no DPV e b) de um voltamograma de pulso diferencial [60].	41
Figura 14: Representação esquemática da estrutura molecular do fosfolípido DPPC, do corante azul de metileno, do polieletrólito PAH e do flavonoide quercetina.	42
Figura 15: Isotermas π -A de DPPC puro em subfase aquosa e na presença do AM na subfase (1×10^{-4} mol/L), obtidas à temperatura ambiente. As linhas pontilhadas extrapoladas até o eixo x indicam a área molecular média.	50
Figura 16: Gráfico de módulo compressional por pressão de superfície do DPPC em subfase aquosa e na presença do AM.	51

Figura 17: Acompanhamento da deposição dos filmes LS das monocamadas de (a) ITO/DPPC (1×10^{-3} mol/L) e (b) ITO/DPPC+AM (1×10^{-4} mol/L) na subfase aquosa. Os gráficos mostram a variação da área entre as barreiras móveis da cuba pelo tempo a uma pressão de superfície.....	52
Figura 18: Espectros de absorção UV-Vis dos filmes LS de ITO/DPPC, ITO/DPPC+AM e ITO/MIM.	54
Figura 19: Espectros Raman, com linha de laser 633, dos filmes contendo 3 camadas de ITO/DPPC+AM, ITO/MIM e de ITO/DPPC.	55
Figura 20: Voltamogramas cíclicos dos filmes de ITO/DPPC, ITO/DPPC+AM e ITO/MIM, obtidos em solução de KCl 0,1 mol/L, a) de -1,0 a +1,0 V e b) um recorte do intervalo de -0,4 a +0,3 V. $\nu = 50$ mV/s.....	57
Figura 21: Esquema do mecanismo de redução do azul de metileno.....	58
Figura 22: Voltamogramas cíclicos dos filmes de ITO/DPPC, ITO/DPPC+AM e da ITO/MIM, obtidos em solução de azul de metileno $60 \mu\text{mol/L}$ com KCl 0,1 mol/L, a) de -0,8 a 0,0 V e b) um recorte do intervalo de -0,5 a 0,0 V. $\nu = 50$ mV/s.....	59
Figura 23: Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com: a) ITO, b) ITO/DPPC, c) ITO/MIM variando-se a concentração de $4 \times 10^{-9} - 6 \times 10^{-8}$ mol/L, e c) as curvas de calibração obtidas através de DPV para os três filmes. $\nu = 50$ mV/s.....	61
Figura 24: Comparação dos voltamogramas de pulso diferencial do ITO, ITO/DPPC e ITO/MIM para a concentração de $2,0 \times 10^{-8}$ mol/L.	62
Figura 25: Voltamogramas cíclicos do ITO, do ITO/DPPC e do ITO/MIM obtidos em solução de quercetina ($60 \mu\text{M}$). $\nu = 50$ mV/s.	63
Figura 26: Esquema do mecanismo de oxidação da quercetina [84].	64
Figura 27: a) Isotermas π -A de DPPC com PAH na subfase aquosa, e na presença do AM na subfase (1×10^{-4} mol/L), obtidas à temperatura ambiente. b) Isoterma π -A de DPPC com e sem a presença de AM na subfase. As linhas pontilhadas extrapoladas até o eixo x indicam a área molecular média.	66
Figura 28: Módulo compressional das isotermas π -A de a) DPPC+PAH e DPPC+PAH+AM. b) DPPC e DPPC+AM.....	68
Figura 29: Gráfico de deposição de: a) LS de DPPC+PAH; b) LS de DPPC+PAH+AM.	69
Figura 30: Crescimento do filme LS de DPPC+PAH+AM monitorado através do UV-Vis, sendo a azul a primeira camada, a roxa a segunda camada e a vermelha a terceira camada.	70

Figura 31: a) Espectros de UV-Vis do filme contendo azul de metileno (em azul) e do filme após a remoção do corante (em preto), realizado através da voltametria cíclica. b) Ilustração da Membrana Impressa Molecularmente (MIM) na presença e na ausência de MB.....	71
Figura 32: Espectros Raman, com linha de laser 633 nm, dos filmes contendo 3 camadas de DPPC+AM, DPPC+PAH+AM e da MIM.	72
Figura 33: a) Imagem do filme de DPPC+AM e b) imagem do filme de DPPC+PAH+AM.	73
Figura 34: Voltametria cíclica em solução de KCl (concentração de 0,1 mol/L) do eletrodo contendo os filmes de DPPC+PAH.	74
Figura 35: Voltamogramas dos eletrodos de a) DPPC+PAH+AM, b) voltamograma da comparação entre os eletrodos contendo AM com e sem PAH e c) voltamograma aproximado da comparação dos eletrodos com e sem a presença de PAH.	75
Figura 36: a) voltamograma dos 10 primeiros ciclos do eletrodo de DPPC+PAH+AM; b) DPV do 20º ciclo; c) voltamograma até o ciclo 26; d) aproximação de c); e) DPV do ciclo 26.	77
Figura 37: DPV do sensor em solução de KCl (0,1 mol/L) após a imersão na solução de azul de metileno, concentração 1×10^{-6} mol/L, para os tempos de 10, 20 e 30 minutos. Os voltamogramas são apresentados utilizando linha de base.....	79
Figura 38: DPV do eletrodo de ITO/MIM em KCl (0,1 mol/L) após 20 minutos imerso em diferentes concentrações de AM (de 4×10^{-7} até 1×10^{-6} mol/L). Voltamogramas apresentados utilizando linha de base.....	80
Figura 39: Curva de calibração da detecção de AM para diferentes concentrações, onde a barra representa o desvio padrão da análise realizada em triplicata independente.....	81
Figura 40: DPV do ITO em solução de quercetina e KCl.....	82
Figura 41: DPV em KCl (0,1 mol/L) do ITO/MIM após a imersão do eletrodo em solução de quercetina (1×10^{-6} mol/L) por 20 minutos.....	83
Figura 42: a) Imagem topográfica de AFM do substrato BDD, com 20 μm x 20 μm e escala de 4 μm ; b) Imagem topográfica em 3D da imagem mostrada em (a).	84
Figura 43: a) Imagem topográfica de AFM do filme LS de DPPC sobre BDD, com 20 μm x 20 μm e escala de 4 μm ; b) Imagem topográfica de AFM em 3D da imagem mostrada em (a).	85
Figura 44: a) Imagem de AFM do DPPC+PAH em escala de 4 μm e tamanho de imagem de 20 μm ; b) Imagem em 3D do filme de DPPC+PAH.....	86

Figura 45: a) Imagem de AFM do filme de DPPC+PAH+AM em escala de 4 μm e tamanho de imagem de 20 μm ; b) Imagem em 3D do AFM de DPPC+PAH+AM. 87

Figura 46: a) Imagem AFM do filme contendo a MIM em escala de 4 μm e tamanho de imagem de 20 μm ; b) Imagem em 3D do filme contendo a MIM. 88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Atribuições das bandas Raman para o filme de ITO/DPPC + AM [70,76]. .. 55

Tabela 2: Valor de rugosidade (R_q) calculadas a partir das imagens de AFM apresentadas nas Figuras 42, 43, 44, 45 e 46 realizadas para o substrato BDD e os filmes LS depositados sobre BDD contendo DPPC, DPPC+PAH, DPPC+PAH+AM e para a MIM. 89

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Desenvolvimento de sensores.....	17
1.2. Modelo de Impressão molecular	19
1.3. Modelos de membranas	21
2. OBJETIVOS	24
3. CONCEITOS TEÓRICOS	25
3.1. Filmes de Langmuir	25
3.2. Langmuir-Schaefer (LS)	28
3.3. Espectroscopia de absorção UV-Vis.....	29
3.4. Espectroscopia Raman	31
3.5. Microscopia de força atômica (AFM).....	34
3.6. Caracterizações Eletroquímicas.....	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1. Reagentes e materiais.....	41
4.2. Filmes de Langmuir	42
4.3. Langmuir-Schaefer (LS)	43
4.4. Espectroscopia de absorção UV-Vis.....	44
4.5. Espectroscopia Raman	44
4.6. Microscopia de Força Atômica (AFM)	45
4.7. Caracterizações eletroquímicas.....	45
4.8. Limite de Detecção	47
4.9. Teste de seletividade	48
RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5 - REALIZAÇÃO DA MIM SEM O PAH.	49
5.1. Filmes de Langmuir	50
5.2. Langmuir-Schaefer (LS)	52

5.3. Espectroscopia de absorção UV-Vis.....	53
5.4. Espectroscopia Raman.....	55
5.5. Caracterização eletroquímica.....	56
5.6. Voltametria de Pulso Diferencial (DPV).....	60
5.7. Teste de seletividade	62
6 – REALIZAÇÃO DA MIM COM O PAH	65
6.1. Filmes de Langmuir com PAH.....	66
6.2. Langmuir-Schaefer (LS).....	69
6.3. Espectroscopia de absorção UV-Vis	69
6.4. Espectroscopia Raman	72
6.5. Caracterização eletroquímica	73
6.6. Teste em solução de azul de metileno	78
6.7. Limite de detecção	80
6.8. Teste de seletividade.....	82
6.9. Microscopia de força atômica (AFM)	83
CONCLUSÃO	91
REFERÊNCIAS	95

1. INTRODUÇÃO

1.1. Desenvolvimento de sensores

Sensores e biossensores químicos tornaram-se essenciais no desenvolvimento de áreas como a biomedicina, alimentícia, ambientais, entre outras, por proporcionar, através de diferentes técnicas, a detecção e monitoramento de várias espécies e moléculas em sistemas dos mais simples ao mais complexo [1]. De acordo com a IUPAC (do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*) os sensores químicos são:

“[...] um dispositivo que transforma informações químicas, desde concentrações de um componente específico da amostra até a análise da composição total, em um sinal analiticamente útil” [2].

Esta informação química pode ser originada do analito ou de alguma propriedade física do sistema estudado.

Os sensores químicos contêm, em sua maioria, duas unidades básicas funcionais: o receptor e o transdutor. O receptor é a unidade em que a informação química se transforma em energia que pode ser medida, ou seja, ele interage com o analito, convertendo esta interação em um sinal que pode ser medido. O receptor pode ser baseado em vários princípios: (i) físicos, onde não ocorre reação química, alguns exemplos são as medidas que ocorrem por meio de absorvância, condutividade, temperatura, entre outros; (ii) químico, onde ocorre reação química com a participação do analito, dando o sinal analítico; (iii) bioquímico, onde um processo bioquímico é a fonte do sinal analítico, como por exemplo os imunossensores, que pertencem a um subgrupo chamado de biossensores [2].

O transdutor é onde se transforma a resposta gerada pelo receptor-analito em um sinal detectável, por meio de uma instrumentação moderna [3]. É através do transdutor que se tem as classificações dos sensores em eletroquímicos, óticos, gravimétricos, termométricos e magnéticos. Os sensores eletroquímicos transformam a interação do

analito-eletrodo em um sinal útil. Existem alguns subgrupos dentre os sensores eletroquímicos, como os voltamétricos, potenciométricos, impedimétricos, fotoeletroquímicos e os de quimiluminescência eletrogerada [3].

Os sensores eletroquímicos são amplamente utilizados em áreas alimentícias, ambientais, medicinais, entre outros. São de baixo custo, simples, podem possuir alta especificidade e sensibilidade e possuem respostas rápidas [3]. Ao longo da última década, os sensores eletroquímicos foram desenvolvidos como ferramentas promissoras para a detecção de pesticidas e poluentes emergentes. Jin *et al* (2019) desenvolveu um biossensor eletroquímico e colorimétrico a base de papel para a detecção de pesticidas organofosforados [4].

Apesar de geralmente apresentarem boa especificidade e sensibilidade, os sensores podem ser aprimorados com nanoestruturas, como nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro, para melhorar a transferências de elétrons, a relação do sinal/ruído e aumentar a área eletroativa, melhorando assim seu desempenho analítico [5]. Os sensores eletroquímicos podem ser construídos através de diversas técnicas e de diferentes formas de montagem. Uma dessas maneiras é a utilização de modelos de impressão molecular, para que se tenha uma maior especificidade na aplicação do sensor [6].

1.2. Modelo de Impressão molecular

A tecnologia de Impressão Molecular (MIT, do inglês *Molecular Imprinting Technology*) diz respeito a formação de sítios seletivos de uma molécula em uma matriz, formando assim uma memória de um molde da molécula alvo. O mecanismo mais reportado sobre as impressões moleculares são os Polímeros Molecularmente Impressos (MIP, do inglês *Molecularly Imprinted Polymers*) [7]. O primeiro relato do MIP surgiu há mais de 60 anos, quando Dickey (1949) [8] publicou sobre gel de sílica com impressão molecular, preparados na presença de alaranjado de metila e alguns homólogos. Posteriormente, na década de 1970, Wulff e Sarhan aplicaram a técnica de impressão molecular para materiais orgânicos através do método chamado de “impressão molecular covalente”, assim o MIP começou a ser estudado e reportado na literatura [9,10].

O MIP utiliza-se de polímeros para a formação de cavidades que são física e quimicamente complementares, com relação a grupos funcionais, forma do analito e tamanho da molécula alvo a ser reconhecida [11]. Eles também são reconhecidos como polímeros biomiméticos, pois possuem o sistema de reconhecimento biológico de “chave-fechadura” presentes em antígenos e anticorpos [12]. Porém, se comparado aos materiais biológicos, os polímeros possuem algumas vantagens, como fácil preparação, baixo custo, alta resistência mecânica e térmica e pode ser armazenado sem perda de eficiência [13,14,15].

Existem três classificações para os tipos de MIP, de acordo com o processo de interação entre a molécula alvo e o grupo funcional do polímero, são eles: (1) impressão covalente, onde são utilizadas as ligações covalentes reversíveis entre a molécula alvo e o monômero, afim de obter uma distribuição uniforme de sítios de ligação no polímero; (2) impressão não-covalente, geralmente o mais utilizado, e baseia-se na ligação fraca entre os monômeros e a molécula alvo; (3) impressões semi-covalentes, eles incluem os

processos (1) e o (2), ou seja, a impressão molecular é formada por ligação covalente e a molécula alvo se liga ao monômero com interação não-covalente [12].

Para a fabricação do MIP são normalmente necessários quatro elementos básicos: os monômeros funcionais, os *crosslinkers*, os iniciadores e as moléculas alvo, também chamados de *templates*. Os monômeros funcionais formam complexos específicos com os *templates* por meio de interações covalentes ou não. Os *crosslinkers* tem como função imobilizar os grupos funcionais do monômero funcional na impressão molecular, e estabilizar a ligação entre o *template* e a estrutura do polímero. Os iniciadores são responsáveis pela promoção da reação de polimerização, ajudando assim na formação de radicais livres, dando início ao processo de polimerização [7,11,12].

Pela sua versatilidade e seletividade, os MIPs podem ser aplicados em diversas áreas, como na purificação de reagentes químicos e biológicos, na liberação controlada de medicamentos, também conhecidos como *drug-delivery*, e uma gama de aplicações são voltadas para sensores [13]. Porém, apesar de todas as aplicações e estudos, os MIPs possuem desafios a serem superados. Por exemplo, os MIPs apresentam melhores resultados em meios apolares, e se colocados em meios polares podem causar interferências entre o monômero e o *template*. Além disso, existe dificuldades de remoção do *template*, pois este é fortemente ligado aos *cross-linkers*, resultando em um MIP não uniforme. Existe também uma limitada variedade de monômeros funcionais e *cross-linkers* disponíveis para a fabricação dos MIPs, além da toxicidade e custo dos reagentes químicos utilizados, o que dificulta a produção em larga escala [12].

Outra alternativa de impressão molecular vem sendo estudada, as chamadas Membranas de Impressão Molecular (MIM, do inglês *Molecularly Imprinted Membranes*) [11]. Essas alternativas foram desenvolvidas para membranas de separação, como a filtração. Este tipo também tem como objetivo a obtenção das cavidades formadas depois

da remoção do *template*, porém diferentemente dos MIPs, que utilizam de polímeros como a matriz onde as cavidades são encontradas, as MIMs podem ser preparadas utilizando outros tipos de materiais, como por exemplo membranas poliméricas e também filmes finos compostos por uma bicamada lipídica, como em Dergunov e Pinkhassik (2008) e Danila *et al* (2008) [16,17], Eles utilizaram de fosfolipídios para construir materiais orgânicos finos subnanométricos com nanoporos de tamanho programado, aplicando assim a técnica de impressão molecular em bicamadas na forma de vesículas.

Assim o objetivo deste projeto é produzir uma MIM para posterior aplicação sensorial na detecção de glifosato. Assim, primeiro buscamos otimizar a produção da MIM utilizando como molécula *template* o azul de metileno em um modelo de membrana composto pelo fosfolipídio DPPC para a obtenção das membranas com impressão molecular. O azul de metileno é um corante que apresenta características que facilitam a caracterização da MIM, como absorção óptica no UV-Vis, seção de choque para espalhamento Raman e processos redox bem estabelecidos.

1.3. Modelos de membranas

As membranas biológicas são constituídas principalmente de lipídios, sendo eles principalmente fosfolipídios, glicolipídios, esfingolipídios, esteróis, entre outros, e também por proteínas, como demonstradas no modelo do mosaico fluido, Figura 1 [18], aceito para representar a estrutura e funções da membrana nos dias de hoje. Este modelo foi desenvolvido por Singer e Nicolson em 1972 [19].

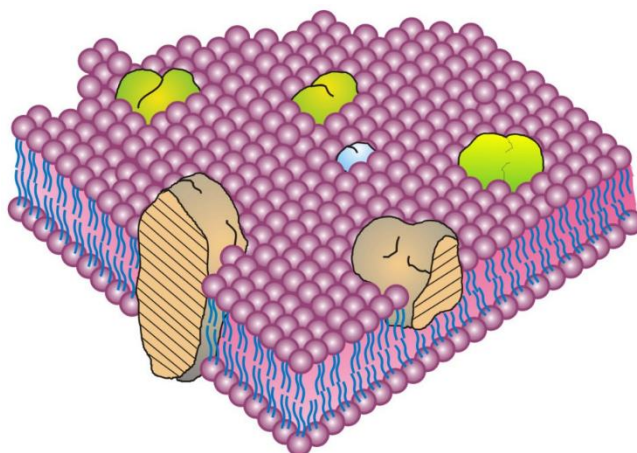


Figura 1: Ilustração do modelo de mosaico fluido de uma membrana celular, onde em roxo tem-se a bicamada lipídica, e os corpos sólidos apresentados na figura representam as proteínas integrais globulares. [20].

Os lipídios se arranjam na forma de bicamadas lipídicas, constituindo o “citoesqueleto” das células e organelas. Dentre os tipos de lipídios que constituem a membrana plasmática, os fosfolipídios são os encontrados em maior abundância nas membranas de mamíferos, sendo as fosfatidilcolinas a maior proporção [21]. Os fosfolipídios possuem caráter anfifílico, ou seja, possuem uma parte da molécula com caráter polar e a outra parte apolar, possuem normalmente duas cadeias de hidrocarbonetos e terminação com cabeça polar [22].

Monocamadas de fosfolipídios estruturados pela técnica de filmes de Langmuir podem ser consideradas um modelo simplificado das membranas celulares, e vem sendo utilizadas para o estudo de possíveis interações entre diversas substâncias, incluindo poluentes emergentes, e a membrana [23,24,25]. Modelos biomiméticos de membranas podem ser estruturados através de diferentes metodologias, como o caso dos filmes LB e vesículas unilamelares, como por exemplo, as LUVs (do inglês, *Large Unilamellar Vesicles*) e as GUVs (do inglês, *Giant Unilamellar Vesicles*) [26,27,28].

Os modelos de membranas baseados em monocamadas de Langmuir se destacam pela facilidade de se controlar parâmetros como a pressão superficial e velocidade das

barreiras, além das diferentes formas de caracterização que podem ser realizadas. As membranas também podem ser depositadas como filmes finos em substratos sólidos, como no caso dos filmes de Langmuir-Blodgett (LB) e Langmuir-Schaefer (LS) [29,30]. Neste trabalho, monocamadas de Langmuir foram empregadas como modelo de membrana, possibilitando verificar as interações entre o azul de metileno e o DPPC (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina). Adicionalmente, a técnica de LS foi adotada para a deposição dos filmes de DPPC e DPPC na presença de azul de metileno nos substratos sólidos de ITO.

2. OBJETIVOS

Esta dissertação de mestrado tem como objetivo geral investigar as possíveis interações entre o azul de metileno e modelos de membranas biológicas, utilizando o fosfolípido DPPC. Em um segundo momento, as membranas miméticas serão transferidas para substratos sólidos (eletrodos) para serem testadas como um sensor para a detecção do azul de metileno, formando uma estrutura de Membrana de Impressão Molecular (MIM). Os objetivos específicos são descritos a seguir:

1. Estudar a interação entre o AM e o DPPC, via isoterma π -A, utilizando filmes de Langmuir, para o fosfolípido puro e na presença do corante;
2. Produzir a MIM através da deposição via Langmuir-Schaefer (LS);
3. Caracterizar a MIM por meio do UV-Vis, microscopia Raman e voltametria;
4. Realizar o teste de interferente, utilizando a Quercetina;
5. Determinar o limite de detecção do sensor para a detecção do AM.

3. CONCEITOS TEÓRICOS

3.1. Filmes de Langmuir

Um filme (película) ultrafino pode se formar quando se tem o espalhamento de um material insolúvel, sobre a superfície da água, alterando a tensão superficial da interface ar-água. Uma das primeiras aplicações deste fenômeno foi o *suminagashi*, o qual teve origem na China, antes da era cristã, e que é praticado também no Japão [31]. A película formada sobre a superfície da água é chamada de filme de Langmuir, em homenagem a Irving Langmuir, o qual, no início do século XX reuniu dados teóricos e experimentais descrevendo as propriedades e características dos filmes monomoleculares. Em seu trabalho, publicado em 1917 [32], Langmuir estudou o espalhamento das moléculas sobre a superfície aquosa, e também fez considerações sobre as forças químicas e físicas envolvidas no processo. Com este trabalho, Irving Langmuir recebeu o prêmio Nobel de Química em 1932.

Para se fabricar um filme de Langmuir, utiliza-se o equipamento “cuba de Langmuir”, composta por uma cuba de teflon onde adiciona-se a subfase geralmente aquosa, um sensor que mede a tensão superficial e um par de barreiras móveis que comprimem a monocamada a uma velocidade controlada. O sensor de pressão utilizado nas medidas baseia-se no método de Wilhelmy [33].

Alguns requisitos são necessários para a fabricação de filmes ultrafinos monomoleculares de Langmuir; as moléculas devem ser: i) insolúveis em água, ii) solúveis em solventes voláteis e preferencialmente imiscíveis em água; ii) anfifílicas, ou seja, possuir parte da molécula sem afinidade com a água (caráter hidrofóbico) e parte com afinidade (caráter hidrofílico), para que assim os filmes sejam formados na interface ar/água [33]. Os grupos hidrofílicos permitem que as moléculas sejam espalhadas na superfície da água, enquanto a parte hidrofóbica é responsável pela permanência das moléculas na interface ar/água, não permitindo sua solubilização na subfase. A molécula

de interesse então é solubilizada em solventes orgânicos, os quais são altamente voláteis, e são posteriormente espalhadas sobre a subfase aquosa. A volatilidade dos solventes é importante para que ocorra a evaporação do mesmo da interface ar-água. Após isso, as moléculas do material são comprimidas pelas barreiras móveis, de modo que as moléculas antes dispersas passem a se agrupar de forma organizada, formando assim a monocamada denominada de filme de Langmuir.

A caracterização básica desses filmes é realizada por meio das isotermas de pressão de superfície por área molecular média. Para encontrar a pressão de superfície (π), calcula-se a diferença entre a tensão de superfície da água ultrapura (γ_0) e da água com a monocamada espalhada (γ), como demonstrado na Equação 1:

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad (1)$$

Medindo então a pressão de superfície em função da variação da área entre as barreiras se obtêm as isotermas π -A [34]. A maneira mais usual de se utilizar essas isotermas é para obter informações sobre a estruturação da monocamada, pois durante a compressão das moléculas é possível notar pontos onde ocorrem transições de fase, os quais indicam uma orientação das moléculas na interface.

Durante a compressão as isotermas podem apresentar três fases que caracterizam a compressão do filme, nomeadas em uma analogia com as fases da matéria, como gás, líquido e sólido: i) fase gasosa, onde as moléculas não interagem entre si, devido as mesmas estarem dispersas. O filme apresenta uma estrutura desordenada e sua densidade superficial é baixa.; ii) fase líquida, as moléculas começam a apresentar uma pequena interação entre si e a estrutura molecular do filme começa a se tornar mais ordenada, mas ainda apresenta alguma fluidez. E iii) fase condensada, as moléculas possuem uma organização altamente empacotada e compacta, formando assim um filme de espessura monomolecular. As interações de Van der Waals e as ligações de hidrogênio são

significativas e a densidade superficial do filme é alta, exibindo características semelhantes a uma fase condensada. Caso o filme seja comprimido além desse ponto as moléculas agrupam-se desorganizadamente, provocando o colapso do filme, como tipicamente ocorre em moléculas anfifílicas. A Figura 2 demonstra um esquema de uma isoterma contendo as três fases de compressão do filme de Langmuir até o seu colapso.

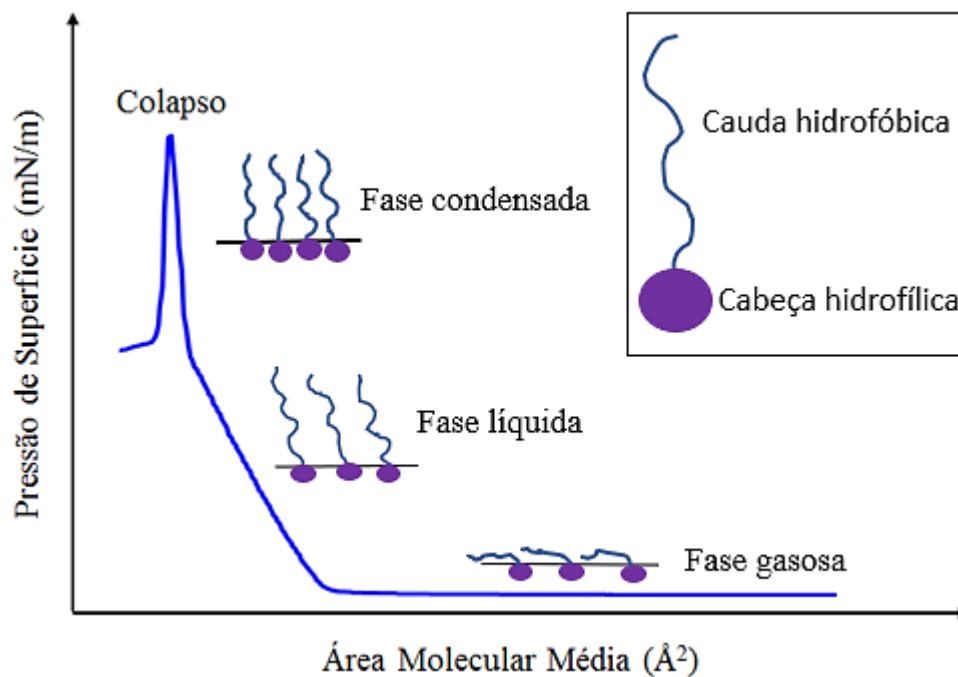


Figura 2: Isoterma π -A ilustrando as três fases de compressão do filme de Langmuir até seu colapso. Ao lado, um modelo de uma molécula anfifílica.

Além das informações sobre o empacotamento na monocamada pode-se ainda obter informações sobre o fator de compressibilidade (C_S), ou também sobre o módulo compressional (C_S^{-1}), este último está demonstrado na Equação 2:

$$C_S^{-1} = - \frac{1}{A} \frac{\partial \pi}{\partial A} \quad (2)$$

onde π é a pressão de superfície e A é a área molecular média. O módulo compressional é uma propriedade física que descreve a resposta elástica dos filmes de Langmuir durante o processo de compressão da área superficial. Refere-se à rigidez ou resistência do filme à compressão e está relacionado à organização e interações

moleculares presentes no filme. Assim, consegue-se determinar o quão suscetível a monocamada é em relação a compressão, ou seja, a resistência do filme em se ajustar à nova área, indicando a rigidez do filme. O módulo compressional também é útil para determinar as regiões de transição de fase [35]. Existem recomendações para se determinar as transições de fases dos lipídios de acordo com o valor máximo de C_s^{-1} [35]: a fase líquido-expandida encontra-se entre o intervalo de 12,5 a 50 mN/m e a fase líquido-condensada no intervalo de 100 a 250 mN/m.

3.2. Langmuir-Schaefer (LS)

A técnica de fabricação de deposição de filmes de Langmuir foi inicialmente aperfeiçoada, a partir de 1930, por Katharine Blodgett [36], permitindo a deposição sucessiva de monocamadas sobre um mesmo substrato sólido. Nesse caso, a deposição foi realizada pela transferência de camadas monomoleculares de uma subfase aquosa para um substrato. Esses substratos eram feitos de vidro, cromo, níquel, platina, entre outros, enquanto os filmes eram construídos de ácido esteárico, entre outros. As deposições foram realizadas com 21 até 201 camadas. Em homenagem aos dois cientistas estes filmes receberam o nome de filmes Langmuir-Blodgett (LB). A técnica de Langmuir-Schaefer (LS) foi desenvolvida por Langmuir e por Vincent J. Schaeffer. Os primeiros métodos consistiam em monocamadas de urease ou pepsina em subfase aquosa, que foram depositadas em placas, ou então adsorvidas da subfase por placas condicionadas, as quais possuíam alta atividade química [37].

O equipamento utilizado para a fabricação de filmes LB e LS é o mesmo para os filmes de Langmuir, a “cuba de Langmuir”, onde a monocamada é comprimida até atingir a fase condensada, e então com um substrato sólido, realiza-se lentamente a retirada de uma parte desta monocamada da subfase, depositando a mesma no substrato. No filme LB a transferência da monocamada para o filme realiza-se mergulhando o substrato

verticalmente na cuba, enquanto no filme LS essa deposição ocorre quando o substrato toca a monocamada na horizontal. Esta deposição pode ser realizada de forma mecânica ou manual, e dependendo do material a ser depositado podem ser realizadas deposições de poucas ou muitas camadas [30]. A Figura 3 mostra um esquema de deposição de um filme LS.

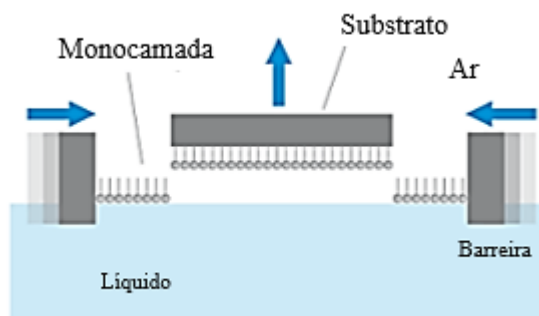


Figura 3: Representação esquemática da deposição via Langmuir-Schaefer (LS) na cuba de Langmuir.

Uma boa deposição depende da natureza das moléculas, dos parâmetros envolvidos na deposição, como por exemplo a pressão para manter a monocamada no estado líquido-condensado, a rigidez da monocamada e a velocidade de retirada do substrato da subfase, além de depender da estabilidade do filme. A deposição pode ser realizada de forma mecânica ou de forma manual.

3.3. Espectroscopia de absorção UV-Vis

A espectroscopia de UV-Vis está relacionada com transições eletrônicas referentes à absorção de radiação eletromagnética pela matéria, onde a energia está na região do ultravioleta-visível, como demonstrado na Figura 4. Este tipo de espectroscopia permite obter informações sobre transições eletrônicas das moléculas do material. A técnica pode ser utilizada para determinar, de modo quantitativo a concentração de substâncias em

solução que absorvem radiação, ou também acompanhar o crescimento dos filmes finos fabricados em substratos [38].

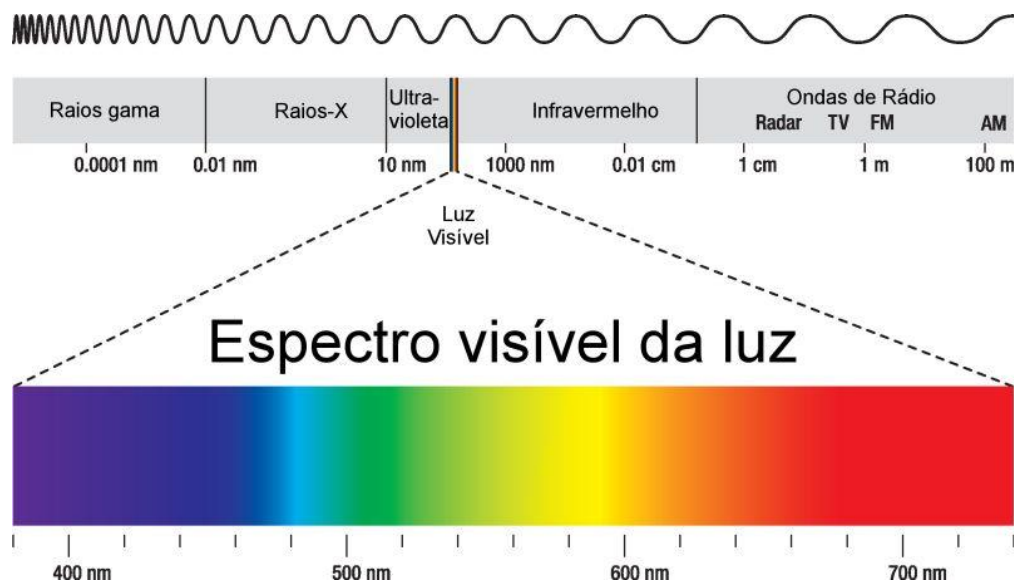


Figura 4: O espectro eletromagnético, desde raios gama até ondas de rádio, tendo como imagem ampliada o espectro visível da luz.

Em alguns casos, a radiação eletromagnética absorvida pelas moléculas acaba sendo dissipada em forma de calor, ocasionando a volta da molécula ao seu estado fundamental. Porém em outros casos, quando ocorre absorção de energia, apenas uma parte desta energia se dissipa, onde a molécula volta ao estado fundamental emitindo fótons de energia menor que a da radiação absorvida [ATKINS 1999; SKOOG 2002]. A Figura 5 representa um diagrama de energia, que resume as respectivas transições eletrônicas do UV-Vis e as transições vibracionais do infravermelho (IR) e do espalhamento Raman (discutidas a seguir).

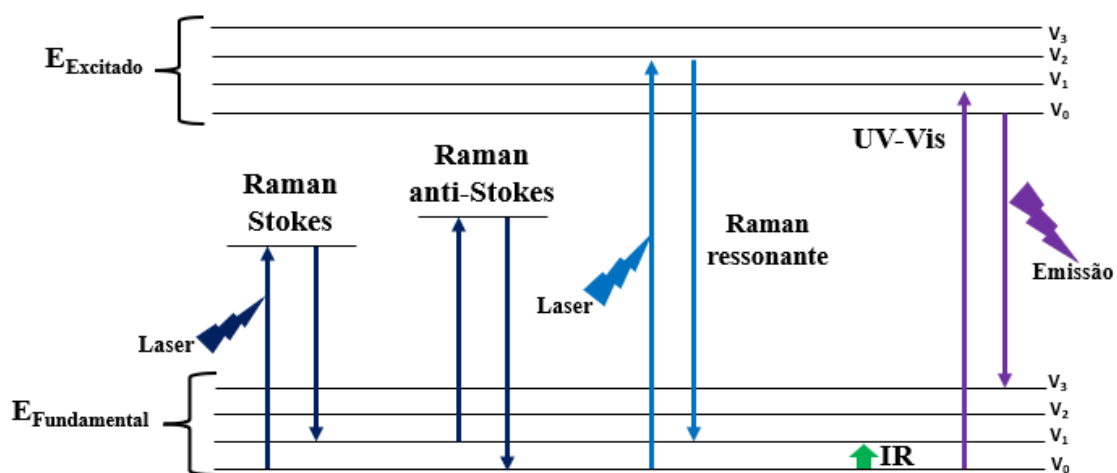


Figura 5: Diagrama de energia de diferentes transições de uma molécula considerando dois estados eletrônicos de energia.

O mecanismo de espectroscopia de absorção molecular é baseado na Lei de Beer-Lambert [39] descrita na Equação 3:

$$A = \log \frac{P_0}{P} = \epsilon bc \quad (3)$$

Onde **A** é a absorbância, **c** a concentração molar das moléculas envolvidas na medida, **P₀** é a intensidade da radiação incidente, **P** a intensidade da radiação após passar pela amostra de espessura **b** e **ε** o coeficiente de extinção. Esta lei demonstra a dependência linear entre a absorbância medida e a concentração de moléculas. Porém esta lei possui limitações, como ser utilizada com sucesso apenas para baixas concentrações de moléculas [39].

3.4. Espectroscopia Raman

O espalhamento Raman refere-se ao fenômeno óptico de espalhamento inelástico da luz ao interagir com a matéria, sofrendo uma variação de energia. Assim, a radiação incidente, geralmente no ultravioleta ou visível, é espalhada pela molécula com energia diferente da energia da radiação incidente. Essa mudança de energia é resultado da interação entre a radiação e as vibrações moleculares da substância em estudo e, portanto, fornece informações sobre os modos vibracionais da molécula [40]. Este processo deve

envolver uma variação da polarizabilidade da molécula pela radiação incidente. Conforme o modelo clássico, o espalhamento Raman está ligado com o momento de dipolo (p) induzido pela radiação incidente segundo o produto escalar (Equação 4) [41]:

$$p = \alpha \cdot E \quad (4)$$

sendo E o campo elétrico da radiação incidente e α a polarizabilidade molecular (notações tensoriais e vetoriais foram omitidas para simplificação). A polarizabilidade é dada pela Equação 5:

$$\alpha = \alpha_0 + \left. \frac{\partial \alpha}{\partial Q} \right|_0 \delta Q + \frac{1}{2} \left. \frac{\partial^2 \alpha}{\partial Q^2} \right|_0 \delta Q^2 + \dots \quad (5)$$

onde o primeiro termo (α_0) refere-se à polarizabilidade permanente, o segundo termo (primeira derivada em relação às coordenadas normais = α') é responsável pelo espalhamento Raman e o terceiro termo (segunda derivada em relação às coordenadas normais = α'') é responsável pela presença de frequências dobradas e combinações (*overtones e combinations*) [41].

Outra abordagem é que a incidência de radiação eletromagnética gera uma perturbação dependente do tempo, que é manifestado por um estado virtual de energia. Quando a frequência da radiação espalhada é menor que a da radiação incidente, tem-se o espalhamento Raman Stokes, e quando a frequência é maior do que a radiação incidente tem-se o espalhamento Raman anti-Stokes [41,42]. O espalhamento Raman Stokes é mais intenso que o anti-Stokes a temperatura ambiente, isso ocorre devido a maior probabilidade de se ocorrer o primeiro caso, pois, ele se dá para as moléculas situadas no estado fundamental de energia vibracional. Para o Raman anti-Stokes o espalhamento acontece para moléculas situadas em um estado vibracional excitado, que se encontra menos populado no estado fundamental a temperatura ambiente, tendo menor

probabilidade de acontecer. Quando os estados estacionários final e inicial são iguais, tem-se o espalhamento Rayleigh, onde as frequências das radiações incidentes são as mesmas, como demonstrado na Figura 6.

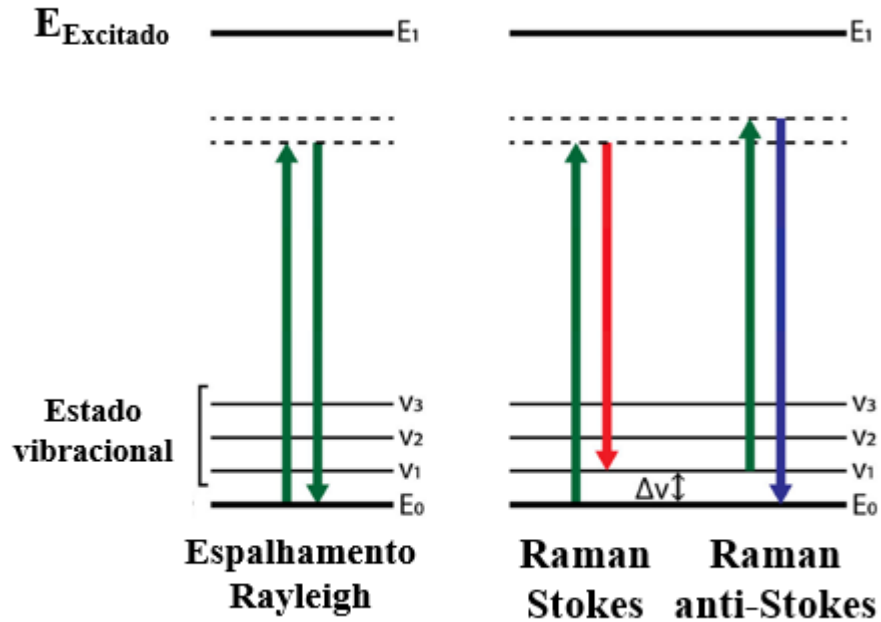


Figura 6: Digrama de energia para os espalhamentos Rayleigh, Raman-Stokes e Raman anti-Stokes.

Quando a energia da radiação incidente é igual ao necessário para uma transição eletrônica da molécula que espalha a luz, tem-se o espalhamento Raman ressonante, aumentando a probabilidade de uma transição que resultará em um espalhamento [43]. A intensidade do espalhamento Raman depende da intensidade do laser (I_{laser}), da frequência do laser incidente (ν) e da polarizabilidade da molécula, como demonstrado na Equação 6 [41,42].

$$I_{\text{Raman}} = I_{\text{laser}} \cdot \nu_{\text{laser}}^4 \cdot \alpha'^2 \quad (6)$$

3.5. Microscopia de força atômica (AFM)

A microscopia de força atômica (AFM, do inglês *Atomic Force Microscopy*) é um tipo de microscopia de varredura por sonda (SPM, do inglês *Scanning Probe Microscope*). O AFM foi desenvolvido por Gerd Binnig, Calvin Quate e Christoph Gerber em 1986 [44], com o intuito de se aprimorar as técnicas de varredura por sonda (STM, do inglês *Scanning Tunneling Microscope*), uma vez que o STM possuía um obstáculo de não se conseguir estudar os materiais não condutores e não rígidos [45].

O AFM utiliza as interações entre a superfície da amostra e a ponta de contato para realizar imagens e análises morfológicas das amostras [46, 47]. Estas interações ocorrem através de forças de *Van der Waals*, forças de atrito, eletrostáticas ou magnéticas, dependendo do tipo de material utilizado e da distância entre a ponta e a amostra [48]. A técnica fornece informações sobre a topografia do filme, com seus ordenamentos moleculares e também os defeitos da superfície, podendo ser medido a profundidade e altura e também saber a rugosidade do filme.

O equipamento é constituído por uma agulha, um sistema de detecção a laser do deslocamento da alavanca (também chamado de cantiléver), um sistema de controle e realimentação e também um sistema de varredura piezelétrico, como mostrado na Figura 7.

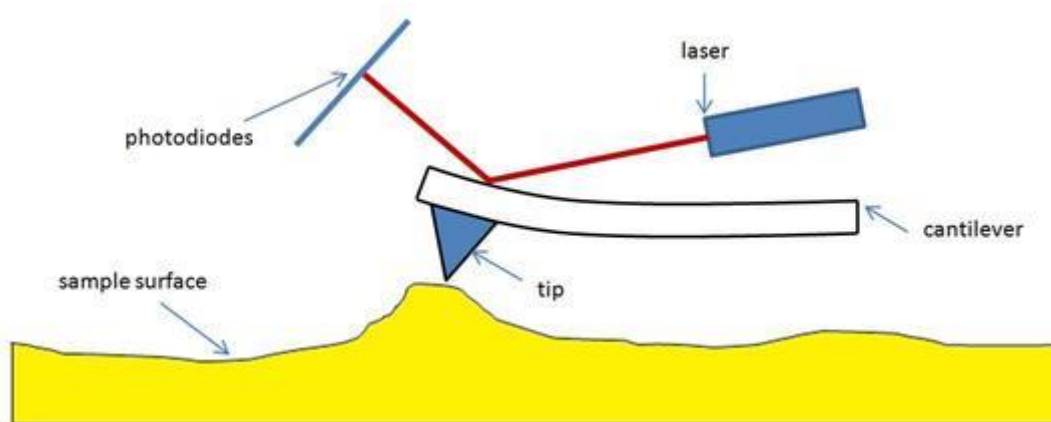


Figura 7: Ilustração do microscópio de força atômica (AFM) [49].

A junção do chip de suporte, da ponta e da alavanca é chamada de sonda. Ela é o elemento sensorial responsável pela interação com o material. Para uma boa medida de AFM é necessário utilizar a sonda correta para cada amostra. A Figura 8 mostra desde o chip de suporte até a ponta.

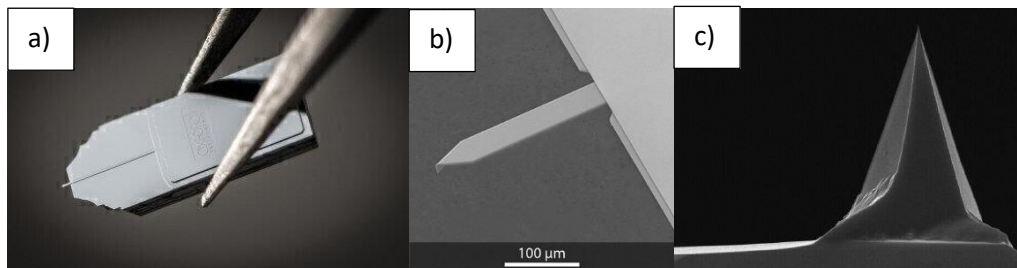


Figura 8: a) imagem de uma sonda; b) zoom da ponta da sonda, podendo observar a alavanca; c) zoom da alavanca, onde observa-se a ponta [50-52].

A ponta é responsável pelo mapeamento da superfície e a alavanca mede a força da interação da amostra com a ponta. A sonda possui vários formatos de ponta, como observado na Figura 9, e cada estilo possuem uma resolução mais alta ou baixa, pois a geometria da ponta influencia na imagem obtida pelo AFM.

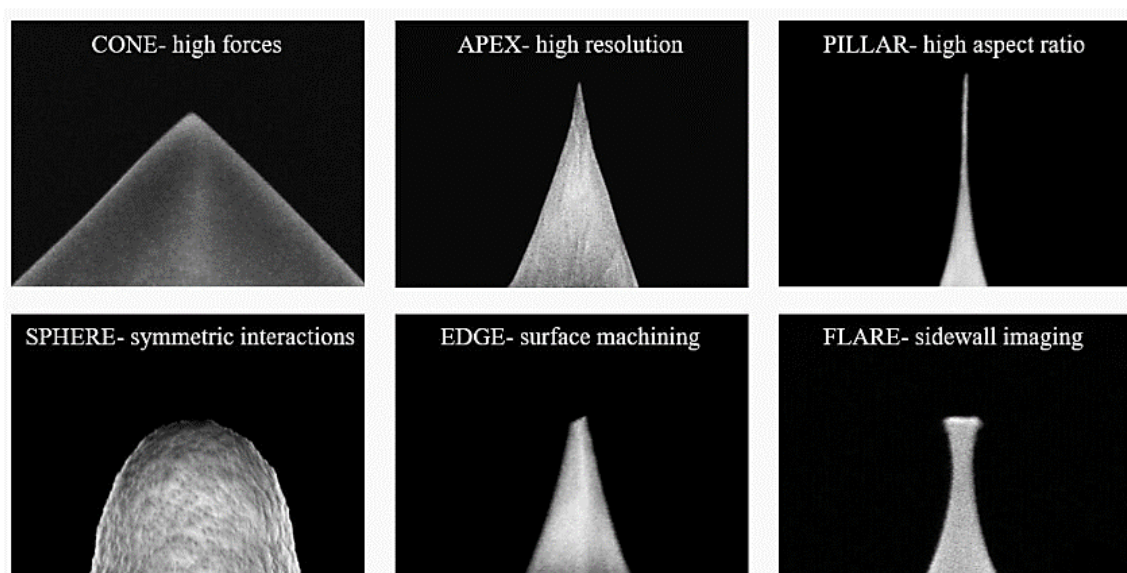


Figura 9: Diferentes geometrias de ponta de AFM, utilizadas para diferentes tipos de varredura ou amostras [53].

No sistema de varredura piezelétrico a escala micro e nanométrica desloca-se nas direções x, y e z, quando uma diferença de potencial é aplicada nas extremidades,

proporcionando assim uma imagem em três dimensões. Os principais métodos de operação de um microscópio de força atômica são os modos de contato, de contato intermitente (*tapping mode*) e não-contato. O método utilizado neste trabalho foi o de contato intermitente. Este modo opera entre o modo de contato e o de não-contato, pois ele oscila, hora tocando a amostra, hora não, de forma intermitente. Este modo é indicado para estudo de nanoestruturas fracamente presas ao substrato, polímeros, entre outros, pois não causa maiores danos a amostra, além disso consegue-se obter informações sobre heterogeneidade do material, podendo relevar detalhes da superfície as vezes não percebidas em outros modos.

3.6. Caracterizações Eletroquímicas

Métodos eletroanalíticos compõem uma classe de técnicas que estudam ou detectam um analito medindo a tensão elétrica e/ou a corrente elétrica em uma célula eletroquímica que o contém. Existem diversos métodos eletroanalíticos, classificados como métodos quantitativos e qualitativos [54]. A voltametria abrange um grupo de métodos eletroanalíticos, como a varredura linear, a onda quadrada, o pulso diferencial e a voltametria cíclica, as quais se diferem pela forma na qual o potencial é aplicado, e consequentemente na forma que o sinal analítico é adquirido, Figura 10. A voltametria é classificada como uma técnica dinâmica, pois ela é operada na presença de uma corrente elétrica [54]. A geração de corrente elétrica ocorre na região conhecida como dupla camada elétrica, localizada na interface eletrodo/solução.

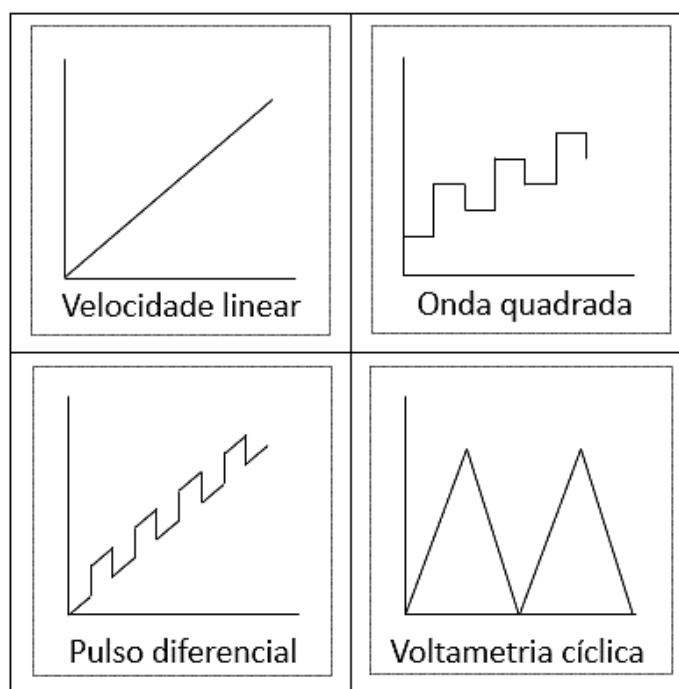


Figura 10: Tipos de voltametria para diferentes formas de potencial aplicado.

A voltametria se baseia em fenômenos que ocorrem na interface entre a superfície do eletrodo de trabalho e a solução da fina camada de solução junto à superfície eletródica. Geralmente utiliza-se uma célula eletroquímica convencional para realizar a voltametria. A célula consiste em três eletrodos, um auxiliar ou contra-eletrodo (EA), um de referência (ER) e um de trabalho (ET), todos imersos em uma solução eletrolítica, como demonstrado na Figura 11:

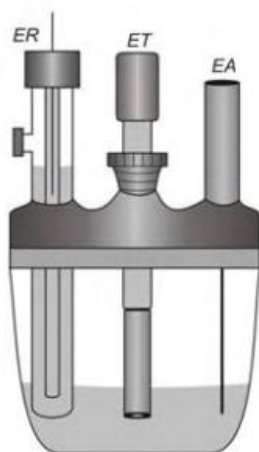


Figura 11: Representação esquemática de uma célula eletroquímica convencional, contendo o eletrodo de referência (ER), o eletrodo de trabalho (ET) e o eletrodo auxiliar (EA).

O eletrodo de referência não se polariza, mantendo assim o seu potencial constante, portanto o eletrodo permite que o potencial do eletrodo de trabalho seja monitorado. Os ER normalmente utilizados são os de calomelano ($\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2$) ou o de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl), ambos em contato com uma solução concentrada de cloreto de potássio (KCl). O $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ e o Ag/AgCl são usados pois possuem potenciais conhecidos, são reprodutíveis e são estáveis [55]. O eletrodo de trabalho é onde ocorre a reação eletródica, geralmente sendo uma pequena superfície inerte, como por exemplo o substrato de óxido de estanho dopado com índio (ITO). O ET pode ser composto também por ouro, platina, prata, mercúrio, diferentes tipos de carbono, como grafite ou pasta de carbono, entre outros [56]. O eletrodo auxiliar tem como função impedir que a corrente passe pelo eletrodo de referência, ou seja, a corrente passa entre o ET e o EA evitando assim que ocorra uma interferência no ER, possibilitando que seu potencial se mantenha constante durante as medidas. O EA pode ser de platina, carbono vítreo, entre outros. [56].

A solução eletrolítica, ou eletrólito suporte, é uma solução contendo uma quantidade de íons entre 10 e 100 vezes maior que a concentração da espécie eletroativa

de interesse na célula eletroquímica. A solução eletrolítica pode ser um ácido, um sal orgânico ou inorgânico, uma base ou uma solução tampão, e a concentração varia normalmente de 0,01M a 1,0 M. Algumas características básicas são necessárias para o eletrólito suporte, como ter alta solubilidade e um alto grau de ionização no solvente, além de apresentar estabilidade química, ou seja, não reagir com as outras espécies em solução, e ter estabilidade eletroquímica, não sendo oxidado e nem reduzido nas faixas de potencial de interesse [57]. Uma das funções do eletrólito suporte é manter os coeficientes de atividade das espécies eletroativas quase que constantes. Ele também possui como função diminuir a espessura da dupla camada elétrica, manter o coeficiente de difusão da espécie eletroativa constante e a viscosidade da solução também constante.

A voltametria cíclica (VC) está dentro da gama de análises da voltametria, Figura 10. Ela é obtida através de um sinal de excitação em forma de onda triangular. O potencial aplicado ao eletrodo de trabalho tem uma variação de forma linear, indo de um valor de potencial inicial E_i , podendo ser no sentido positivo ou negativo, até um potencial pré-estabelecido, o qual é denominado potencial de inversão de varredura E_f , onde a direção é invertida e o potencial volta ao E_i [54]. Os sinais registrados de corrente dão origem a um voltamograma, uma curva de potencial vs. corrente. A Figura 12 mostra a representação de um voltamograma, onde tem-se os picos de oxidação e redução.

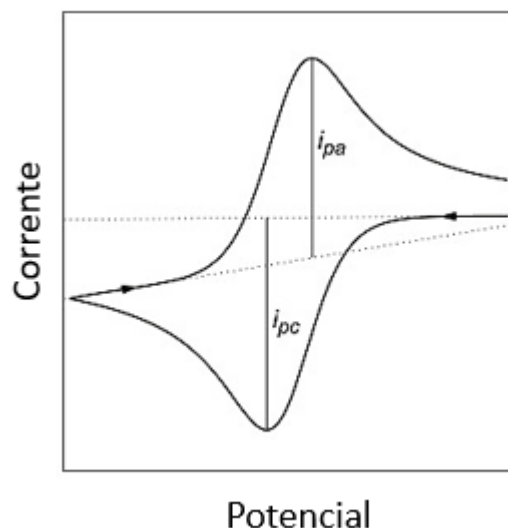


Figura 12: Representação de um voltamograma obtido por meio de voltametria cíclica. [54].

A voltametria de pulso diferencial, (DPV, do inglês *Differential Pulse Voltammetry*) também faz parte das técnicas de voltametria, Figura 10. Neste método, pulsos de potencial com amplitude fixa são aplicados ao eletrodo de trabalho, sobrepostos a uma rampa de potencial crescente. A corrente é medida em dois pontos consecutivos a cada pulso, sendo o primeiro pulso antes da aplicação e o segundo próximo do final do pulso, Figura 13, a). Assim a primeira corrente (contribuição da corrente capacitiva) é subtraída da segunda corrente, o qual é a contribuição da corrente faradaica, e a diferença destas correntes forma um voltamograma resultante (ΔI), de corrente em função do potencial aplicado, na forma de uma curva gaussiana, Figura 13, b). A altura do pico é dependente do pulso aplicado, e está relacionado com a concentração do material a ser estudado [59].

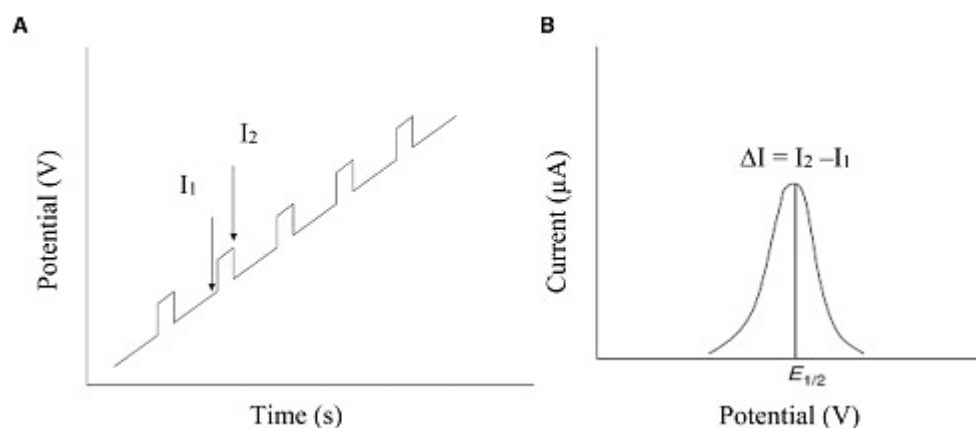


Figura 13: Representação a) da aplicação de potencial em função do tempo no DPV e b) de um voltamograma de pulso diferencial [60].

6. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste tópico estão descritos os materiais e métodos utilizados nos Capítulos 5 e 6 desta dissertação.

4.1. Reagentes e materiais

O fosfolípido zwitteriônico DPPC (1,2-Dipalmitoil-sn-3-Glicero-Fosfatidilcolina) foi adquirido da Avanti Polar Lipids Inc., e o azul de metileno (AM), $C_{16}H_{18}ClN_3S$, foi adquirido da Sigma-Aldrich co. As massas molares do DPPC e do AM são respectivamente 734,0 e 365,4 g/mol. A solução de DPPC foi realizada em clorofórmio, adquirido da Merck. As análises eletroquímicas foram realizadas em solução de KCl, Sigma-Aldrich, e possui massa molar de 74,55 g/mol. O teste de seletividade foi realizado com a quercetina (Sigma-Aldrich), $C_{15}H_{10}O_7$, cuja massa molar é de 302,236 g/mol. A solução de AM foi preparada com água ultrapura (sistema Milli-Q; resistividade 18.2 MΩ.cm). As estruturas químicas do DPPC, AM e quercetina estão representadas na Figura 11.

Para otimizar o desempenho das MIMs na detecção de azul de metileno foram necessários alguns ajustes na metodologia. Assim, foi utilizado o polieletrólito PAH (poli(hidrocloreto de alilamina)) a uma concentração de 1 mg/mL, solubilizado em água ultrapura como subfase. Sua estrutura química também está representada na Figura 14.

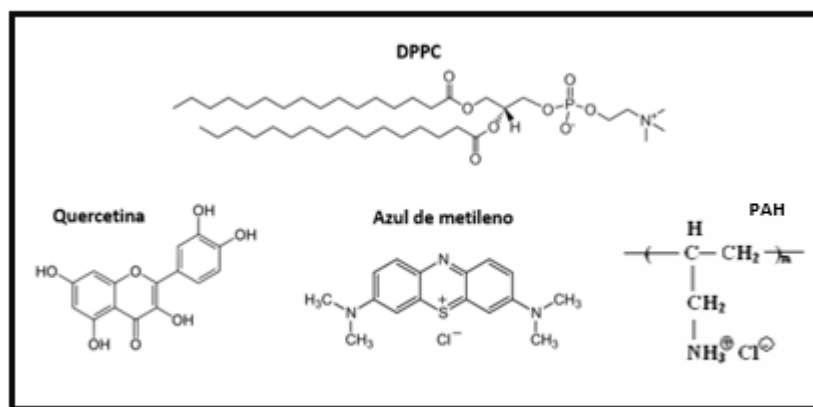


Figura 14: Representação esquemática da estrutura molecular do fosfolipídio DPPC, do corante azul de metileno, do polieletrólito PAH e do flavonoide quercetina.

4.2. Filmes de Langmuir

Os filmes de Langmuir foram fabricados em uma cuba de Langmuir KSV Nima modelo 2000. No Capítulo 5 são mostradas as isotermas de DPPC em subfase aquosa e do fosfolipídio na presença do azul de metileno na subfase, que foram obtidas em triplicatas. Os filmes foram obtidos espalhando-se 20uL da solução de DPPC, preparado em clorofórmio a uma concentração de 1×10^{-3} mol/L, e o azul de metileno foi utilizado na subfase aquosa a uma concentração de 1×10^{-4} mol/L. As isotermas π -A foram obtidas a 23 °C utilizando um sensor de pressão de Wilhelmy, com o sensor de fio de platina posicionado perpendicularmente às barreiras. As monocamadas foram comprimidas simetricamente, após 15 minutos de espera para a evaporação do solvente, a uma velocidade constante de 10 mm/min. Como já mencionado, todas as isotermas foram obtidas em triplicatas, porém na seção de resultados e discussão apenas uma isoterma será mostrada nas figuras, para facilitar a visualização.

No Capítulo 6 são mostradas as isotermas para o DPPC na presença do PAH na subfase aquosa, espalhando-se 20uL de solução do fosfolipídio na cuba. Os parâmetros utilizados foram os mesmos descritos para o Capítulo 5. Foram estudadas também as isotermas do DPPC+PAH+AM, onde foi adicionado 20uL de DPPC na interface ar-água

e o PAH (concentração de 1mg/mL) e o AM (concentração de 1×10^{-4} mol/L) foram adicionadas na subfase. Ambas as isotermas foram obtidas em triplicata.

4.2.1. Módulo compressional

O módulo compressional (C_s^{-1}) foi calculado a partir dos dados coletados das isotermas π -A de todos os casos analisados. Os valores de C_s^{-1} foram obtidos através da Equação 2, descrita na seção 3.1.1. Então, os gráficos foram obtidos plotando C_s^{-1} em função da pressão de superfície.

4.3. Langmuir-Schaefer (LS)

Filmes LS, contendo multicamadas, foram obtidos transferindo-se horizontalmente as monocamadas de Langmuir de DPPC e de DPPC na presença de AM da interface ar/água. Foram espalhadas 20 μ L de DPPC na subfase com e sem a presença do corante e realizou-se a compressão até a pressão de 30 mN/m, pois as membranas celulares possuem pressão lateral nesta faixa e pelas monocamadas terem estruturas organizadas e empacotadas [71]. Aguardou-se a estabilização do filme e foi feita a transferência de 3 monocamadas para cada substrato de ITO, o qual possuía uma área de 2 cm² cada um.

No Capítulo 6 são mostrados os resultados para os filmes fabricados utilizando os mesmos procedimentos descritos no Capítulo 5, porém agora utilizando o polieletrólito PAH na subfase aquosa. Os filmes estudados foram o de DPPC+PAH, com o PAH na subfase aquosa, e do DPPC+PAH+AM, com o PAH e o AM na subfase aquosa. A concentração de DPPC era de 1×10^{-3} mol/L, a de AM era de 1×10^{-4} mol/L e a de PAH era de 1 mg/mL.

4.4. Espectroscopia de absorção UV-Vis

Uma das técnicas utilizadas para a caracterização dos filmes finos foi a espectroscopia de absorção UV-Vis, onde utilizou-se um espectrofotômetro Varian modelo Cary 50 que opera na região de 190 a 1100 nm. Os espectros foram obtidos com uma taxa de varredura de 600 nm/min.

No Capítulo 5, para verificar a formação do MIM (remoção do AM do filme de DPPC), espectros de absorção UV-vis foram obtidos do filme de DPPC na presença de AM, e após sua remoção (após lavagem do filme). Espectros de referência foram obtidos de um filme de DPPC. Antes da obtenção dos espectros, uma linha de base foi feita com o substrato de ITO. A lavagem foi realizada em um béquer contendo água ultrapura, onde o substrato com o filme de DPPC+AM foi imerso por 1 minuto, 2 minutos, 3 minutos e 4 minutos. O tempo de 4 minutos foi o ideal para a remoção do corante do filme. A lavagem foi realizada em água ultrapura devido a solubilidade do AM no mesmo.

No Capítulo 6 o mesmo procedimento foi adotado para os filmes DPPC+PAH, DPPC+PAH+AM e MIM. O MIM na segunda parte do trabalho foi obtido a partir da remoção do corante do eletrodo utilizando a voltametria cíclica.

4.5. Espectroscopia Raman

Para o Capítulo 5 os filmes de DPPC, DPPC+AM e do MIM também foram caracterizados via espectroscopia micro-Raman. Os espectros foram obtidos utilizando um espectrógrafo Renishaw modelo in-Via acoplado a um microscópio óptico Leica (lente objetiva de 50x) e linha de laser de 633 nm com rede de difração de 1800 linhas/mm.

Para o Capítulo 6, utilizou-se dos mesmos parâmetros do Capítulo 5, porém os espectros foram obtidos para os filmes de DPPC+PAH+AM e para a MIM contendo o PAH.

4.6. Microscopia de Força Atômica (AFM)

As imagens de AFM foram obtidas em colaboração com o laboratório UVaSens, coordenado pela professora Maria Luz Rodríguez Méndez, na Universidade de Valladolid, na Espanha, através de um intercâmbio Capes Print. O equipamento utilizado foi o *Cypher ES Environmental AFM*, da marca *Oxford Instrument, Asylum Research*.

As imagens foram obtidas pelo modo *tapping mode* com tamanho de imagem de 20 μm . Os filmes para a obtenção das imagens foram depositados através da técnica LS, no substrato sólido de diamante dopado com boro (BDD, do inglês *Boron-Doped Diamond*). As imagens foram obtidas para os filmes de DPPC, DPPC+PAH, DPPC+PAH+AM e a MIM, além também para o substrato BDD. Foi obtido também a rugosidade de cada filme. O BDD foi previamente limpo antes da deposição dos filmes LS. Utilizou-se uma solução de ácido sulfúrico concentrado com peróxido de hidrogênio (proporção 3:1) para a limpeza do substrato.

A rugosidade são micro-irregularidades deixadas na superfície do material decorrentes ao processo de fabricação. Ela é quantificada por meio de parâmetros relacionados à altura (amplitude) e a largura (também chamados de espaçamentos) das irregularidades, podendo ser também uma combinação de ambos [61]. No caso do AFM utilizou-se o método de rugosidade média quadrática (R_q , do inglês *root mean square*), pois este é mais sensível a picos e vales, ou seja, amplitudes maiores tem peso maior no cálculo da rugosidade. Assim, o valor de R_q indica a amplitude média das irregularidades da superfície, e o mesmo também varia dependendo do comprimento da amostra, por causa disso todas as imagens possuem a mesma área. [61].

4.7. Caracterizações eletroquímicas

As análises eletroquímicas consistiram em voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial (DPV.) Ela foi realizada em uma célula eletroquímica convencional de

três eletrodos contendo um eletrodo de referência de Ag/AgCl (KCl 3 mol/L), um fio de platina como eletrodo auxiliar e o ITO modificado como eletrodo de trabalho. A célula foi conectada a um potenciostato/galvanostato μ -autolab tipo III (Metrohm/Pensalab) controlado pelo programa NOVA ou GPES 4.9.

Para as medidas de voltametria cíclica os eletrodos de ITO foram delimitados com área de 1,0 cm² com fita de parafina *Parafilm*. Os voltamogramas cíclicos foram obtidos primeiramente por meio de varreduras cíclicas entre -1,0 a +1,0 V vs. Ag/AgCl a velocidade de 50 mV/s em KCl a 0,1 mol/L (eletrólito suporte).

Para o Capítulo 5 foram realizados 10 ciclos para cada eletrodo testado (substratos de ITO puro ou modificados com filme). Posteriormente, realizou-se as voltametrias cíclicas em azul de metileno (contendo KCl 0,1 mol/L) com concentração de 60 μ M. As varreduras cíclicas de -0,8 a 0,0 V vs. Ag/AgCl foram realizadas com velocidade de 50 mV/s com. Foram realizadas também 10 ciclos em cada eletrodo.

Para os testes de detecção, foram realizadas sucessivas adições de 10 μ L de solução estoque de AM 10^{-5} mol/L em uma célula eletroquímica contendo 25 mL de solução de KCl 0,1 mol/L. Após cada injeção, a solução foi homogeneizada com agitação magnética moderada antes da obtenção da medida. O DPV foi realizado entre -0,6 e +0,2 V, com amplitude de pulso de 50 mV e *step* de 5 mV. As curvas de calibração foram construídas através de dados de DPV. Os gráficos foram obtidos utilizando linha de base. Curvas de calibração através de DPV foram obtidos para o substrato de ITO (referência) e para os substratos de ITO modificados com filmes de DPPC e MIM.

Para o Capítulo 6 as VC foram realizadas para os eletrodos de ITO/DPPC, ITO/DPPC+PAH+AM e ITO/MIM no intervalo de -1,0 V a +1,0 V. Para o ITO/DPPC foram realizados 10 ciclos em solução de KCl 0,1 mol/L, assim também para o ITO/DPPC+PAH+AM.

Para a obtenção da ITO/MIM foram realizadas inicialmente 10 ciclos de VC em KCl 0,1 mol/L e posteriormente obtido a DPV no intervalo de potencial de +0,6 V a +0,2 V. Posteriormente foram realizadas VC de 3 em 3 ciclos e o DPV após cada 3 ciclos da VC até que se tinha uma remoção total do AM do eletrodo, foram totalizadas em média 26 ciclos para cada eletrodo.

Para as análises de detecção do AM foi preparada uma solução de 1×10^{-6} mol/L do corante. O eletrodo ITO/MIM foi imerso nesta solução pelo tempo de 10 minutos inicialmente. Após o tempo o eletrodo foi lavado com solução de KCl 0,1 mol/L para retirar o excesso de AM que não se encaixaram nas cavidades do eletrodo. E por fim foram realizados 3 ciclos em VC do eletrodo e posteriormente o DPV para verificar a presença de AM no eletrodo. O processo se repetiu para os tempos de 20 e 30 minutos imersos na solução de AM.

4.8. Limite de Detecção

O limite de detecção foi calculado para o eletrodo de ITO/MIM seguindo o seguinte procedimento: inicialmente, a DPV do ITO/MIM em eletrólito inerte (branco) foi obtida (10 medidas) para a obtenção do desvio padrão. Posteriormente o eletrodo foi imerso em um béquer contendo soluções de AM de diferentes concentrações (de 4×10^{-7} até 1×10^{-6} mol/L). O tempo de imersão foi de 20 minutos para cada concentração, e após o tempo determinado, o eletrodo era lavado com KCl para que todo o AM que não tivesse entrado nas cavidades da MIM fosse removido. Posteriormente, foi realizado a DPV, de +0,6 V a +0,2 V. Todas as concentrações foram realizadas para o mesmo eletrodo contendo a MIM. Após o DPV de cada concentração, o eletrodo era ciclado mais 3 vezes na VC antes de ser realizado a imersão na próxima concentração.

O experimento foi realizado em triplicata (três eletrodos independentes), e foi obtido assim a curva de calibração e o erro da triplicata. Por fim, usando o desvio padrão

do branco (ITO/MIM antes da imersão em AM) e a regressão linear da curva de calibração, foi obtido o limite de detecção utilizando o cálculo de $3SD/slope$, onde SD é o desvio padrão e o *slope* é a regressão linear [62].

4.9. Teste de seletividade

O teste de seletividade inicial, para a MIM sem PAH (Capítulo 1) foi realizado com a quercetina a uma concentração de $60\mu\text{M}$ contendo KCl $0,1\text{ mol/L}$. Foram realizados três ciclos de VC para o ITO, o ITO/DPPC e o ITO/MIM. Os voltamogramas foram obtidos no intervalo de potencial $-1,0$ a $1,0\text{ V vs Ag/AgCl}$, com velocidade de varredura de 50 mV/s .

Para a MIM contendo PAH (Capítulo 2), o teste também foi realizado com a quercetina, porém a uma concentração de $1 \times 10^{-6}\text{ mol/L}$. Inicialmente foi realizado uma voltametria cíclica e o DPV para o ITO em uma solução de quercetina ($1 \times 10^{-6}\text{ mol/L}$), contendo KCl $0,1\text{ mol/L}$, a fim de confirmar os picos de oxidação e redução do flavonoide.

Posteriormente foi realizado a imersão do eletrodo ITO/MIM em uma solução de quercetina ($1 \times 10^{-6}\text{ mol/L}$) por 20 minutos. Após este tempo o eletrodo foi lavado com uma solução de KCl $0,1\text{ mol/L}$, a fim de se retirar o excesso de quercetina que supostamente não estraram nas cavidades da MIM de AM. Por fim o eletrodo foi submetido a 3 ciclos de voltametria cíclica e ao DPV posteriormente, para observar se algum pico referente ao flavonoide foi apresentado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 - REALIZAÇÃO DA MIM SEM O PAH.

5.1. Filmes de Langmuir

Na Figura 15 estão representadas as isotermas π -A para o DPPC puro em subfase aquosa e de DPPC na presença do AM na subfase, todas realizadas à temperatura ambiente (23°C) e em triplicata. A concentração de DPPC da solução espalhada na interface foi de 1×10^{-3} mol/L enquanto a concentração do azul de metileno na subfase foi de 1×10^{-4} mol/L.

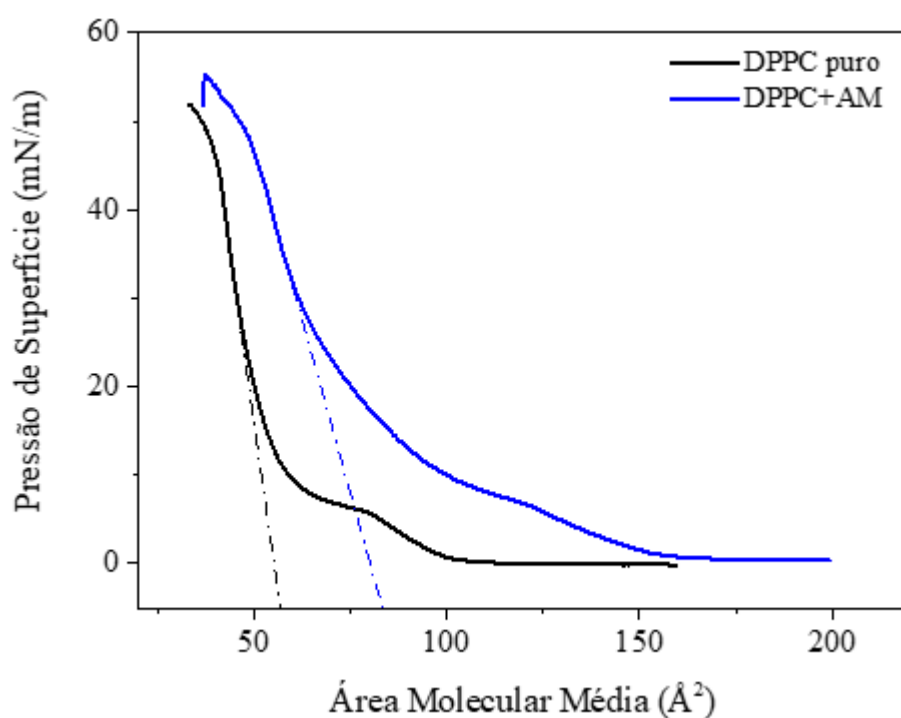


Figura 15: Isotermas π -A de DPPC puro em subfase aquosa e na presença do AM na subfase (1×10^{-4} mol/L), obtidas à temperatura ambiente. As linhas pontilhadas extrapoladas até o eixo x indicam a área molecular média.

Para a isoterma π -A de DPPC em subfase aquosa tem-se um resultado próximo ao encontrado na literatura [25,63,64] onde a área extrapolada está em 56 Å^2 , e na pressão de 30 mN/m , o valor de área aproximada é de 45 Å^2 . Observa-se também a presença bem definida das fases gasosa, líquido-expandida e líquido-condensada, também reportadas na literatura [65,63].

Na presença do azul de metileno observou-se um deslocamento na isoterma de DPPC para maior área em relação ao fosfolípido puro. O início da fase líquido expandida,

quando as moléculas do fosfolipídio ainda não estão empacotadas, se deslocou de aproximadamente $100 \text{ \AA}^2$ para $160 \text{ \AA}^2$, tendo uma porcentagem de deslocamento de 60%. Quando a isoterma atinge a fase condensada da monocamada o deslocamento diminui, onde a porcentagem de deslocamento na pressão de 30 mN/m é de 31,98%. Esse deslocamento indica que o AM está interagindo com o DPPC na fase líquido-expandida, tendendo manter o corante na interface da monocamada, porém na pressão de 30 mN/m esta interação é menor, tendo assim a porcentagem de deslocamento menor [66,67]. Porém, o empacotamento da monocamada de fosfolipídio não foi capaz de expulsar o corante da interface ar-água. Isto ocorreu devido as interações eletrostáticas entre o DPPC, zwitteriônico, e o AM, que é catiônico.

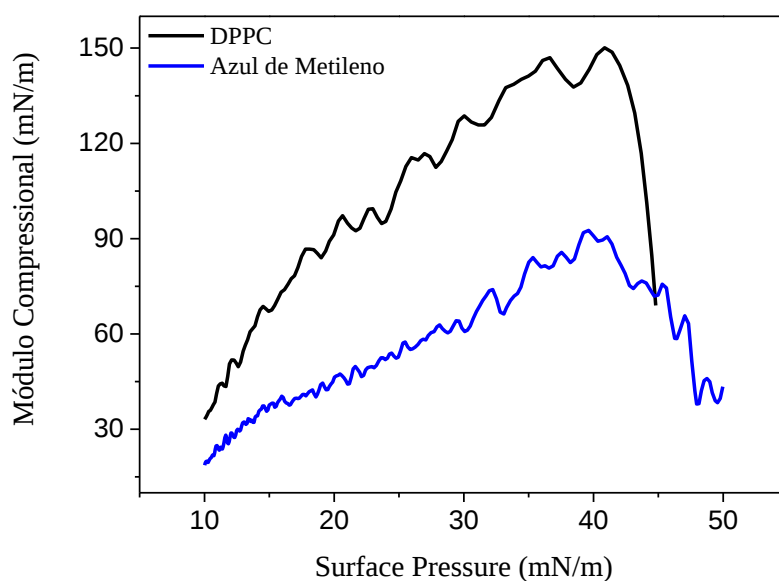


Figura 16: Gráfico de módulo compressional por pressão de superfície do DPPC em subfase aquosa e na presença do AM.

Nos resultados de módulos compressoriais, Figura 16, o DPPC em subfase aquosa apresentou um resultado similar ao reportado na literatura, com valor obtido de 128 mN/m , em pressão de 30 mN/m , sendo este dentro da faixa de fase líquido-condensada referente ao intervalo de C_s^{-1} entre 100 e 250 mN/m [35]. Porém, na presença do AM, a

monocamada não atingiu a fase líquido-condensada, obtendo um valor de 61 mN/m, em pressão de 30 mN/m, indicativo de um aumento na fluidez da monocamada, não permitindo que o empacotamento dos fosfolípidios conseguisse expulsar o corante da interface. Quando comparados com a literatura, o AM na subfase também deixa mais fluída a monocamada de DPPC, como demonstrado em Maximino *et al* (2019) [68].

5.2. Langmuir-Schaefer (LS)

A técnica de LS foi utilizada para a deposição dos filmes de DPPC puro e DPPC na presença de azul de metileno em substrato condutor (ITO). Foram depositadas três camadas de filme em cada substrato, mantendo-se a pressão de superfície constante e igual a 30 mN/m. A Figura 17 ilustra os gráficos de área entre as barreiras em função do tempo durante a transferência das monocamadas de (a) ITO/DPPC e (b) ITO/DPPC+MB. Por se tratar de um fosfolípido zwitteriônico, o DPPC possui parte de sua estrutura com carga positiva e parte negativa, deixando a molécula neutra. Esse fato acaba sendo um limitante na quantidade de camadas que podem ser depositadas sobre o mesmo substrato [69,70].

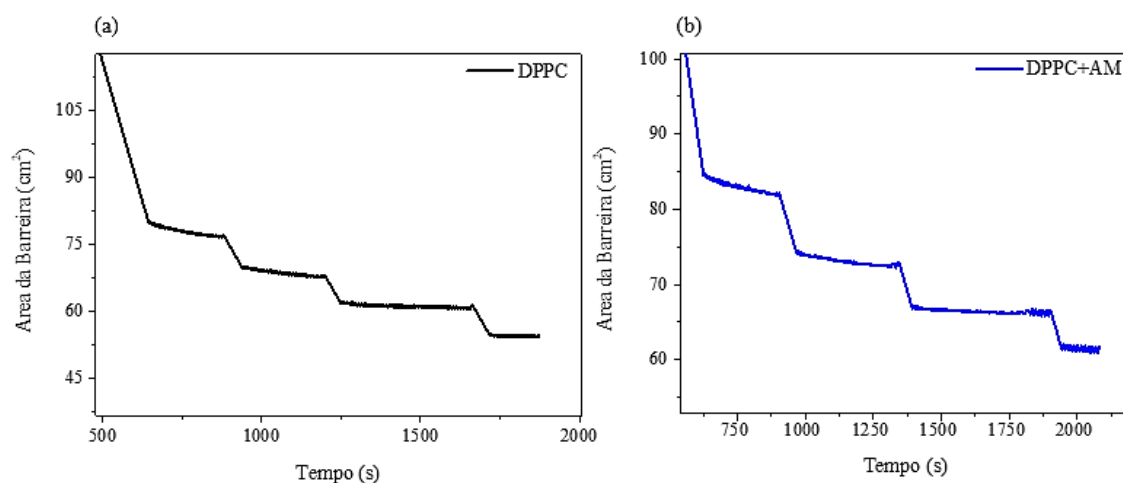


Figura 17: Acompanhamento da deposição dos filmes LS das monocamadas de (a) ITO/DPPC (1×10^{-3} mol/L) e (b) ITO/DPPC+AM (1×10^{-4} mol/L) na subfase aquosa. Os

gráficos mostram a variação da área entre as barreiras móveis da cuba pelo tempo a uma pressão de superfície.

As deposições ocorreram em pressão de superfície fixa de 30 mN/m, pois nessa pressão as monocamadas possuem a estrutura altamente organizada e empacotada (fase condensada). Além disso, as membranas celulares, a qual procuramos mimetizar, possuem pressão lateral em torno de 30 mN/m [71]. A deposição das duas primeiras camadas de DPPC puro ocorreu uma variação de área de 6 cm² com relação à área da barreira, enquanto a última camada causou uma variação um pouco maior, de 11 cm². Considerando que as deposições foram realizadas em três substratos de ITO, cada uma com 2 cm², o esperado para uma deposição completa seria a perda de uma área total de 6 cm². Portanto, as duas primeiras deposições da monocamada de DPPC puro estão dentro do esperado, enquanto a última deposição foi acompanhada de alguma perda adicional de material.

Já para o fosfolípido na presença do AM as deposições da primeira, segunda e terceira camadas causaram variações de 5, 6 e 7 cm², respectivamente. Assim tem-se que a variação da área das barreiras durante a deposição via LS dos filmes foi relativamente constante e de acordo com o esperado, uma vez que os substratos utilizados tinham a mesma área, 6 cm² no total.

5.3. Espectroscopia de absorção UV-Vis

Espectros de absorção UV-Vis foram obtidos dos filmes de ITO/DPPC, ITO/DPPC+AM e DPPC+AM após lavagem para remoção do AM (ITO/MIM), como mostrado na Figura 18. Todos os espectros foram obtidos em triplicatas

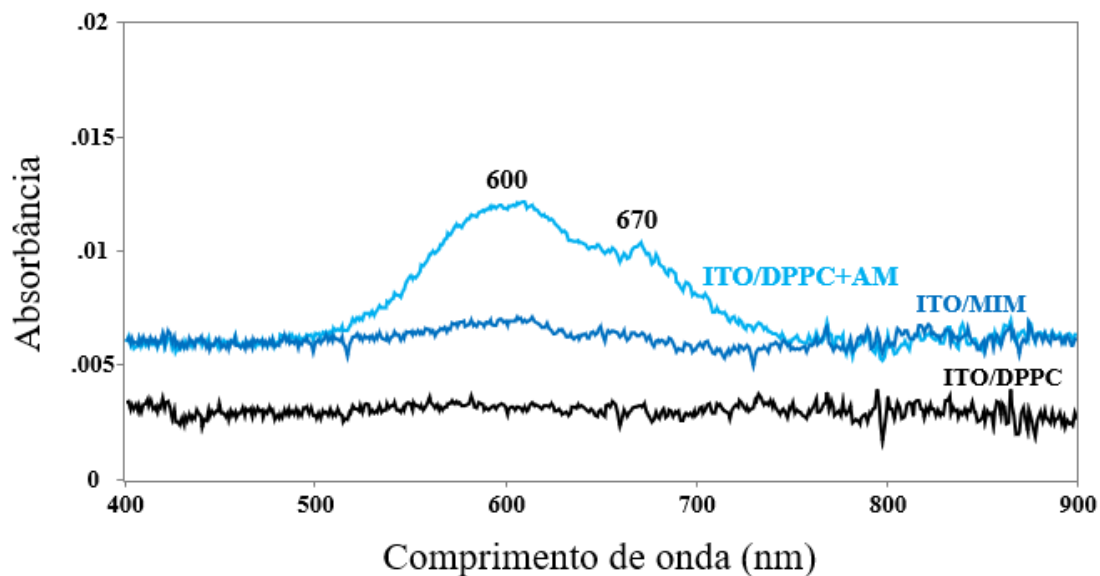


Figura 18: Espectros de absorção UV-Vis dos filmes LS de ITO/DPPC, ITO/DPPC+AM e ITO/MIM.

O espectro de DPPC puro não apresentou nenhuma banda na faixa de comprimentos de onda estudada, de 400 a 900 nm, como esperado de acordo com a literatura, onde o fosfolípido apresenta banda apenas em torno de 200-275 nm [72]. Para o filme de fosfolípido com o azul de metileno obteve-se as bandas de 600 nm e 670 nm, referentes aos processos de absorção do corante. *Nicolai e Rubim* (2003) [73] citam que as bandas de 670 nm e 600 nm são atribuídas as transições $\pi-\pi^*$ de monômeros e dímeros, respectivamente, evidenciando a presença do AM no filme ITO/DPPC+AM.

Para verificar a remoção do AM do filme de ITO/DPPC+AM e possível formação do MIM, o filme foi submetido a uma lavagem por imersão em água ultrapura por 4 minutos. As bandas referentes ao AM, antes presentes no espectro do filme ITO/DPPC+AM, desapareceram significativamente. Isso demonstra a remoção do AM do filme, sendo um passo importante para a concretização da MIM, onde retira-se o material alvo do filme, deixando apenas a impressão dos mesmos para futuras aplicações [74].

5.4. Espectroscopia Raman

Os espectros Raman ilustrados na Figura 19 foram obtidos utilizando-se a linha de laser em 633 nm. Esta caracterização foi realizada para verificar, por meio dos modos vibracionais das moléculas presentes nos filmes, a presença do AM nos filmes de ITO/DPPC+AM, e também qual a composição dos filmes de ITO/MIM.

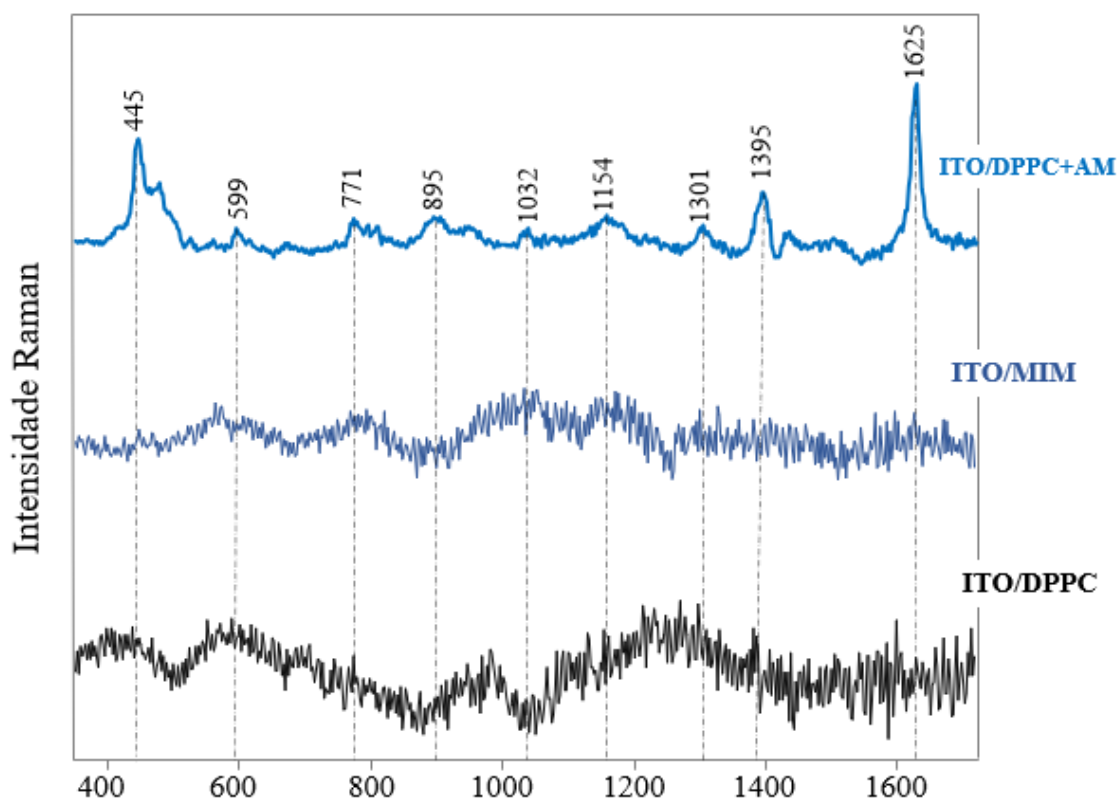


Figura 19: Espectros Raman, com linha de laser 633, dos filmes contendo 3 camadas de ITO/DPPC+AM, ITO/MIM e de ITO/DPPC.

Na Figura 19 tem-se os espectros Raman para os três tipos de filmes. O ITO/DPPC+AM possui as bandas características para o corante, pois se comparados ao do ITO/DPPC, a do fosfolípido não apresenta bandas entre 400 e 1600 cm^{-1} , mas sim a partir de 2800 cm^{-1} [75]. Os espectros característicos do AM obtidos estão de acordo com a literatura [76,77] e as atribuições das bandas também estão representadas na Tabela 1.

Tabela 1: Atribuições das bandas Raman para o filme de ITO/DPPC + AM [70,76].

Raman experimental (cm⁻¹)	Atribuição
445	Deformação esqueleto CN
599	Deformação esqueleto CC
771	Deformação angular CH no plano
895	Deformação angular CH no plano
1032	CS estiramento antissimétrico, Deformação angular CH no plano
1154	Deformação angular CH no plano
1301	Deformação do anel no plano de CH
1395	Estiramento simétrico CN
1625	Estiramento CC do anel

Após a lavagem dos filmes ITO/DPPC+AM, observou-se o desaparecimento das bandas características do AM, indicando a remoção do corante do filme, sugerindo assim a formação da MIM nos filmes.

5.5. Caracterização eletroquímica

Para a caracterização eletroquímica inicialmente foram realizadas análises de voltametria cíclica (VC) em solução de KCl 0,1 mol/L, como mostra a Figura 20, onde tem-se o voltamograma a) de -1,0 a +1,0 V e b) um recorte do intervalo de -0,4 a +0,3 V, com velocidade de varredura (v) de 50 mV/s. A voltametria foi realizada para os substratos de ITO e para os modificados com os filmes contendo 3 camadas de DPPC, DPPC+AM e para o ITO/MIM. A análise foi realizada para estudar os comportamentos eletroquímico dos filmes e para verificar a formação da MIM no substrato.

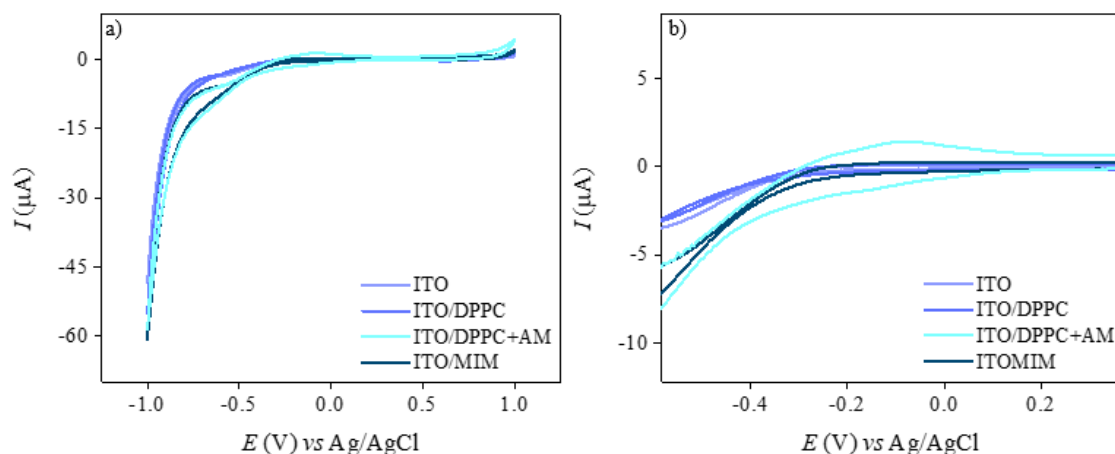


Figura 20: Voltamogramas cíclicos dos filmes de ITO/DPPC, ITO/DPPC+AM e ITO/MIM, obtidos em solução de KCl 0,1 mol/L, a) de -1,0 a +1,0 V e b) um recorte do intervalo de -0,4 a +0,3 V. $v = 50$ mV/s.

A voltametria foi realizada em 10 ciclos de potenciais para cada filme. A Figura 20 b) é a aproximação de onde estão os picos de oxidação e redução do AM. Em b) observa-se que o ITO/DPPC não possui atividade eletroquímica, também reportado na literatura, portanto não possui picos de oxidação ou redução, tendo um comportamento semelhante ao ITO sem filme depositado [78]. O eletrodo de ITO/DPPC+AM apresentou pico de oxidação em -0,08 V e um pico de redução em -0,156 V. Pela quantidade de camadas de DPPC/AM ser pequena (apenas 3 camadas) os processos anódicos e catódicos possuem valores discretos de corrente. Após a lavagem do filme de ITO/DPPC+AM, o par redox do filme de ITO/MIM desapareceu, ficando com um perfil próximo aos de ITO/DPPC e de ITO, demonstrando, assim como nas caracterizações de UV-Vis e Raman, que o AM foi retirado do filme, deixando provavelmente a sua impressão molecular.

Um fator que sugere a formação das MIM é o fato de que o perfil do voltamograma do filme lavado ser igual, porém sem os processos anódicos e catódicos, do filme com a presença do AM, demonstrando que o filme com o ITO/MIM não possui mais o corante na sua interface, contendo apenas DPPC. Entretanto o perfil do ITO/MIM não é igual ao do ITO/DPPC, possuindo uma resposta eletroquímica diferente entre os filmes.

Posteriormente, foram realizadas as voltametrias cíclicas em solução de AM, 60 $\mu\text{mol/L}$, com KCl 0,1M presente na solução. Primeiramente, precisa-se mencionar o mecanismo de redução do AM, o qual se dá por duas transferências sucessivas de um elétron, também conhecido como mecanismo ECE (do inglês, *electron-transfer, chemical-reaction, electron-transfer*), como demonstrado na Figura 21. Basicamente o AM^+ é reduzido, gerando o radical ($\text{HMB}^{\bullet+}$) e o azul de leuco-metileno (LMB, do inglês *leucomethylene blue*), com uma rápida transferência de prótons entre eles [79,85].

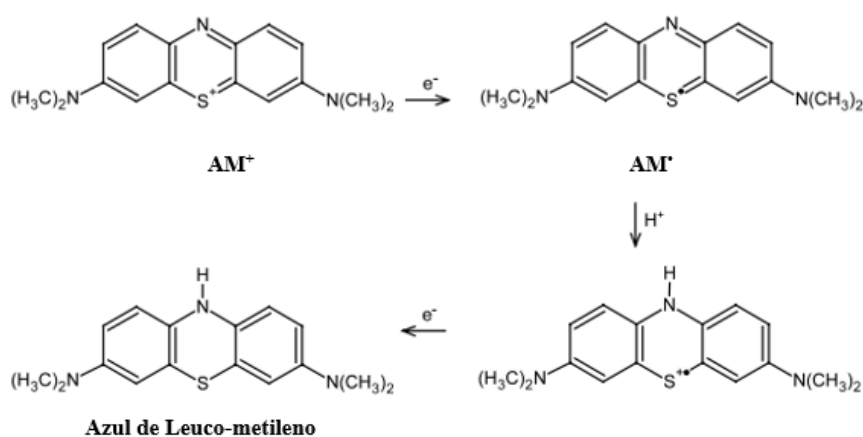


Figura 21: Esquema do mecanismo de redução do azul de metileno.

Sabe-se também que para voltametrias cíclicas de compostos que possuem mecanismos ECE, é esperado dois pares redox, porém, como mostrados na Figura 22 apenas um par foi observado. Este resultado também está de acordo com a literatura, como demonstrado em Aléssio P. *et al* [85]. Isto ocorre devido a rápida transferência de elétrons na interface entre a solução aquosa e o substrato.

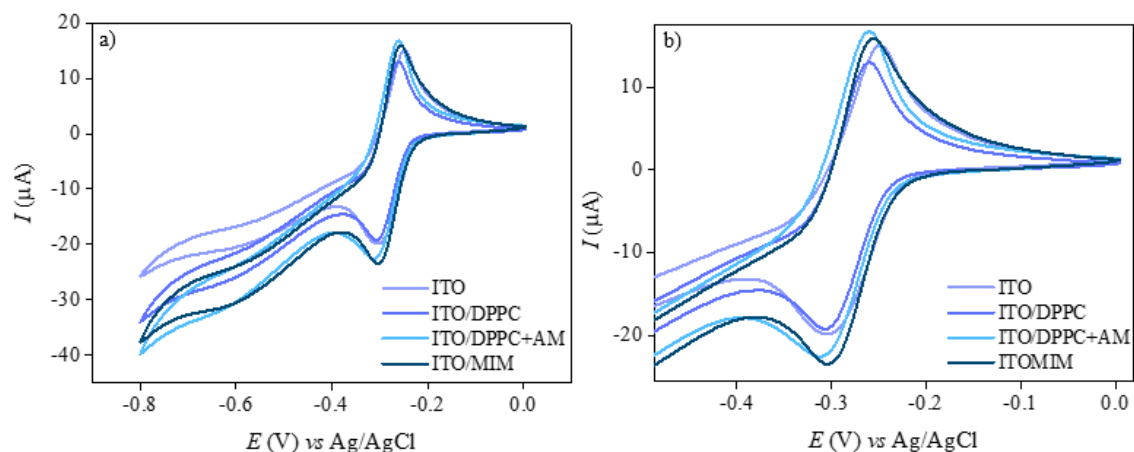


Figura 22: Voltamogramas cíclicos dos filmes de ITO/DPPC, ITO/DPPC+AM e da ITO/MIM, obtidos em solução de azul de metileno $60\mu\text{mol/L}$ com $\text{KCl } 0,1 \text{ mol/L}$, a) de $-0,8$ a $0,0 \text{ V}$ e b) um recorte do intervalo de $-0,5$ a $0,0 \text{ V}$. $v = 50 \text{ mV/s}$.

A Figura 22 b) mostra a aproximação do voltamograma a) para melhor visualização. O pico de oxidação do AM ocorreu em potencial igual a $-0,24 \text{ V}$ através do substrato de ITO não modificado, enquanto o pico de redução ocorreu em potencial igual a $-0,30 \text{ V}$, valores condizentes com a literatura [79]. Atribui-se para o processo anódico a oxidação do cátion radical para o AM^+ , e para o processo catódico a redução do AM^+ para o cátion radical [79]. O voltamograma cíclico do filme de ITO/DPPC apresentou apenas os picos de oxirredução do AM da solução, um pico de oxidação em $-0,26 \text{ V}$ e de redução em $-0,30 \text{ V}$. Porém, o filme de ITO/DPPC agiu como uma barreira isolante para os AM presentes na solução, e os picos de oxidação e redução foram menos intensos que no ITO.

O voltamograma cíclico do ITO/DPPC+AM apresentou pico de oxidação em $-0,26 \text{ V}$, e o de redução em $-0,31 \text{ V}$, coincidindo também com os processos característicos do AM [79]. A diferença é que a intensidade do par redox do AM é maior do que aqueles observados para o ITO e ITO/DPPC. Isso devido ao eletrodo ITO/DPPC+AM já possuir AM na sua interface, que somado ao AM da solução, produziu uma intensidade maior de corrente oriunda dos processos anódicos e catódicos.

Por fim, a voltametria cíclica do ITO/MIM indicou o pico de oxidação em -0,25 V e o de redução em -0,30 V. Como já visto nas voltametrias em KCl e nas caracterizações de Raman e UV-Vis, após a lavagem em água Milli-Q, o azul de metileno foi retirado do filme, ficando apenas suas impressões moleculares. Assim, quando realizadas as voltametrias na presença do AM, é provável que essas moléculas de corante se encaixaram nesses MIM's, fazendo com que a intensidade da corrente dos picos do processo redox fosse maior que os do ITO/DPPC e ITO, sendo um resultado diferente do mostrado na VC em KCl, o qual quando retirado o AM do filme os picos de oxidação e redução do ITO/MIM desapareceram.

5.6. Voltametria de Pulso Diferencial (DPV)

O estudo de DPV foi realizado com os substratos de ITO e modificados com os filmes de DPPC e MIM com o intuito de quantificar o AM através dos diferentes eletrodos. As curvas de DPV foram obtidas no intervalo de -0,6 a +0,2 V, e posteriormente, foi obtida a curva de calibração, de corrente *vs* concentração para os diferentes filmes. A Figura 23 ilustra os gráficos de DPV a) do ITO, b) do ITO/DPPC e c) do ITO/MIM e d) as curvas de calibração de todos os filmes. As concentrações de AM foram variadas de 4×10^{-9} a 6×10^{-8} mol/L.

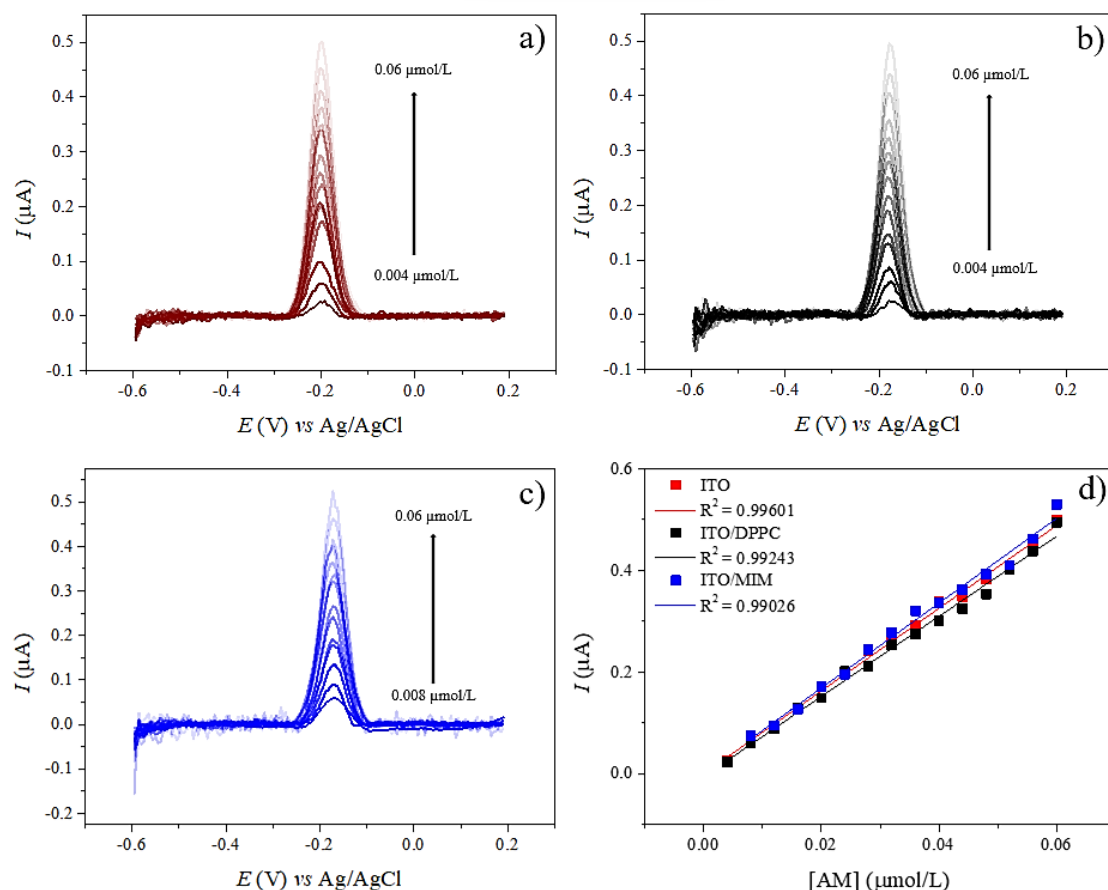


Figura 23: Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com: a) ITO, b) ITO/DPPC, c) ITO/MIM variando-se a concentração de $4 \times 10^{-9} - 6 \times 10^{-8}$ mol/L, e d) as curvas de calibração obtidas através de DPV para os três filmes. $v = 50$ mV/s

Com base no DPV observou-se a presença de apenas um pico característico do AM em todos os filmes [80]. Este pico é referente à oxidação do cátion radical para o AM^+ [79]. A curva de calibração demonstrou um comportamento bastante semelhante entre todos os filmes. Porém baseado na Figura 24, em baixas concentrações, pode ser observada uma diferença de corrente entre os eletrodos. O pico do AM obtido em ITO/MIM está em um potencial menos negativo quando comparado ao eletrodo não modificado de ITO e ao ITO/DPPC. Esse efeito, que pode ser oriundo da impressão molecular, deverá ser investigada mais profundamente.

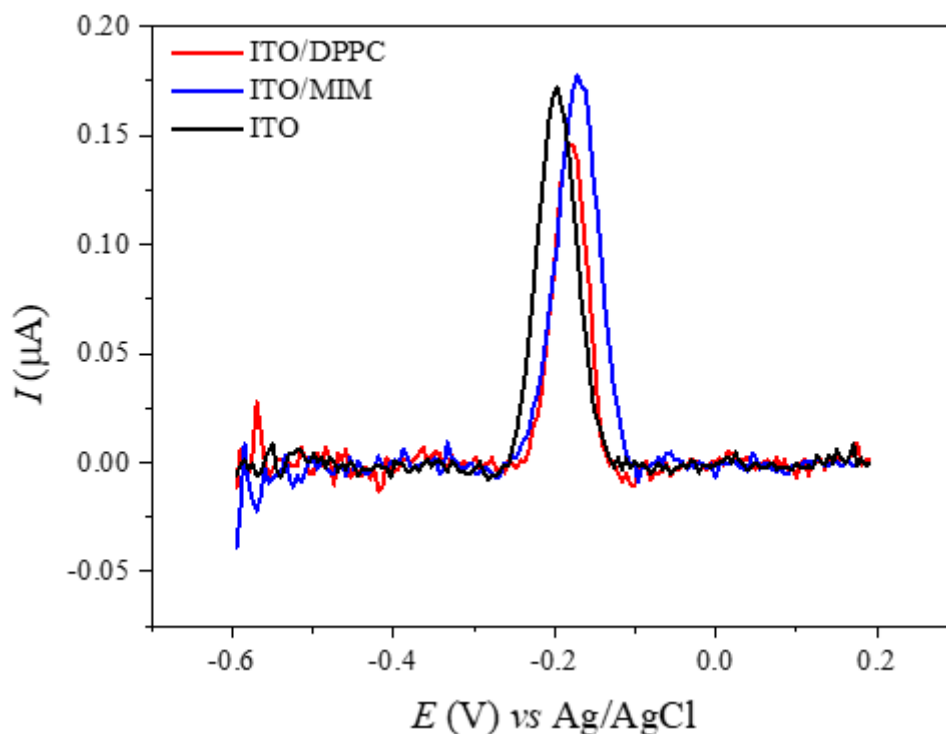


Figura 24: Comparação dos voltamogramas de pulso diferencial do ITO, ITO/DPPC e ITO/MIM para a concentração de $2,0 \times 10^{-8}$ mol/L.

5.7. Teste de seletividade

O teste de seletividade foi realizado com a quercetina, um flavonoide presente em frutas e vegetais, o qual possui diversas atividades farmacológicas, como ação anti-inflamatória, antiviral, entre outros [81,82], e possui processos redox em uma janela de potenciais próxima ao do MB. As medidas foram realizadas através da voltametria cíclica, com a solução de quercetina a $60 \mu\text{M}$, para o substrato de ITO e os eletrodos de ITO/DPPC e o ITO/MIM. A Figura 25 mostra os voltamogramas obtidos para os filmes na presença do flavonoide, no intervalo de -1,0 a 1,0 V.

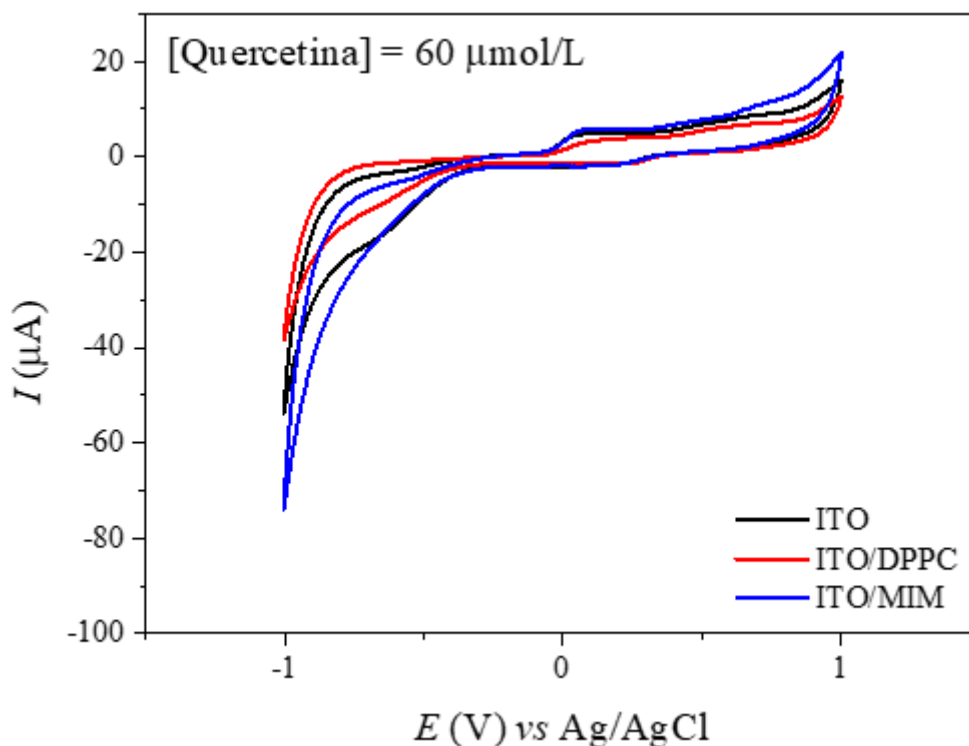


Figura 25: Voltamogramas cíclicos do ITO, do ITO/DPPC e do ITO/MIM obtidos em solução de quercetina (60 μM). $v = 50 \text{ mV/s}$.

Os voltamogramas apresentam o pico de oxidação referente a quercetina no valor de +0,06 V para o ITO e +0,08 V para o ITO/DPPC e o ITO/MIM. Além de apresentar também o pico de redução em +0,22 V para o ITO e o ITO/MIM, e +0,25 V para o ITO/DPPC. Os picos obtidos estão de acordo com a literatura, na qual o par redox corresponde a transformação da quercetina (QH_2) para a forma oxidada da quercetina (Q) e vice e versa, como demonstrado na Figura 26 [83, 84]. A resposta do ITO e do ITO/DPPC estão de acordo com o esperado, uma vez que a característica isolante do DPPC prejudica a transferência de carga, o ITO não modificado possui uma resposta eletroquímica superior do que na presença do DPPC. Porém, esperava-se que o ITO/MIM apresentasse uma resposta eletroquímica parecida com a do ITO/DPPC, uma vez que o MIM deveria conter as cavidades referentes à impressão molecular do AM, e ter a parte recoberta do filme de DPPC. Porém o sinal do flavonoide aumentou no ITO/MIM,

indicando uma possível adsorção da quercetina no MIM, tendo como hipótese que a rugosidade do filme melhorou a adsorção do interferente no filme.

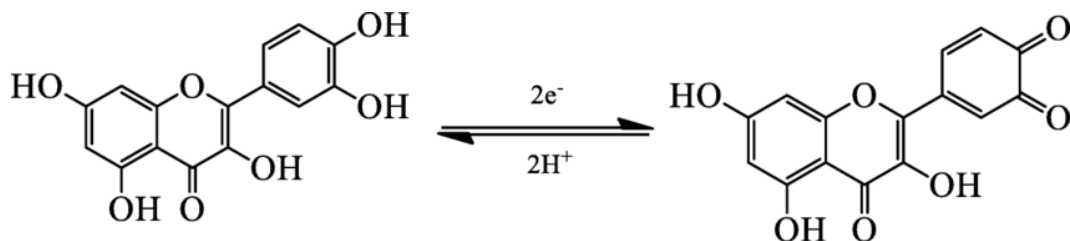


Figura 26: Esquema do mecanismo de oxidação da quercetina [84].

Estes resultados e os demonstrados por DPV mostram que o eletrodo ITO/MIM não possuiu uma boa seletividade e nem uma boa sensibilidade, característica de sensores à base de impressões moleculares, como demonstrados na Introdução deste trabalho. Assim, não foi possível assegurar a formação das MIM's no filme, uma vez que as caracterizações de UV-Vis, Raman e as voltametrias cíclicas demonstram uma diferença entre o ITO/DPPC+AM e o ITO/MIM, porém as análises eletroquímicas não demonstraram os efeitos esperados. Uma hipótese, que será estudada após esta primeira parte, é que a MIM está sendo formada, porém devido a pequena quantidade de camadas de DPPC, as impressões moleculares não são profundas o suficiente para que apresentem a seletividade desejada. Adicionalmente, o caráter isolante do MIM (formado por fosfolípidios) deve interferir negativamente na sensibilidade do sensor.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

6 – REALIZAÇÃO DA MIM COM O PAH

6.1. Filmes de Langmuir com PAH.

Os filmes de Langmuir de DPPC na presença do PAH na subfase aquosa foram estudados em triplicada, assim como o fosfolípido na presença de PAH e azul de metileno na subfase. As concentrações utilizadas foram de 1×10^{-3} mol/L para o DPPC, 1 mg/mL para o PAH e 1×10^{-4} para o AM. A Figura 27 a) mostra as isotermas π -A do DPPC+PAH e do DPPC+PAH+AM. A Figura 27 b) demonstra as isotermas π -A obtidas para o DPPC puro e para o DPPC+AM.

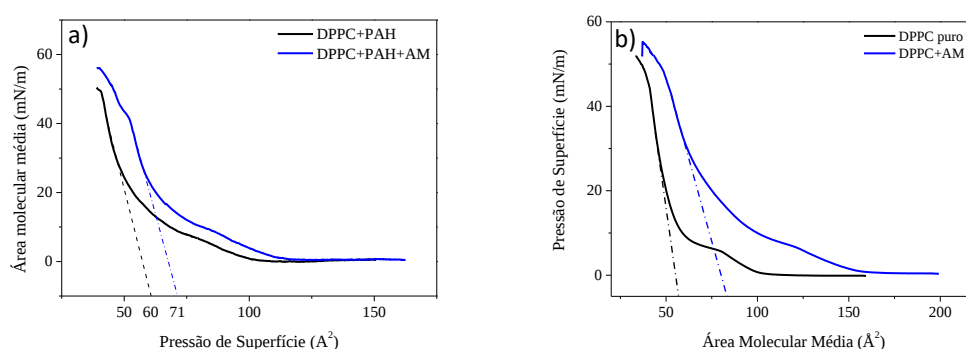


Figura 27: a) Isotermas π -A de DPPC com PAH na subfase aquosa, e na presença do AM na subfase (1×10^{-4} mol/L), obtidas à temperatura ambiente. b) Isoterma π -A de DPPC com e sem a presença de AM na subfase. As linhas pontilhadas extrapoladas até o eixo x indicam a área molecular média.

A presença do PAH na subfase não influenciou o perfil do gráfico das isotermas π -A, se comparado as isotermas obtidas para DPPC, Figura 27 b). É possível observar as fases gasosa, líquido-expandida e líquido-condensada muito bem definidas na isoterma de DPPC+PAH, assim como também reportado na literatura para as isotermas de DPPC puro [65,63]. Porém a diferença entre as isotermas é no valor de área extrapolada. Enquanto para o DPPC puro o valor é de $56 \text{ \AA}^2$, o do DPPC+PAH foi de $61 \text{ \AA}^2$, o que indica que cada molécula está ocupando uma área média maior durante o empacotamento. Esse aumento está relacionado à adição do PAH na subfase, que por interações com o DPPC permanece na interface. Entretanto, ao chegar na pressão de 30 mN/m, o valor de área molecular média é igual ao do DPPC puro, de $45 \text{ \AA}^2$, demonstrando que após o

empacotamento o fosfolipídio, mesmo na presença do PAH, tem o mesmo perfil que o DPPC puro. Esse efeito pode estar relacionado com a expulsão do PAH da região entre os fosfolipídios com o aumento da pressão superficial. Porém, ainda é possível que cadeias de PAH possam ficar acomodadas abaixo da monocamada de DPPC.

A isoterma de DPPC+PAH+AM, Figura 27 a), teve um comportamento diferente do DPPC+AM, Figura 27 b). O DPPC+AM teve o início da fase líquido-expandido em $160 \text{ \AA}^2$, enquanto na presença do PAH a fase teve seu início em $115 \text{ \AA}^2$. Porém se comparado ao DPPC+PAH, a isoterma contendo o corante deslocou para maior área, demonstrando uma maior interação entre o DPPC e o AM, do que se comparados ao DPPC e o PAH, o mesmo ocorreu em Aoki *et al* [86], onde a isoterma de DPPG+PAH contendo o AM deslocou-se também para maiores áreas. A área extrapolada do DPPC+PAH+AM foi de $71 \text{ \AA}^2$, demonstrando uma interação entre o fosfolipídio e o AM. Ao final da isoterma pode-se observar que o empacotamento não conseguiu expulsar o corante da interface ar-água, e também se percebe um pequeno platô durante o final da isoterma. Este platô também foi observado em MAXIMINO, *et al* [68], onde observou-se uma interação entre o AM e a amoxicilina. Neste caso, pode estar ocorrendo uma interação entre o AM e o PAH, ambos adicionados na subfase da isoterma, e com isso ocasionando o platô.

Os módulos compressionais foram obtidas através das isotermas π -A, a Figura 28 mostra o gráfico de pressão de superfície por módulo compressioal obtidos no experimento.

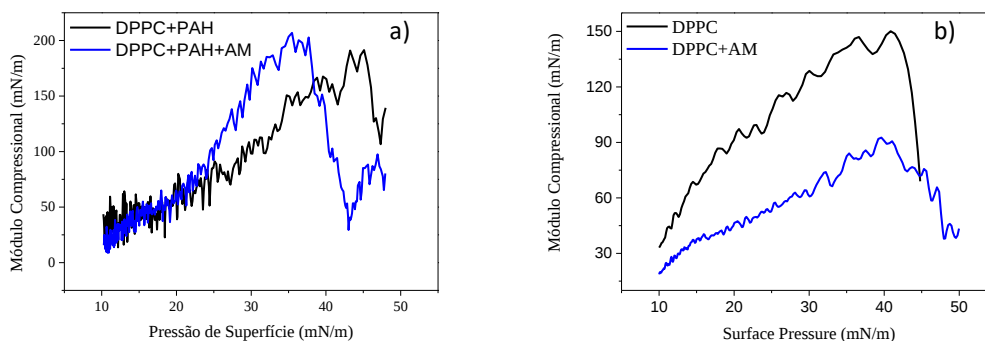


Figura 28: Módulo compressional das isothermas π -A de a) DPPC+PAH e DPPC+PAH+AM. b) DPPC e DPPC+AM.

O módulo compressional do DPPC+PAH, Figura 28 a), apresentou um valor de C_s^{-1} de 111 mN/m, dentro da faixa de líquido-condensada reportada na literatura, de C_s^{-1} entre 100 e 250 mN/m [35], demonstrando que em pressão de superfície de 30 mN/m a monocamada estava na fase líquido-condensada. Já para o DPPC+PAH+AM, Figura 28 a), o valor encontrado foi de 175 mN/m, também dentro do intervalo da fase líquido-condensado [35]. O valor de C_s^{-1} na presença do corante foi maior do que o apresentado para o DPPC+PAH, o que demonstra que se obteve uma reorganização das moléculas no empacotamento, tornando-as mais rígidas, um resultado diferente do obtido na Figura 28 b), onde o valor de C_s^{-1} diminuiu, tornando o sistema mais fluido. Na pressão de superfície de 43 mN/m ocorreu uma queda no gráfico, e este é referente ao platô encontrado ao final da isoterma de DPPC+PAH+AM, sendo possivelmente referente a uma interação entre o AM e o PAH, ambos presentes na subfase da isoterma e reorganização da monocamada no momento da compressão. Ao final do módulo compressional do DPPC+PAH+AM, em 45 mN/m, é observado que o valor de C_s^{-1} é menor quando contém o corante, de 85 mN/m com o AM e 176 mN/m sem o AM, demonstrando que o empacotamento ao final não foi atingido, e assim as moléculas de AM permaneceram na interface, deixando a molécula mais fluida, como também ocorreu nos resultados sem a adição do PAH, no tópico 5.1 do Capítulo 5 deste trabalho.

6.2.Langmuir-Schaefer (LS)

A técnica de LS foi utilizada para realizar as deposições de DPPC+PAH e DPPC+PAH+AM no substrato de ITO. Foi realizada a deposição de três camadas de filme em cada substrato, tendo a pressão constante de 30 mN/m. A Figura 29 mostra o gráfico de área entre as barreiras em função do tempo durante as deposições.

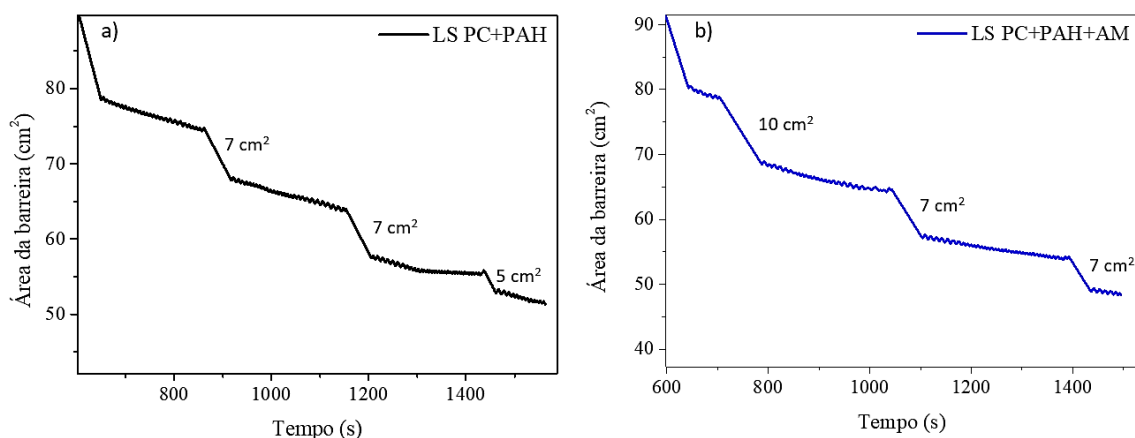


Figura 29: Gráfico de deposição de: a) LS de DPPC+PAH; b) LS de DPPC+PAH+AM.

As deposições para cada gráfico foram realizadas em três substratos de ITO de área de 0,83x2,5 cm², totalizando 6,25 cm². Na Figura 29 a), com a deposição da primeira e da segunda camada ocorreram variações de área de 7 cm², dentro do previsto para a deposição de uma monocamada, enquanto a última foi de 5 cm², indicando que nesta última, a deposição de uma monocamada verdadeira fica dificultada. Para a letra b) a primeira camada variou 10 cm², enquanto a segunda e a terceira camadas variaram 7 cm², ocorrendo novamente uma variação de 16%, considerada uma boa deposição.

6.3.Espectroscopia de absorção UV-Vis

O crescimento do filme de DPPC+PAH+AM foi monitorado, onde após cada deposição do filme LS no ITO realizava-se a análise por UV-Vis. A Figura 30 mostra o crescimento do filme, da primeira até a terceira camada.

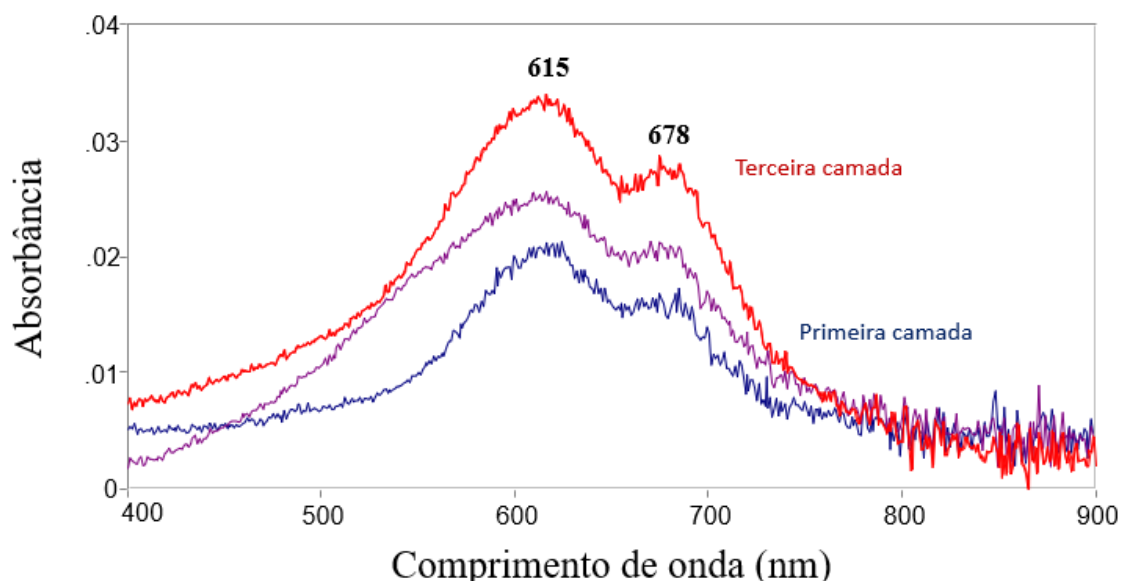


Figura 30: Crescimento do filme LS de DPPC+PAH+AM monitorado através do UV-Vis, sendo a azul a primeira camada, a roxa a segunda camada e a vermelha a terceira camada.

As bandas presentes no gráfico Figura 30 foram de 615 e 678 nm, e estes são referentes as bandas do azul de metileno presente no filme. Nicolai e Rubim (2003) [73] citam que as bandas de 670 nm e 600 nm são atribuídas as transições $\pi-\pi^*$ de monômeros e dímeros do AM, respectivamente. Pode-se observar que o crescimento ocorre de forma linear, com aumento da intensidade das bandas referentes ao AM da primeira até a terceira camada, concluindo-se a presença de mais corante no filme conforme vai se adicionando camadas ao ITO. Vale destacar que o PAH, assim como o DPPC, não apresenta bandas de absorção UV-Vis no intervalo estudado [72].

Posteriormente foi realizada a comparação dos espectros dos filmes contendo o AM e após a sua remoção, que foi realizada através da voltametria cíclica, cujo procedimento está descrito no tópico 6.5, do Capítulo 6. A Figura 31 mostra a comparação do UV-Vis do filme contendo AM e do filme após a remoção através da voltametria cíclica.

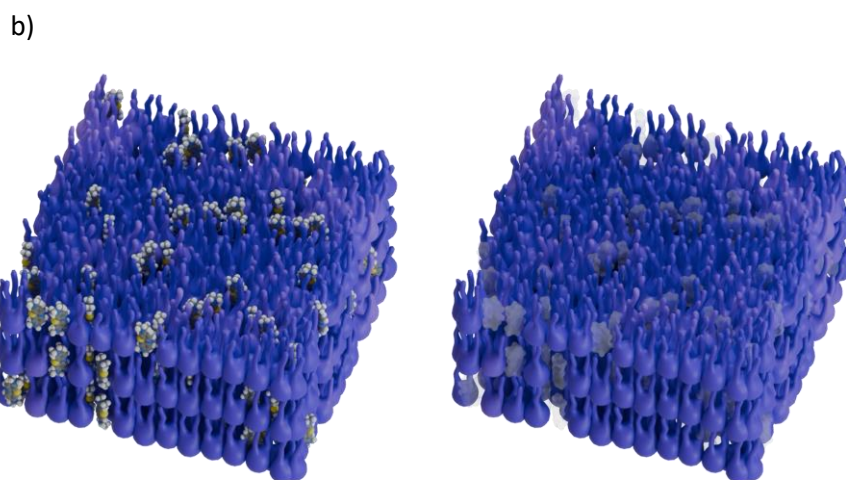
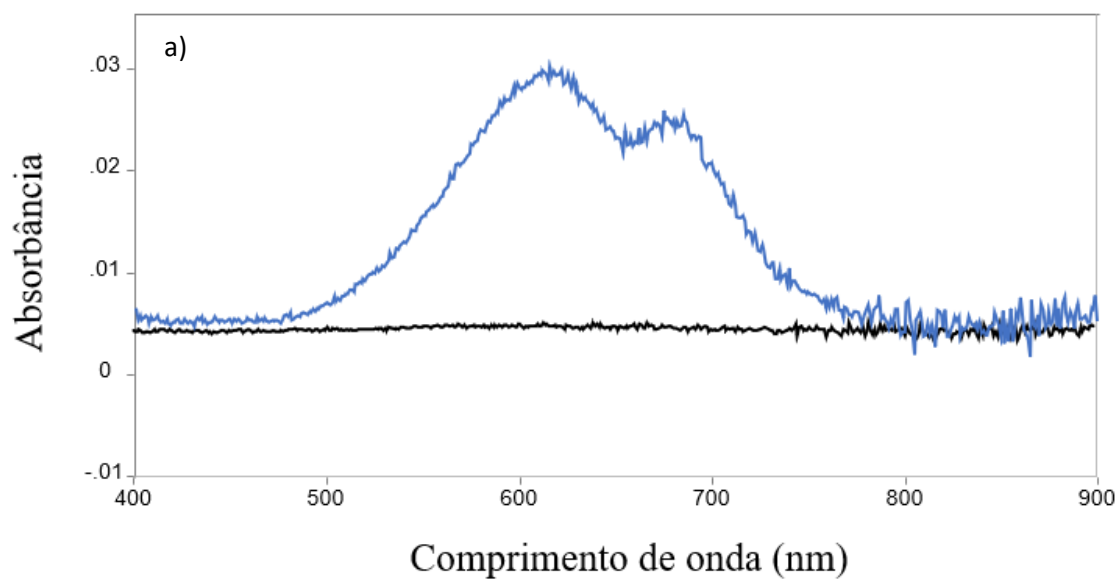


Figura 31: a) Espectros de UV-Vis do filme contendo azul de metileno (em azul) e do filme após a remoção do corante (em preto), realizado através da voltametria cíclica. b) Ilustração da Membrana Impressa Molecularmente (MIM) na presença e na ausência de MB.

Pode-se observar as duas bandas referentes ao AM, já descritas anteriormente, para o filme contendo o corante (espectro azul na Figura 31 a)). Após o filme ser submetido a voltametria cíclica, ocorreu-se a remoção do AM do filme, após 26 ciclos na VC em KCl (concentração de 0,1 mol/L). Isto ficou evidente na Figura 31 a), onde o espectro preto mostra o UV-Vis do filme após a remoção do corante, onde as duas bandas características do AM desapareceram. A Figura 31 b) mostra uma ilustração da estrutura

esperada para a Membrana Impressa Molecularmente (MIM) na presença e na ausência de MB.

6.4. Espectroscopia Raman

Os espectros Raman foram obtidos utilizando-se a linha de laser 633 nm. Eles foram realizados para verificar, através dos modos vibracionais, a presença de azul de metileno nos filmes de DPPC+PAH+AM e da MIM, que foi otimizada utilizando o PAH. A Figura 32 ilustra os espectros obtidos DPPC+PAH+AM assim como o espectro de DPPC+AM, já discutido no Capítulo 5.

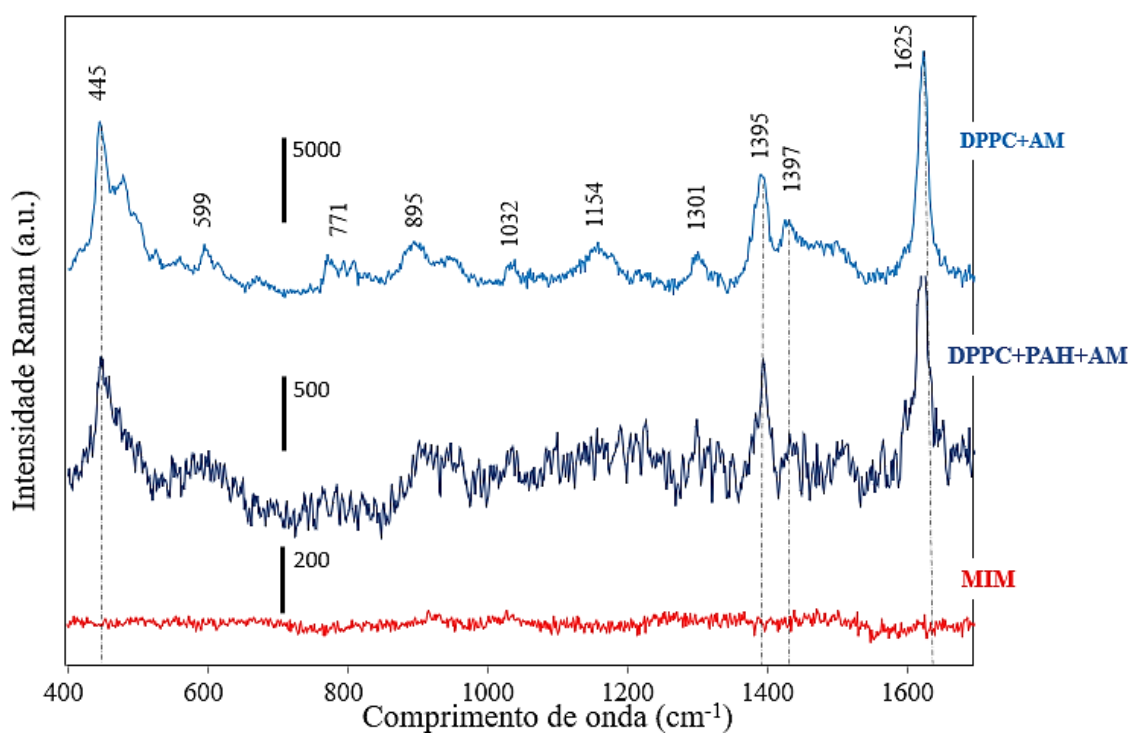


Figura 32: Espectros Raman, com linha de laser 633 nm, dos filmes contendo 3 camadas de DPPC+AM, DPPC+PAH+AM e da MIM.

O espectro do DPPC+AM, na ausência do PAH possui as bandas características do corante, de acordo com a literatura [76,67]. As atribuições das bandas estão mostradas na Tabela 1 (página 53). As bandas referentes ao AM foram observadas para o DPPC+PAH+AM, muito similar ao obtido no sistema DPPC+AM. No entanto, as intensidades das bandas no filme contendo o PAH são menores do que as do filme sem o

polieletrólito. Isso pode ter atribuído à interação entre o PAH e o DPPC, que competiu com as interações entre DPPC e MB, resultando em uma menor quantidade de AM no filme. Além disso, ao comparar as imagens da superfície dos filmes, Figura 33, observa-se que o filme de DPPC+AM possui mais agregados de AM do que o filme de DPPC+PAH+AM, o que também indica uma menor quantidade de corante no filme com PAH. Contudo, essa diminuição não é prejudicial para o sensor; pelo contrário, sugere a formação de impressões moleculares mais nítidas e específicas. Isso pode potencialmente melhorar o desempenho do sensor, aumentando a precisão nas interações moleculares específicas entre o AM e as moléculas alvo.

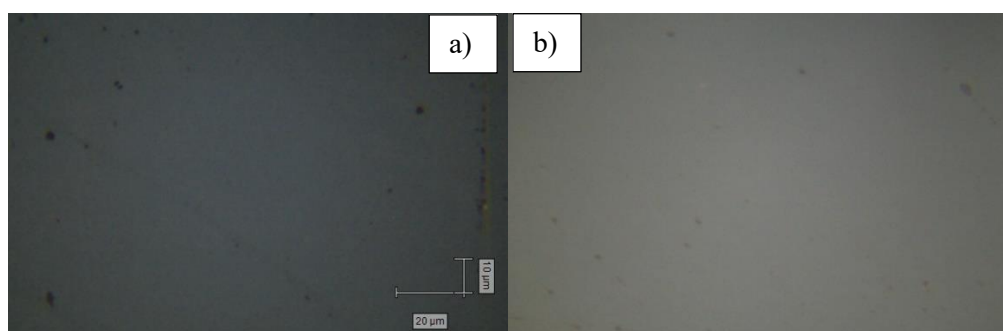


Figura 33: a) Imagem do filme de DPPC+AM e b) imagem do filme de DPPC+PAH+AM.

A comprovação de que as bandas obtidas no DPPC+PAH+AM são referentes ao corante foi obtida no espectro da MIM. Após a remoção do corante do filme, utilizando da voltametria cíclica, as bandas obtidas anteriormente desapareceram. Demonstrando assim a remoção satisfatória do AM para a obtenção das MIMs.

6.5.Caracterização eletroquímica

Para as caracterizações eletroquímicas do Capítulo 6 inicialmente a voltametria cíclica no eletrodo contendo as três camadas dos filmes de ITO/DPPC+PAH foi realizada, como demonstrados na Figura 34.

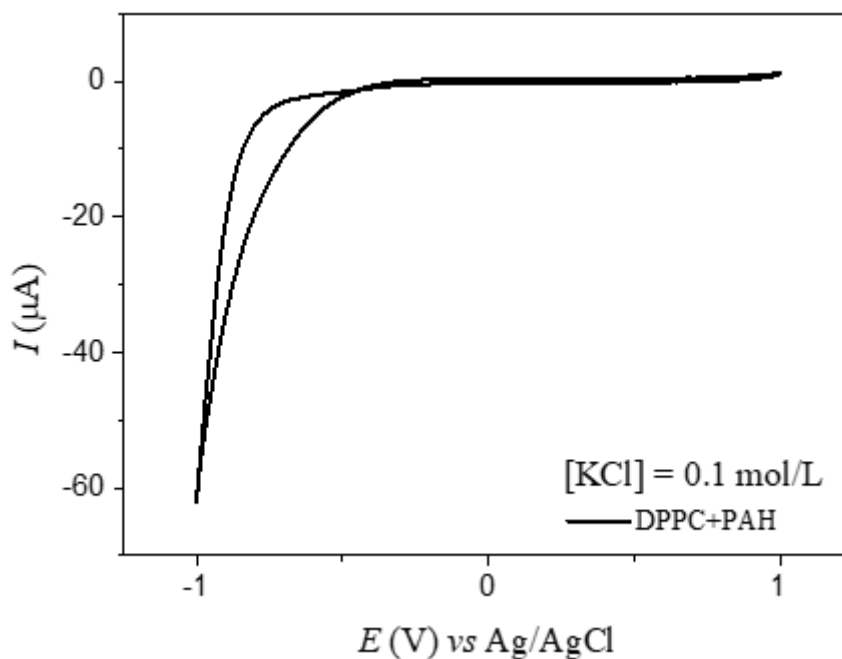


Figura 34: Voltametria cíclica em solução de KCl (concentração de 0,1 mol/L) do eletrodo contendo os filmes de DPPC+PAH.

Como demonstrados no tópico 5.5 do Capítulo 5, o DPPC não apresenta comportamento eletroquímico, caracterizado pela ausência de pares redox [78]. O voltamograma da Figura 34 foi obtido com o objetivo de se observar se ocorreria alguma mudança após a adição do PAH no filme. Porém pode-se observar que nenhuma mudança ocorreu, obtendo assim um eletrodo sem comportamento eletroquímico [86].

Posteriormente foi realizado a VC do eletrodo de ITO/DPPC+PAH+AM em solução de KCl (concentração de 0,1 mol/L), como mostrado na Figura 35 a).

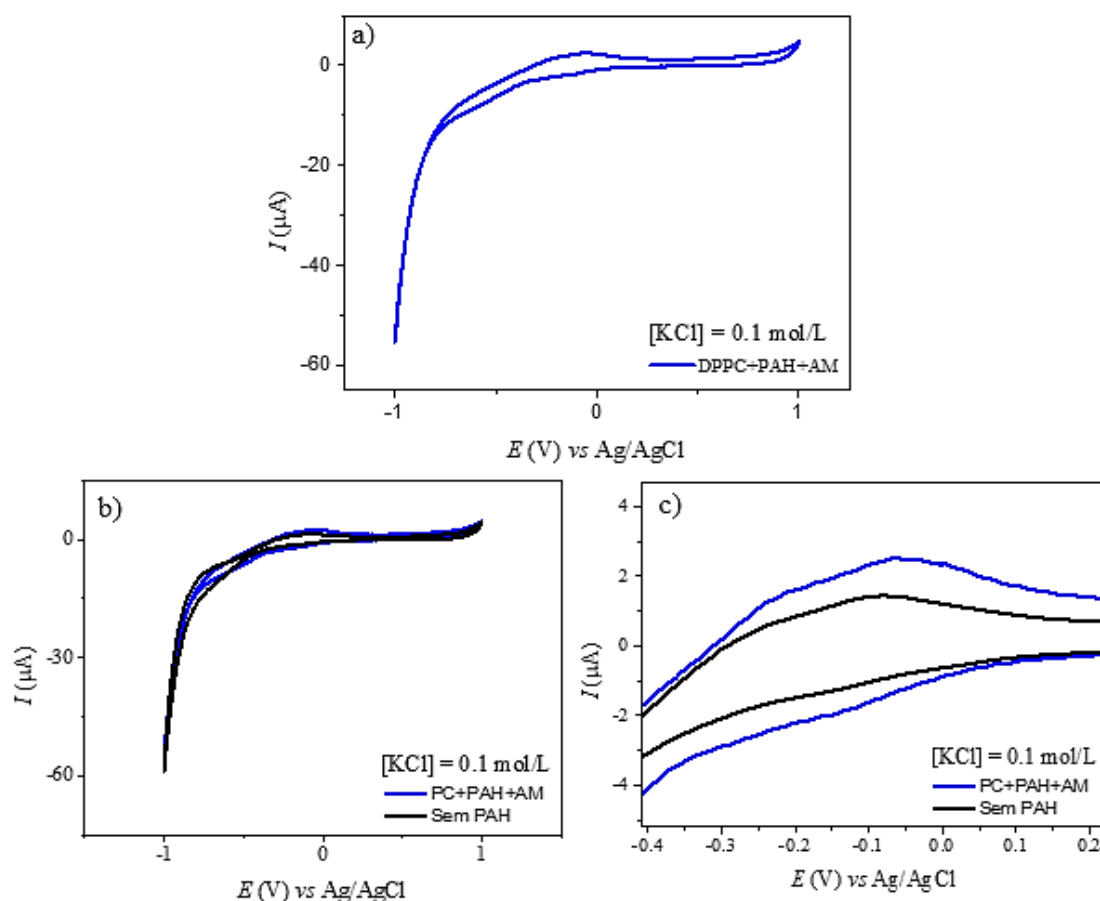


Figura 35: Voltamogramas dos eletrodos de a) DPPC+PAH+AM, b) voltamograma da comparação entre os eletrodos contendo AM com e sem PAH e c) voltamograma aproximado da comparação dos eletrodos com e sem a presença de PAH.

Na Figura 35 a) tem-se o voltamograma do eletrodo de ITO/DPPC+PAH+AM, onde, diferentemente do eletrodo ITO/DPPC+PAH, ele possui atividade eletroquímica, observada pelo pico de oxidação em -0,25 V e o de redução em -0,14 V. Esse par redox é correspondente ao azul de metileno presente no eletrodo, e pelo eletrodo apresentar apenas 3 camadas moleculares de filme, as intensidades de correntes são mais discretas.

Quando os voltamogramas dos eletrodos contendo o PAH e sem o PAH são comparados, observa-se que o eletrodo com o PAH apresenta uma resposta eletroquímica melhor por parte do AM, tendo um par redox com intensidade maior. Enquanto sem o PAH, apesar do mesmo número de camadas (3 em cada eletrodo), a intensidade de corrente dos picos de AM é bem menor. Isto se deve a interação eletrostática que o PAH

possui com o DPPC. Apesar do DPPC ser zwitterionico ocorre uma interação entre o fosfolípido e o PAH, onde o polieletrólito atua como um *cross-linker* no filme, agrupando mais o DPPC e consequentemente o AM presente na subfase. Isto foi demonstrado em Aoki, *et al* [86], onde os autores conseguiram 13 deposições do filme LB DPPC na presença de PAH, e não apenas 3, o limite de deposição observado na ausência de PAH.

Após confirmar a presença do AM no eletrodo foi realizado o processo de obtenção das MIM. Para isso foi realizado a remoção do AM utilizando a voltametria cíclica, no intervalo de potencial de -1 a 1 V. A Figura 36 mostra os voltamogramas do processo de retirada do corante do eletrodo utilizando a VC em solução de KCl (concentração de 0,1 mol/L).

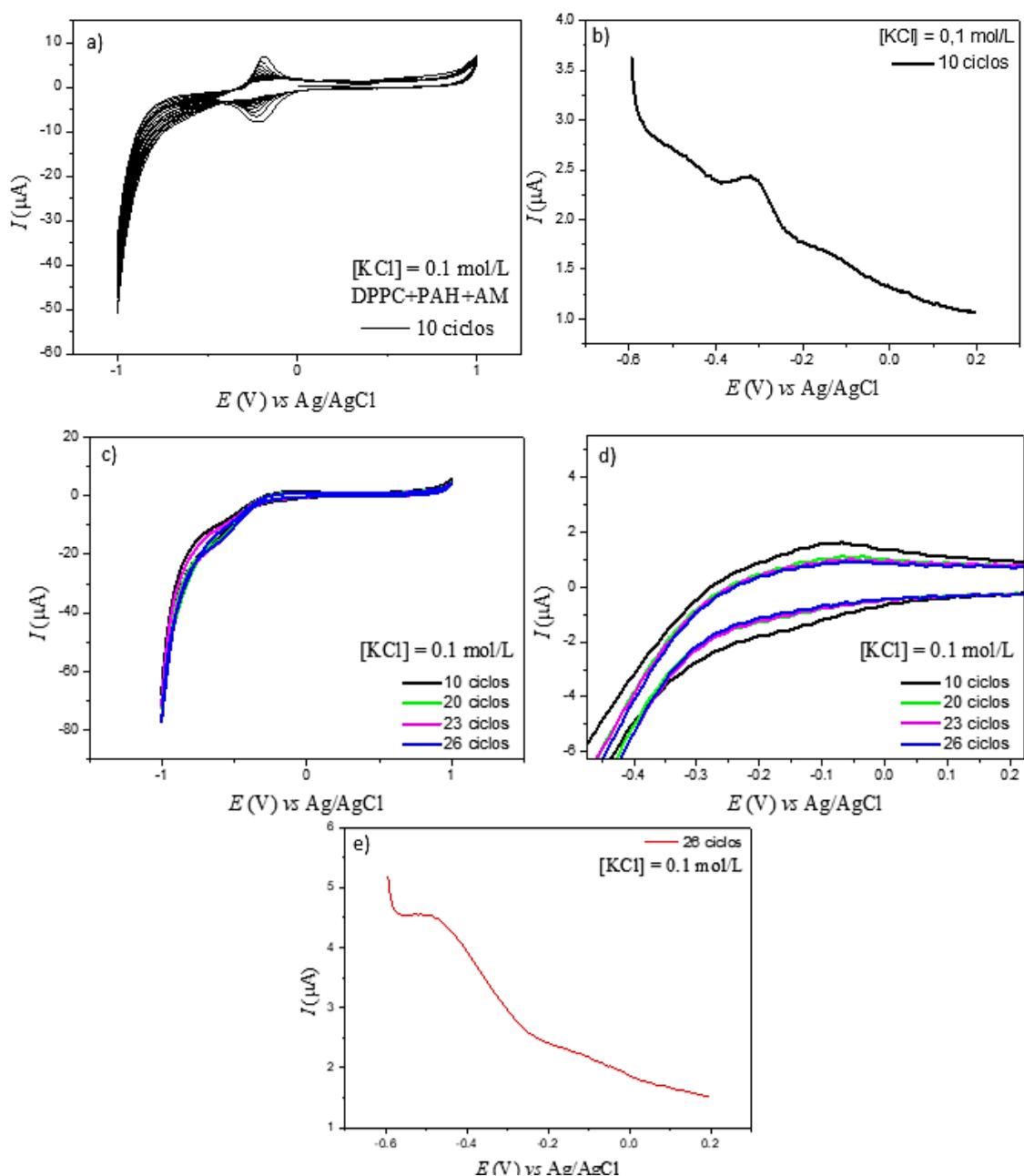


Figura 36: a) voltamograma dos 10 primeiros ciclos do eletrodo de DPPC+PAH+AM; b) DPV do 20º ciclo; c) voltamograma até o ciclo 26; d) aproximação de c); e) DPV do ciclo 26.

Na Figura 36 a), mostra os primeiros 10 ciclos da VC realizada no eletrodo contendo AM, sendo o primeiro ciclo com par redox com intensidade maior e o décimo ciclo o par redox de menor intensidade. Percebe-se que conforme o número de ciclos vai aumentando, a intensidade dos picos de AM vai diminuindo, demonstrando que o corante estava sendo removido do eletrodo. Entretanto, os 10 ciclos não foram suficientes para a remoção completa do AM, como demonstrado em b), onde o pico referente ao AM foi

encontrado em -0,30 V. Por isso foram realizados mais ciclos para a remoção total do corante. Assim, foram realizados mais 10 ciclos, e posteriormente mais duas etapas de 3 ciclos, sendo obtida a curva de DPV a cada etapa para averiguar se o AM havia sido completamente removido. No total foram necessários 26 ciclos para a remoção do corante do eletrodo, como mostrados nas Figuras 36 c) e d).

6.6. Teste em solução de azul de metileno

Após a remoção do AM do eletrodo, resultando no ITO/MIM, foi realizado o teste em solução de AM para verificar se o eletrodo conseguia detectar o corante em solução aquosa. Para isso foi escolhido a concentração de 1×10^{-6} mol/L de AM em água ultrapura para começar o teste de detecção, sendo uma solução de concentração inicial não tão baixa, porém quase incolor, apenas para verificar a funcionalidade do sensor.

A solução foi preparada através de uma diluição de uma solução de AM com concentração de 1×10^{-4} mol/L. O sensor foi colocado imerso na solução de 1×10^{-6} mol/L de AM inicialmente por 10 minutos. Após este tempo o eletrodo passou por um processo de limpeza da superfície para que as moléculas de AM não adsorvidas no filme fossem removidas. Para isso, uma solução de KCl foi vertida sobre o eletrodo com o auxílio de uma pipeta. Após isso, 3 ciclos de voltametria cíclica e um DPV foram obtidos, ambos em solução de KCl (0,1 mol/L). O processo se repetiu para os tempos de 20 minutos e 30 minutos, e os DPV estão mostrados na Figura 37, a seguir.

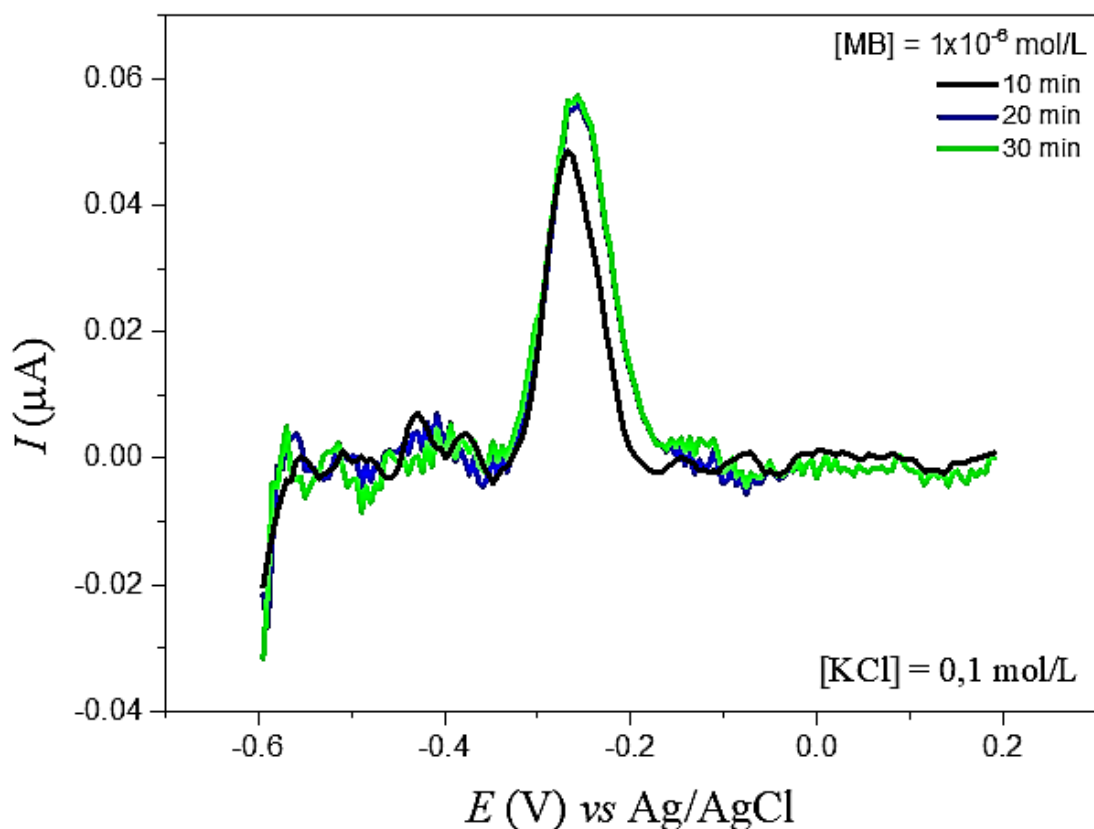


Figura 37: DPV do sensor em solução de KCl (0,1 mol/L) após a imersão na solução de azul de metileno, concentração 1×10^{-6} mol/L, para os tempos de 10, 20 e 30 minutos. Os voltamogramas são apresentados utilizando linha de base.

Como observado na Figura 37, com 10 minutos de imersão do sensor em solução de AM, foi possível realizar a detecção do corante, sendo um resultado satisfatório para o proposto neste projeto. Com 20 minutos de imersão obteve-se um aumento na intensidade de corrente, tendo uma melhor detecção do AM pelo sensor. Porém, em 30 minutos a intensidade da corrente não aumentou, indicando uma saturação, o que pode ser explicado pelo total preenchimento das cavidades disponíveis para a entrada do corante. Como o sensor possui apenas 3 camadas moleculares de filme, a quantidade de cavidades da MIM também é limitada. Com 20 minutos do sensor imerso na solução de AM as cavidades já foram totalmente preenchidas. Assim, com 30 minutos de imersão não houve aumento da intensidade de corrente.

6.7.Limite de detecção

Para o cálculo do limite de detecção, 10 curvas de DPV do branco, ou seja, do eletrodo de ITO/MIM em KCl foram obtidos inicialmente para o cálculo do desvio padrão, o qual foi de $4,0 \times 10^{-8}$. Como foi mostrado na seção anterior, com 20 minutos obteve-se o preenchimento das cavidades do MIM. Portanto, para o cálculo do limite de detecção imergiu-se o eletrodo de ITO/MIM em soluções de AM com diferentes concentrações, deixando-o imerso por 20 minutos em cada concentração. Posteriormente, lavou-se o eletrodo com KCl, e obteve-se a DPV do eletrodo em solução de KCl (0,1 mol/L). A Figura 38 mostra as DPV obtidas para cada concentração de MB.

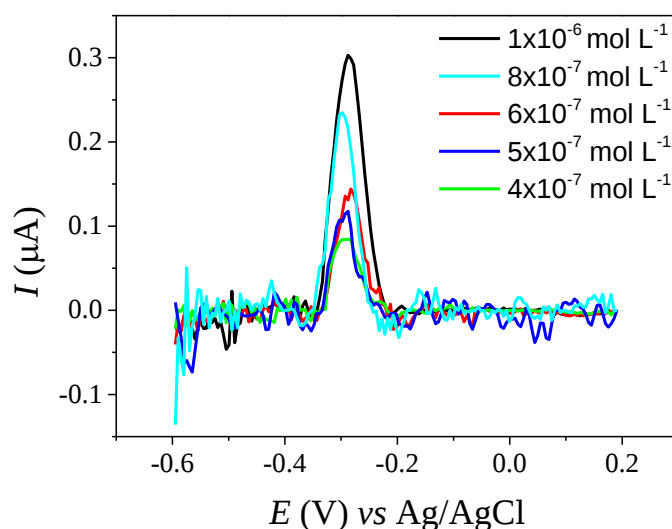


Figura 38: DPV do eletrodo de ITO/MIM em KCl (0,1 mol/L) após 20 minutos imerso em diferentes concentrações de AM (de 4×10^{-7} até 1×10^{-6} mol/L). Voltamogramas apresentados utilizando linha de base.

Observa-se na Figura 38 que em todas as concentrações estudadas o pico de oxidação de AM em -0,30 V foi aparente, demonstrando assim que em todas as concentrações obteve-se a detecção do corante. Ainda, é possível verificar que a intensidade do sinal aumentou com o aumento da concentração. A imersão do eletrodo nas diferentes concentrações, foi realizado utilizando somente um eletrodo, isto mostra

que o sensor fabricado é reutilizável pois conseguiu detectar as concentrações diferentes de AM.

O experimento foi realizado em triplicata independente (um sensor diferente para cada análise), podendo-se obter assim a curva de calibração da detecção do AM, mostrada na Figura 39.

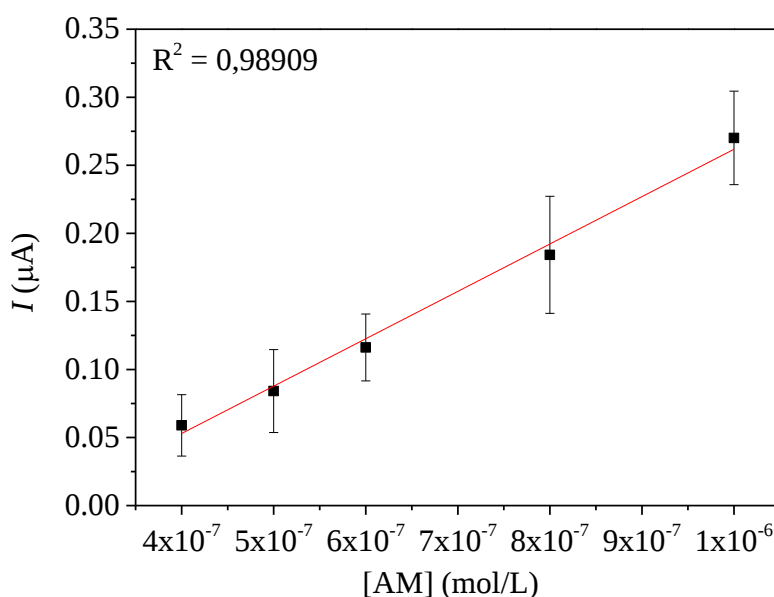


Figura 39: Curva de calibração da detecção de AM para diferentes concentrações, onde a barra representa o desvio padrão da análise realizada em triplicata independente.

A curva de calibração mostra que o erro para cada concentração foi relativamente pequeno, tendo um erro maior para a concentração de 8×10^{-7} mol/L. O R^2 foi de 0,98909, sendo um valor aceitável. Posteriormente, foi realizado o cálculo de limite de detecção, utilizando a equação de $3SD/slope$, onde o SD é o desvio padrão do eletrodo ITO/MIM antes da detecção (branco), e o *slope* é a inclinação da regressão linear. Realizando o cálculo foi obtido um limite de detecção de $3,4 \times 10^{-7}$ mol/L. Se comparado com a literatura, e se comparado a metodologia utilizando o MIP, tem-se o trabalho de Wang *et al* (2020) [87], onde o limite de detecção encontrado foi de $1,27 \times 10^{-6}$ mol/L, tendo um limite de detecção maior que o encontrado neste trabalho, além de se utilizar uma metodologia

mais complexa para a obtenção das cavidades do AM. Portanto, o limite de detecção encontrado de $3,4 \times 10^{-7}$ mol/L pode ser considerado promissor.

6.8. Teste de seletividade

O teste de seletividade foi realizado utilizando a quercetina pois essa molécula possui um tamanho próximo do AM e processos redox bem definidos. A Figura 40 mostra a DPV do ITO em solução de quercetina (concentração de 1×10^{-6} mol/L) para observar os picos de oxidação e redução do flavonóide. O pico de oxidação encontrado em 0.00 V está dentro do reportado da literatura, assim também como a presença de dois picos de oxidação atribuídos aos processos de oxidação da quercetina [84, 88].

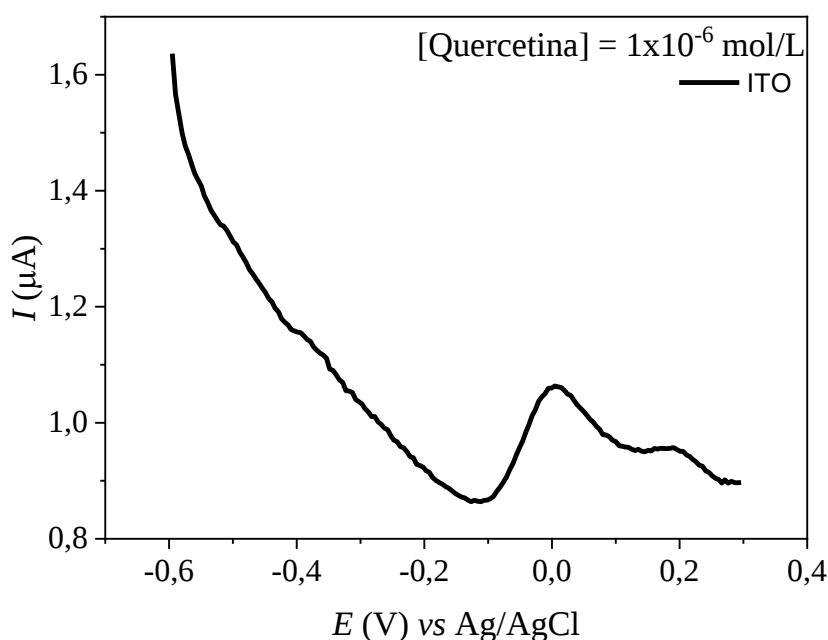


Figura 40: DPV do ITO em solução de quercetina e KCl.

O teste de seletividade se iniciou com a remoção do AM do eletrodo, formando a MIM, como discutido no tópico 6.5 do Capítulo 6. O eletrodo ITO/MIM foi então imerso em uma solução de quercetina (concentração de 1×10^{-6} mol/L) por 20 minutos. Após esse

processo, o eletrodo ITO/MIM foi lavado e as análises de DPV foram realizadas em solução KCl (0,1 mol/L), como mostrado na Figura 41.

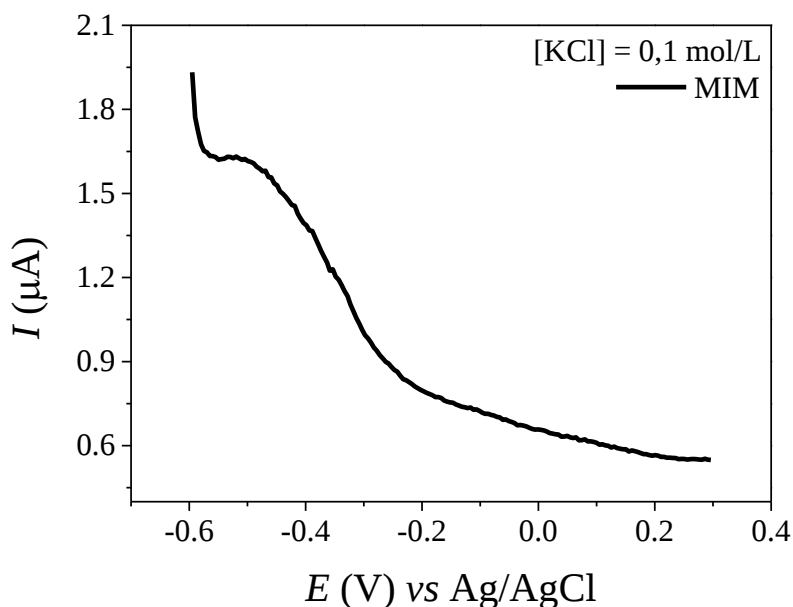


Figura 41: DPV em KCl (0,1 mol/L) do ITO/MIM após a imersão do eletrodo em solução de quercetina (1×10^{-6} mol/L) por 20 minutos.

Observa-se na Figura 41 que os picos de oxidação da quercetina não foram detectados no eletrodo ITO/MIM após a imersão deste na solução do flavonoide. Caso a detecção ocorresse, o DPV deveria mostrar um pico em 0,00 V, como observado para o ITO, na Figura 40. Isto significa que o sensor fabricado utilizando a metodologia de MIM não detectou a quercetina, demonstrando um sensor seletivo para detecção do azul de metileno.

6.9. Microscopia de força atômica (AFM)

As imagens de AFM foram realizadas na Universidade de Valladolid, na Espanha, durante a estadia no laboratório UVaSens, através do programa Capes Print. As imagens da morfologia dos filmes foram obtidas para: 1) o substrato BDD; 2) filme LS de DPPC puro; 3) filme LS de DPPC+PAH; 4) filme LS de DPPC+PAH+AM; e 5) a MIM. Todas

as imagens foram obtidas em tamanho de 20 μm x de 20 μm . A Figura 42 mostra as imagens topográficas de AFM obtidas para o BDD em 2 dimensões (2D) e 3 dimensões (3D).

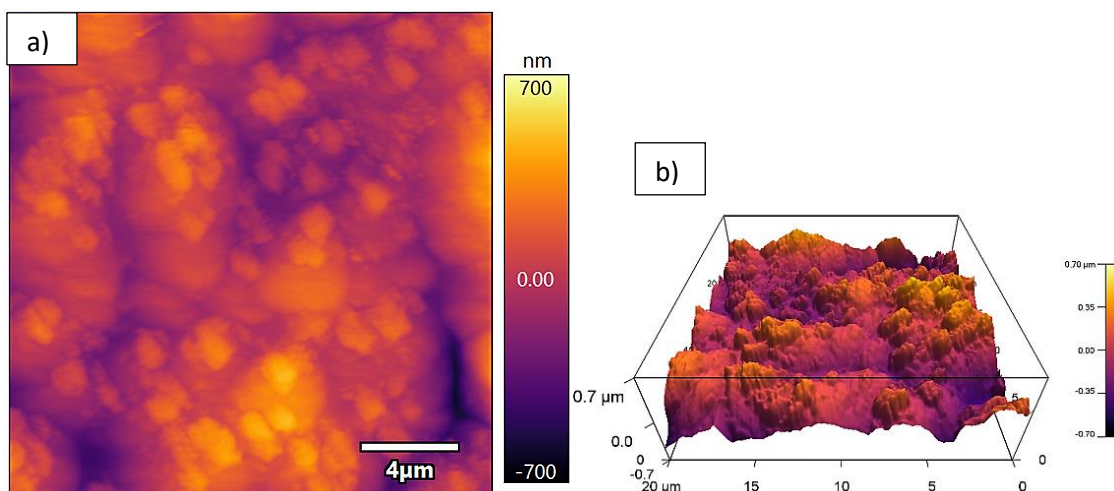


Figura 42: a) Imagem topográfica de AFM do substrato BDD, com 20 μm x 20 μm e escala de 4 μm ; b) Imagem topográfica em 3D da imagem mostrada em (a).

O substrato BDD foi previamente limpo com solução de ácido sulfúrico concentrado e peróxido de hidrogênio. As imagens mostram que o substrato não era homogêneo e a superfície era bastante rugosa, assim como demonstrado na literatura [89, 90]. Apesar disso, o substrato de BDD foi inicialmente escolhido, pois a ideia era realizar análises de EC-AFM, onde as análises de eletroquímica podem ser obtidas simultaneamente às imagens de AFM. Portanto, um substrato condutor é necessário. Ainda, o substrato condutor é necessário para o processo eletroquímico de remoção do AM. Contudo, o equipamento não estava funcionando adequadamente, o que impossibilitou tais análises de EC-AFM. O BDD apresentou rugosidade (R_q) de 157.6 nm.

A Figura 43 mostra a imagem topográfica do AFM para o filme LS de DPPC puro em 2D, assim como a imagem em 3D.

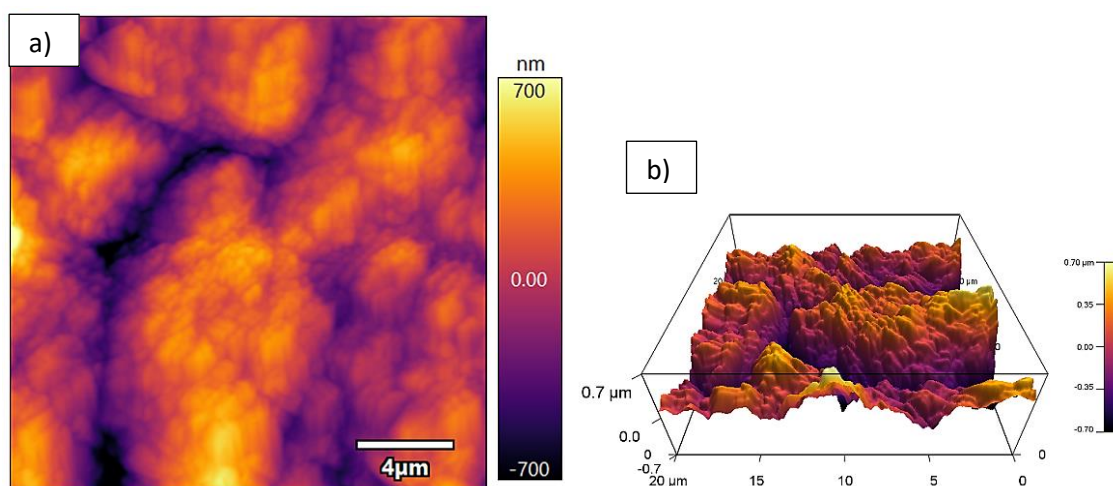


Figura 43: a) Imagem topográfica de AFM do filme LS de DPPC sobre BDD, com 20 μm x 20 μm e escala de 4 μm ; b) Imagem topográfica de AFM em 3D da imagem mostrada em (a).

A imagem do filme LS de DPPC sobre o substrato BDD mostra uma rugosidade maior que o BDD, tendo um valor de 232.8 nm. Pode-se perceber também uma orientação do filme, isso se dá por causa da deposição LS, onde o substrato faz sempre o mesmo movimento na hora da deposição, da parte inferior do substrato até a parte superior. Isto ocorre para as três camadas de deposição, dando assim a orientação observada nas imagens de AFM do filme LS de DPPC. Percebe-se também que a monocamada de DPPC parece formar domínios, isto também pode ser visto em imagens de BAM reportados na literatura, como em Alvares *et al* [91], onde o BAM da compressão do fosfolípido de DPPC também apresenta domínios conforme era comprimido, sendo um resultado similar ao AFM obtido para o LS de DPPC.

A Figura 44 mostra as imagens de AFM do DPPC+PAH e também a imagem 3D do AFM.

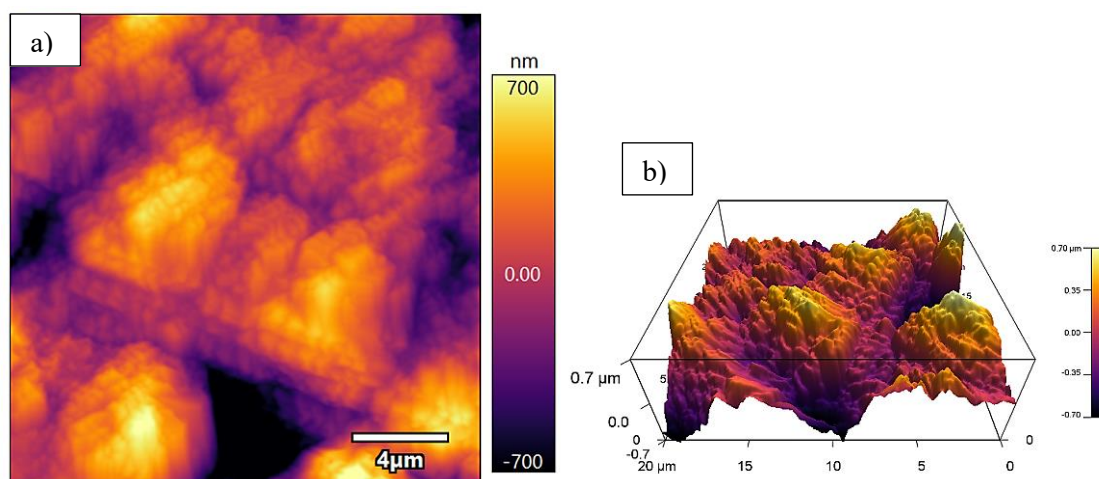


Figura 44: a) Imagem de AFM do DPPC+PAH em escala de 4 μm e tamanho de imagem de 20 μm ; b) Imagem em 3D do filme de DPPC+PAH.

A imagem de AFM do DPPC+PAH possui a mesma orientação do AFM de DPPC puro, porém agora demonstra ser um filme mais compacto. A distribuição das alturas entre as duas amostras varia, o que sugere que a presença de PAH altera a maneira como o DPPC se organiza na superfície. Isso está de acordo com o observado nas isotermas de Langmuir, que mostraram alterações tanto na área molecular média ocupada pelo DPPC como alterações na fluidez da monocamada com a adição do PAH na subfase. Esses efeitos se devem ao fato do PAH interagir com o DPPC, agindo como se fosse um agente de ligação ou reticulação (uma molécula que se liga a outras moléculas, influenciando sua organização e estabilidade) entre os fosfolipídios, sendo esta, a mesma razão do porque utilizando o PAH na subfase consegue fazer mais camadas de DPPC e também de DPPG, como demonstrado em Aoki *et al* [85]. A rugosidade do filme também aumentou, indo para 301.2 nm. A adição de PAH ao filme de DPPC aumenta a rugosidade devido à interação entre as moléculas de PAH e DPPC, que pode causar reorganização estrutural, formação de domínios, empilhamento de camadas e heterogeneidade na superfície. Essas mudanças estruturais são refletidas nas imagens de AFM como uma superfície mais rugosa e complexa

A Figura 45 mostra o AFM para o filme de DPPC+PAH+AM, assim também como sua imagem em 3D.

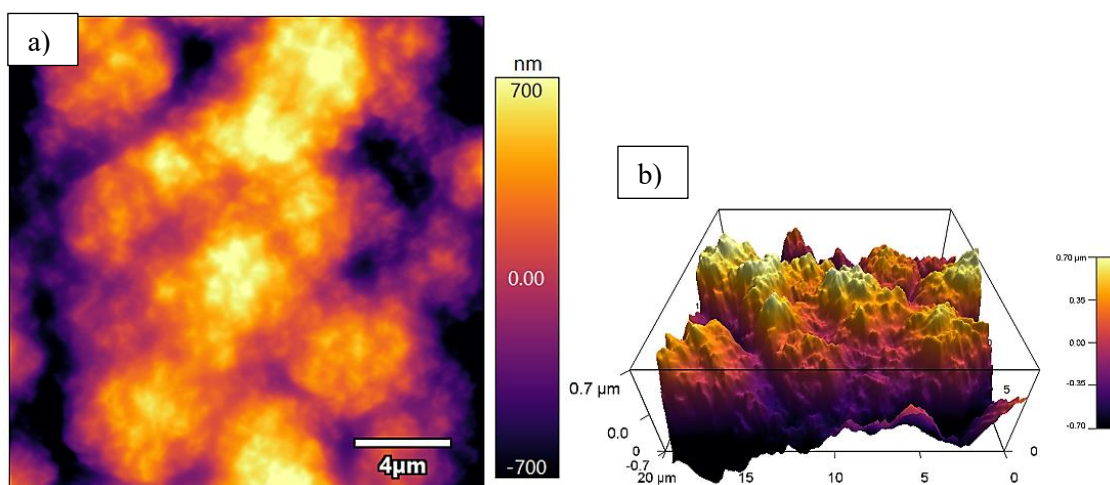


Figura 45: a) Imagem de AFM do filme de DPPC+PAH+AM em escala de 4 μm e tamanho de imagem de 20 μm; b) Imagem em 3D do AFM de DPPC+PAH+AM.

O AFM do DPPC+PAH+AM mostra um filme muito mais compacto e com uma altura maior que o filme sem o corante, justamente por causa da interação entre o azul de metileno e o fosfolípido, fazendo com que o AM permaneça na interface quando depositado no substrato, assim como demonstrado nas outras caracterizações do filme deste trabalho. A rugosidade também aumentou, passando a ser de 407.5 nm, sendo condizente com o esperado, devido a uma nova molécula na monocamada. O mesmo efeito também ocorreu em Aoki *et al* [69], onde no AFM para o DPPC+PAH+AM, obtido utilizando a técnica de *Layer-by-layer* (LbL), apresentou também maior altura e maior rugosidade que o filme sem o AM, podendo se observar o efeito de agregação ocasionado pelo corante. A orientação observada nos filmes de DPPC puro e DPPC+PAH já não se aplica a este filme, pois a presença do corante faz com que a forma de ser compactada a monocamada se altere, visto que agora tem-se uma nova molécula interagindo com a monocamada.

Por fim, foi realizado o AFM para o filme contendo a membrana de impressão molecular do AM. Para isso foi depositado via LS o DPPC+PAH+AM no substrato BDD e posteriormente o filme foi ciclado em voltametria cíclica para a remoção do corante do filme, deixando assim suas impressões moleculares no substrato. A Figura 46 mostra o AFM do filme contendo a MIM, assim como a imagem em 3D do mesmo.

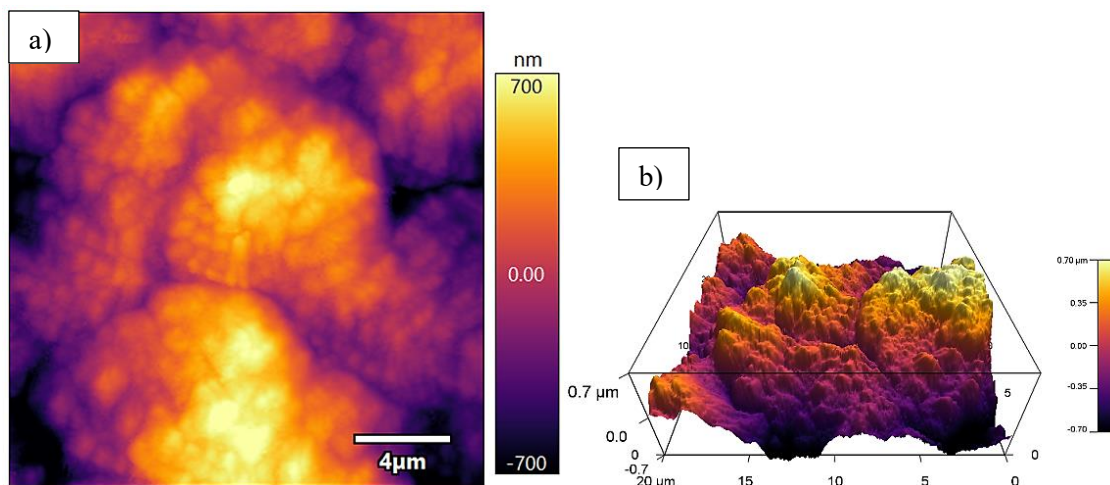


Figura 46: a) Imagem AFM do filme contendo a MIM em escala de 4 μm e tamanho de imagem de 20 μm; b) Imagem em 3D do filme contendo a MIM.

Através da imagem de AFM da MIM, pode-se perceber que após a VC, a morfologia do filme se alterou quando comparado ao filme de DPPC+PAH+AM. Enquanto o filme contendo o corante não apresenta uma orientação aparente, a MIM apresenta uma orientação aparente. O filme não parece mais tão denso, se comparado a Figura 45 a), podendo demonstrar que o corante foi removido do filme, resultando em uma nova morfologia.

Quando se compara a MIM com o DPPC+PAH (Figura 44 a)) pode-se observar que as orientações dos filmes são diferentes, onde para o DPPC+PAH a orientação é mais em forma de camadas, enquanto na MIM a orientação é em forma de “agregados”, efeito também citado na literatura, onde o AM com o DPPC+PAH apresenta forma de agregados [69], e quando removidos, espera-se que saiam como agregados também. Além disso o

DPPC+PAH parece ter uma morfologia muito mais organizada do que a da MIM, o que se era esperado, pois na ausência do corante o DPPC consegue se organizar e empacotar muito melhor do que quando se tem uma nova molécula na interface. A rugosidade do filme MIM foi de 329.5 nm.

As rugosidades de todos os AFMs estão comparadas na Tabela 2.

Tabela 2: Valor de rugosidade (Rq) calculadas a partir das imagens de AFM apresentadas nas Figuras 42, 43, 44, 45 e 46 realizadas para o substrato BDD e os filmes LS depositados sobre BDD contendo DPPC, DPPC+PAH, DPPC+PAH+AM e para a MIM.

AFM	Rugosidade (Rq)
BDD	157.6 nm
DPPC	232.8 nm
DPPC+PAH	301.2 nm
DPPC+PAH+AM	407.5 nm
MIM	329.5 nm

Fonte: Autoria própria

O menor valor de Rq foi do substrato BDD, o que era esperado visto que, mesmo o substrato não sendo liso, ainda não se tinha nenhuma deposição sobre ele, sendo o valor encontrado de Rq referente apenas a morfologia do próprio BDD. Após a deposição do DPPC, o valor de Rq aumentou. Por serem 3 camadas de deposição do fosfolípido, esperava-se o aumento na amplitude do filme, e consequentemente o aumento de Rq, visto que também o LS de DPPC apresentou formato de domínios. Portanto somando a rugosidade que o próprio substrato possui com a deposição do DPPC, ocorreu o aumento do valor de Rq.

Para o DPPC+PAH, o valor de Rq continuou a aumentar, se comparado aos AFM anteriores. Isto se dá, muito provavelmente devido a presença do PAH no sistema, uma vez que ele interage com o fosfolípido deixando a monocamada mais compacta. Além disso, uma nova molécula foi inserida na monocamada (o PAH), o que resulta em uma espessura maior, se comparado ao DPPC puro, aumentando também a sua rugosidade.

Quando o AM foi adicionado no sistema, o R_q atinge o maior valor dentre todos as morfologias analisadas. Isto ocorre por causa do azul de metileno interagir com a monocamada de DPPC e permanecer no mesmo, aumentando a altura do filme em partes onde o corante está localizado, aumentando assim sua rugosidade.

Quando se realiza a MIM, retira-se o AM do filme, deixando assim suas impressões moleculares nas cavidades que formam devido a sua retirada. Com isso perde-se a amplitude que tinha nos lugares onde o AM estava no filme, por isso diminui-se o valor de R_q , como demonstrado no resultado da Tabela 2. Porém se comparado o valor de R_q da MIM com o valor de R_q do DPPC+PAH, o da MIM é maior que a do DPPC+PAH, isso porque a MIM possui as cavidades do AM no filme, tornando assim a superfície com uma rugosidade maior.

CONCLUSÃO

Para o Capítulo 5 todos os experimentos foram realizados de forma satisfatória. As isotermas de DPPC na presença e ausência do AM na subfase tiveram resultados satisfatórios e de acordo com a literatura, demonstrando que o AM permanece na interface água, tornando a monocamada mais fluída. As deposições dos filmes via LS também ocorreram de acordo com o previsto. A permanência do AM no filme após a deposição no ITO foi confirmada através das técnicas de UV-Vis e Raman, onde apresentaram as bandas referentes ao corante no filme de DPPC+AM. A remoção do AM do eletrodo foi realizada imergindo o eletrodo em água ultrapura, e as caracterizações do UV-Vis e do Raman novamente demonstraram que o AM foi removido do filme com sucesso, devido ao desaparecimento das bandas referentes ao corante.

As VC em KCl (0,1 mol/L) demonstraram que apenas o eletrodo modificado de DPPC+AM apresentou par redox referente ao AM, enquanto o ITO, o ITO/DPPC e o ITO/MIM não apresentaram esse perfil. Observou-se ainda uma diferença no comportamento eletroquímico entre o eletrodo de ITO/DPPC com o do ITO/MIM, uma vez que o MIM apresentou o mesmo perfil da voltametria de ITO/DPPC+AM, podendo ser um indicador de que a MIM estaria sendo formada. Quando colocados em solução de AM, o eletrodo de ITO/DPPC foi o que apresentou a menor intensidade de corrente para o AM, o que já era esperado por se tratar de uma camada isolante. Já o ITO/DPPC+AM apresentou a maior intensidade de corrente, também esperado devido a somatória do AM contido na solução e no eletrodo. O ITO/MIM apresentou intensidade de corrente superior aos eletrodos ITO/DPPC e o ITO não modificado.

Porém a metodologia estudada no Capítulo 5 para a formação das impressões moleculares do AM não apresentou boa seletividade, estudados com a quercetina, e nem um aumento significativo na sensibilidade quando comparado ao não modificado. Com isso foi realizado uma nova metodologia no Capítulo 6. Onde foi adicionado ao sistema

o polieletrólito PAH. Os filmes de Langmuir para o DPPC+PAH não demonstraram diferença no perfil da isoterma π -A se comparado a isoterma do DPPC puro. A diferença obtida foi no valor da área extrapolada, onde indicava que cada molécula estava ocupando uma área média maior durante o empacotamento de DPPC+PAH. Para o DPPC+PAH+AM o início da fase líquido-expandido foi em uma área maior que a isoterma sem o PAH, deslocando a isoterma para maior área. Ao final da isoterma, apresentou-se um platô podendo ser ocasionado pela interação do PAH com o AM, porém o empacotamento não conseguiu expulsar o corante da interface ar-água, tornando a monocamada mais fluída.

As deposições de LS ocorreram de forma satisfatória, onde foi demonstrado através dos espectros do crescimento do filme para o DPPC+PAH+AM, realizados no UV-Vis, a presença do AM no filme, assim também como o aumento na banda referente ao AM conforme foram realizadas as três camadas de deposição LS. A presença do corante também foi confirmada através da espectroscopia Raman, onde estavam presentes as bandas referentes ao corante. Após a retirada do AM do filme, resultando no eletrodo contendo a MIM, os espectros de UV-Vis e de Raman mostraram o desaparecimento das bandas referentes ao corante, demonstrando assim a remoção satisfatória do AM do eletrodo.

Para as caracterizações eletroquímicas, a voltametria cíclica de ITO/DPPC+PAH+AM mostrou o par redox referente ao AM, novamente comprovando a presença do corante no eletrodo. Posteriormente foi realizada a remoção do AM do eletrodo, utilizando a voltametria cíclica. O eletrodo foi ciclado por 26 vezes, até o desaparecimento dos picos referente a oxidação e redução do AM, sendo comprovada a remoção através do DPV realizado após o 26º ciclo, onde não apresentou o pico de

oxidação referente ao AM, resultando assim no eletrodo de ITO/MIM, contendo as cavidades referentes ao azul de metileno.

Então foi realizado o teste em solução de AM com o ITO/MIM. O eletrodo foi imerso em uma solução de 1×10^{-6} mol/L de AM em água ultrapura pelos tempos de 10, 20 e 30 minutos. Depois de realizado o DPV do filme nos diferentes tempos, concluiu-se que o eletrodo detectava o AM, e com 20 minutos teve-se o seu maior pico de AM, concluindo que com este tempo as cavidades da MIM já estavam preenchidas. Com isso, foi realizado o limite de detecção, onde o ITO/MIM foi imerso por 20 minutos soluções de AM com concentrações variando de 4×10^{-7} a 1×10^{-6} mol/L. Todas as concentrações foram realizadas apenas em um eletrodo, e o sensor conseguiu detectar todas as concentrações, após ser limpo ciclando 3 vezes em VC após cada concentração, mostrando assim que o sensor é reutilizável.

O experimento foi realizado em triplicata, todas as concentrações foram detectadas pelo eletrodo. Após a realização do DPV para as diferentes concentrações, obteve-se a curva de calibração da detecção do AM, onde posteriormente realizando o cálculo, foi obtido um valor de limite de detecção de $3,4 \times 10^{-7}$ mol/L.

O teste de seletividade foi realizado com a quercetina, em concentração de 1×10^{-6} mol/L. O ITO/MIM foi imerso em solução de quercetina por 20 minutos, e após a realização do DPV concluiu-se que o eletrodo não apresentou nenhum pico referente a quercetina, sendo o sensor de ITO/MIM seletivo para o AM. Por fim, foram realizadas os AFM para o substrato de BDD, e os filmes de DPPC, DPPC+PAH, DPPC+PAH+AM e MIM. Todos os AFM foram realizadas conforme o esperado tendo a rugosidade para o DPPC+PAH+AM maior que para os outros filmes. Isto ocorre devido ao AM permanecer no filme, aumentando assim o tamanho da amplitude do filme, consequentemente aumentando a rugosidade do mesmo. Quando se retira o AM do filme, tem-se uma

diminuição da rugosidade, devido as impressões moleculares do corante que ficaram no filme, aumentando a amplitude, conseqüentemente a rugosidade, em relação ao DPPC+PAH e diminuindo em relação ao DPPC+PAH+AM.

Com isso conclui-se que o sensor fabricado para a detecção de AM, utilizando a MIM, após as modificações para o Capítulo 6, foi realizado com sucesso, obtendo assim um limite de detecção aceitável de $3,4 \times 10^{-7}$ mol/L, além de ser seletivo ao azul de metileno e reutilizável. Assim foi realizado um sensor, utilizando da tecnologia das impressões moleculares, de fácil metodologia e que atende aos requisitos de bom limite de detecção e de boa seletividade.

REFERÊNCIAS

- [1] LI, H. et al. Recent progress in homogeneous electrochemical sensors and their designs and applications. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, China, v. 156, p. 116712, 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2022.116712>.
- [2] HULANICKI A.; GLAB S.; INGMAN F., Chemical sensors: Definitions and classification. **Pure&App/. Chem.**, v. 63, n. 9, p. 1247-1250, 1991.
- [3] BARANWAL, J. et al. Electrochemical Sensors and Their Applications: a review. **Chemosensors**, v. 10, n. 9, p. 363, 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/chemosensors10090363>.
- [4] JIN, R. et al. Tandem catalysis driven by enzymes directed hybrid nanoflowers for on-site ultrasensitive detection of organophosphorus pesticide. **Biosensors And Bioelectronics**, v. 141, p. 111473, 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2019.111473>.
- [5] Menezes, E.W. et al. Gold nanoparticle/charged silsesquioxane films immobilized onto Al/SiO₂ surface applied on the electrooxidation of nitrite. **J Solid State Electrochem** v. 16, p. 3703–3713, 2012. <https://doi.org/10.1007/s10008-012-1782-8>.
- [6] RIBEIRO, C. M. et al. Application of a nanostructured platform and imprinted sol-gel film for determination of chlorogenic acid in food samples. **Talanta**, v. 156-157, p. 119-125, 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2016.05.020>.
- [7] YANG, H. et al. Synthesis, performance, and application of molecularly imprinted membranes: a review. **Journal Of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 6, p. 106352, 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2021.106352>.
- [8] DICKEY, F. H. The Preparation of Specific Adsorbents. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 35, n. 5, p. 227-229, 1949. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.35.5.227>.
- [9] WULFF, G.; VESPER, W.; GROBE-EINSLER, R.; SARHAN, A. Enzyme-analogue built polymers, 4. On the synthesis of polymers containing chiral cavities and their use for the resolution of racemates. **Die Makromolekulare Chemie**, v. 178, n. 10, p. 2799-2816, 1977. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/macp.1977.021781004>.
- [10] WULFF, G.; SARHAN, A. The Use of Polymers with Enzyme Analogous Structures for the Resolution of Racemates. **Angew. Chem.,Int. Ed. Engl.**, v. 11, p. 341–344, 1972.
- [11] YOSHIKAWA, M.; THARPA, K.; DIMA, Ș. Molecularly Imprinted Membranes: past, present, and future. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 19, p. 11500-11528, 2016. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00098>.
- [12] GAO, M. et al. Recent Advances and Future Trends in the Detection of Contaminants by Molecularly Imprinted Polymers in Food Samples. **Frontiers In Chemistry**, v. 8, p. 1-20, 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fchem.2020.616326>.

- [13] BELBRUNO, J. J. Molecularly Imprinted Polymers. **Chemical Reviews**, v. 119, n. 1, p. 94-119, 24 set. 2018. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00171>.
- [14] TORRES-CARTAS, S. et al. Recent Advances in Molecularly Imprinted Membranes for Sample Treatment and Separation. **Separations**, v. 7, n. 4, p. 69, 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/separations7040069>.
- [15] ZHANG, J. et al. Extraction of activated epimedium glycosides in vivo and in vitro by using bifunctional-monomer chitosan magnetic molecularly imprinted polymers and identification by UPLC-Q-TOF-MS. **Talanta**, v. 219, p. 121350, 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121350>.
- [16] DERGUNOV, S. A.; PINKHASSIK, E. Functionalization of Imprinted Nanopores in Nanometer-Thin Organic Materials. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 47, n. 43, p. 8264-8267, 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/anie.200803261>.
- [17] DANILA, D. C. et al. Directed Assembly of Sub-Nanometer Thin Organic Materials with Programmed-Size Nanopores. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 47, n. 37, p. 7036-7039, 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/anie.200801814>.
- [18] SIMONS, K., IKONEN E. Functional rafts in cell membranes. **Nature**. v. 387, p. 569–572, 1997.
- [19] SINGER, S. J.; NICOLSON, G. L. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. **Science**, v. 175, n. 4023, p. 720-731, 1972. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.175.4023.720>.
- [20] NICOLSON, G. L.; MATTOS, G. F. de. Fifty Years of the Fluid–Mosaic Model of Biomembrane Structure and Organization and Its Importance in Biomedicine with Particular Emphasis on Membrane Lipid Replacement. **Biomedicines**, v. 10, n. 7, p. 1711, 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines10071711>.
- [21] MORITA, S.; IKEDA, Y. Regulation of membrane phospholipid biosynthesis in mammalian cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 206, p. 115296, 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115296>.
- [22] LIPOWSKI, R.; SACKMANN, E., **Handbook of Biological Physics**, Amsterdam, Elsevier, 1995.
- [23] RUIZ, G. C. M. et al. Chemical and morphological effects of the contraceptive hormone 17 α -ethynylestradiol on fluid lipid membranes. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, v. 204, p. 111794, 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111794>.
- [24] MAXIMINO, M. D.; MARTIN, C. S.; ALÉSSIO, P. Bisphenol A exposure induces multiple effects in DOPC membrane models. **Journal Of Molecular Liquids**, v. 359, p. 119253, 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molliq.2022.119253>.

- [25] PEREIRA, M. S.; MAXIMINO, M. D.; MARTIN, C. S.; AOKI, P. H.B.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N.; ALESSIO, P. Lipid-matrix effects on tyrosinase immobilization in Langmuir and Langmuir-Blodgett films. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, n. 1, p. 1-13, 2021. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765202120200019>.
- [26] MARTIN, C. S.; OLIVEIRA, M. J.s.; MAXIMINO, M. D.; PAZIN, W. M.; CONSTANTINO, C. J.L. Synergetic effect of silver nanoparticles and thiram on lipid bilayers. **Journal Of Molecular Liquids**, v. 348, p. 118406, 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molliq.2021.118406>.
- [27] ZHAO, J. et al. Mimicking Cellular Metabolism in Artificial Cells: universal molecule transport across the membrane through vesicle fusion. **Analytical Chemistry**, v. 94, n. 9, p. 3811-3818, 2022. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.1c04696>.
- [28] FURINI, L. N.; FERNANDES, J. D.; VIEIRA, D. H.; MORATO, L.F. do C.; ALVES, N.; CONSTANTINO, C.J.L. Combining Impedance Spectroscopy and Information Visualization Methods to Optimize the Detection of Carbendazim Using Layer-by-Layer Films. **Chemosensors**, v. 11, n. 4, p. 213, 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/chemosensors11040213>.
- [29] SHAO, S. et al. Layer-by-Layer Assembly of Lipid Nanobubbles on Microneedles for Ultrasound-Assisted Transdermal Drug Delivery. **Acs Applied Bio Materials**, v. 5, n. 2, p. 562-569, 2022. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acsabm.1c01049>.
- [30] RAMSDEN, J. J. Nanomaterials and their Production. **Nanotechnology**, p. 101-124, 2011. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-08-096447-8.00006-5>.
- [31] SHII, T.; MURO, J. The fractal aspects of suminagashi and marbling. **Thin Solid Films**, v. 178, n. 1-2, p. 109-113, 1989. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0040-6090\(89\)90292-7](http://dx.doi.org/10.1016/0040-6090(89)90292-7).
- [32] LANGMUIR, I. The Constitution and Fundamental Properties of Solids and Liquids. II. Liquids. **Journal Of The American Chemical Society**, v. 39, n. 9, p. 1848-1906, 1917. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ja02254a006>.
- [33] PETTY, M.C. **Langmuir-Blodgett Films – an Introduction**, Cambridge, Cambridge University Press, 1996.
- [34] PENG, J.B; BARNES, G.T; GENTLE, I.R. The structures of Langmuir–Blodgett films of fatty acids and their salts. **Advances In Colloid And Interface Science**, v. 91, n. 2, p. 163-219, 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0001-8686\(99\)00031-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0001-8686(99)00031-7).
- [35] DAVIES, J.T.; RIDEAL, E.K., **Interfacial Phenomena**. New York, Academic Press, 1963.

- [36] BLODGETT, K. B. Films Built by Depositing Successive Monomolecular Layers on a Solid Surface. **Journal Of The American Chemical Society**, v. 57, n. 6, p. 1007-1022, 1935. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ja01309a011>.
- [37] LANGMUIR, I.; SCHAEFER, V. J. Activities of Urease and Pepsin Monolayers. **Journal Of The American Chemical Society**, v. 60, n. 6, p. 1351-1360, 1938. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ja01273a023>.
- [38] SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de Análise Instrumental**, Toronto, Bookman; 2002.
- [39] LAMBERT, J.B. et al. **Organic Structural Spectroscopy**, Toronto, Prentice Hall, 1998.
- [40] LASERNA, J.J. **Modern Techniques in Raman Spectroscopy**, Toronto, John Wiley & Sons, 1996.
- [41] AROCA, R. **Surface Enhanced Vibrational Spectroscopy**, New York, John Wiley & Sons, 2006.
- [42] SALA, O. **Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho**, Editora da Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 1996.
- [43] MCCREERY, R. L. **Raman Spectroscopy for Chemical Analysis**, Toronto, Wiley-Interscience, 2000.
- [44] BINNIG, G.; QUATE, C. F.; GERBER, Ch.. Atomic Force Microscope. **Physical Review Letters**, California, v. 56, n. 9, p. 930-933, 3 mar. 1986. American Physical Society (APS). <http://dx.doi.org/10.1103/physrevlett.56.930>.
- [45] PEDROSO, G.. Microscópio de força atômica: uma ferramenta útil no universo nanométrico. 2022. 36 f. TCC - Graduação em Física, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2022.
- [46] HORNYAK, G.L.; PESCHEL, St.; SAWITOWSKI, Th.; SCHMID, G.. TEM, STM and AFM as tools to study clusters and colloids. **Micron**, Alemanha, v. 29, n. 2-3, p. 183-190, abr. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0968-4328\(97\)00058-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0968-4328(97)00058-9).
- [47] IKAI, A.. STM and AFM of bio/organic molecules and structures. **Surface Science Reports**, Japão, v. 26, n. 8, p. 261-332, 1996. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0167-5729\(97\)80003-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0167-5729(97)80003-9).
- [48] WITHERS, J. R.; ASTON, D. E.. Nanomechanical measurements with AFM in the elastic limit. **Advances In Colloid And Interface Science**, Estados Unidos, v. 120, n. 1-3, p. 57-67, jun. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2006.03.002>.
- [49] NANOTECHNOLOGY, London Centre For. **Atomic Force Microscopy (AFM)**. Disponível em: <https://www.london-nano.com/services/techniques/atomic-force-microscopy>. Acesso em: 15 jun. 2014.

- [50] RESEARCH, Oxford Instruments Asylum. **Atomic Force Microscopy Probes**. Disponível em: https://www.photonics.com/Products/Atomic_Force_Microscopy_Probes/pr61333. Acesso em: 15 jun. 2014.
- [51] AZONANO. **Applied Nanostructures SensaProbes**. Disponível em: <https://www.azonano.com/equipment-details.aspx?EquipID=376>. Acesso em: 15 jun. 2014.
- [52] NANOANDMORE. **OSCM-PT**. Disponível em: <https://www.nanoandmore.com/sea/AFM-Tip-OSCM-PT>. Acesso em: 15 jun. 2014.
- [53] ADAMA. **Sharp single crystal diamond afm probes**. Disponível em: <https://www.adama.tips>. Acesso em: 15 jun. 2014.
- [54] SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J.; CROUCH, S.R.; **Fundamentos de Química Analítica**, 8a ed., Thomson, São Paulo, 2006.
- [55] MAKARYCHEV-MIKHAILOV, S.; SHVAREV, A.; BAKKER, E. New trends in ion-selective electrodes. **Electrochemical Sensors, Biosensors And Their Biomedical Applications**, p. 71-114, 2008. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-012373738-0.50006-4>.
- [56] HORWOOD, C. Ionic liquids as electrolytes for electrochemistry. **Ionic Liquids In Analytical Chemistry**, p. 329-342, 2022. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-823334-4.00012-6>.
- [57] BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A., **Electroquímica: Princípios, Métodos e Aplicações**, 1ª ed., Editora Almedina, 1996.
- [58] LESLIE, N.; MAUZEROLL, J. Spatially resolved electrochemical measurements. **Reference Module In Chemistry, Molecular Sciences And Chemical Engineering**, 2023. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-323-85669-0.00004-0>.
- [59] VENTON, B. J.; DISCENZA, D. J. Voltammetry. **Electrochemistry For Bioanalysis**, p. 27-50, 2020. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-821203-5.00004-x>.
- [60] DEFFO, G. et al. Differential pulse and square-wave voltammetry as sensitive methods for electroanalysis applications. **Reference Module In Chemistry, Molecular Sciences And Chemical Engineering**, 2023. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-323-85669-0.00040-4>.
- [61] CARPINETTI, L. C. R. *et al.* **Rugosidade Superficial. Conceitos e princípios de medição**. São Carlos: Serviço Gráfico USP – EESC. 2000. 51 p.
- [62] DIVISION, Analytical Chemistry. Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis—II. Data interpretation. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 33, n. 6, p. 241-245, jan. 1978. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0584-8547\(78\)80044-5](http://dx.doi.org/10.1016/0584-8547(78)80044-5).

- [63] YANG, X. M.; XIAO, D.; XIAO, S. J.; WEI, Y. Domain structures of phospholipid monolayer Langmuir-Blodgett films determined by atomic force microscopy. **Applied Physics A Solids And Surfaces**, v. 59, n. 2, p. 139-143, 1994. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00332206>.
- [64] RUIZ, G. et al. Correlating mono- and bilayers of lipids to investigate the pronounced effects of steroid hormone 17 α -ethynylestradiol on membrane models of DPPC/cholesterol. **Journal Of Molecular Liquids**, v. 311, p. 113324, 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molliq.2020.113324>
- [65] KATATA, V. M.; MAXIMINO, M. D.; SILVA, C. Y.; ALESSIO, P. The Role of Cholesterol in the Interaction of the Lipid Monolayer with the Endocrine Disruptor Bisphenol-A. **Membranes**, v. 12, n. 8, p. 729, 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/membranes12080729>.
- [66] PIVETTA, T. P. et al. Incorporation of acridine orange and methylene blue in Langmuir monolayers mimicking releasing nanostructures. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Biomembranes**, v. 1865, n. 5, p. 184156, 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2023.184156>.
- [67] AOKI, P. H. B.; CAETANO, W.; VOLPATI, D.; RIUL, A.; CONSTANTINO, C. J. L. Sensor Array Made with Nanostructured Films to Detect a Phenothiazine Compound. **Journal Of Nanoscience And Nanotechnology**, v. 8, n. 9, p. 4341-4348, 2008. American Scientific Publishers. <http://dx.doi.org/10.1166/jnn.2008.297>.
- [68] MAXIMINO, M. D.; CONSTANTINO, C. J.L.; OLIVEIRA, O. N.; ALESSIO, P. Synergy in the interaction of amoxicillin and methylene blue with dipalmitoyl phosphatidyl choline (DPPC) monolayers. **Applied Surface Science**, v. 476, p. 493-500, 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2019.01.065>.
- [69] AOKI, P. H. B.; VOLPATI, D.; RIUL, A.; CAETANO, W.; CONSTANTINO, C. J. L. Layer-by-Layer Technique as a New Approach to Produce Nanostructured Films Containing Phospholipids as Transducers in Sensing Applications. **Langmuir**, v. 25, n. 4, p. 2331-2338, 2009. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/la802696j>.
- [70] AOKI, P. H. B. Filmes nanoestruturados de fosfolipídios como sistemas miméticos de membrana biológica para aplicação em sensores via sers e espectroscopia de impedância. 2011. 161 f. **Dissertação (mestrado)** - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências e Tecnologia, 2011. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/99692>>.
- [71] CAMACHO, S. A. et al. The efficiency of photothermal action of gold shell-isolated nanoparticles against tumor cells depends on membrane interactions. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, v. 211, p. 112301, 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112301>.
- [72] MARYAM, T. et al Encapsulated Liposomal Formulation: an effective treatment modality against copper toxicity associated liver dysfunction and neurobehavioral

abnormalities in wistar rats. **Molecules**, v. 28, n. 3, p. 1514, 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules28031514>.

[73] NICOLAI, S. H. A.; RUBIM, J. C. Surface-Enhanced Resonance Raman (SERR) Spectra of Methylene Blue Adsorbed on a Silver Electrode. **Langmuir**, v. 19, n. 10, p. 4291-4294, 2003. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/la034076v>.

[74] DJUNAIDI, M. C.; MAHARANI, N. D.; GUNAWAN; KHASANAH, M. Eugenol-based molecular imprinted membrane synthesis as a glucose sensor in honey. **Materials Today: Proceedings**, v. 80, p. 1195-1204, 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.matpr.2022.12.198>.

[75] LANGE, M. J.L. de; BONN, M.; MÜLLER, M. Direct measurement of phase coexistence in DPPC/cholesterol vesicles using Raman spectroscopy. **Chemistry And Physics Of Lipids**, v. 146, n. 2, p. 76-84, 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2006.12.007>.

[76] LI, C.; HUANG, Y.; LAI, K.; RASCO, B. A.; FAN, Y. Analysis of trace methylene blue in fish muscles using ultra-sensitive surface-enhanced Raman spectroscopy. **Food Control**, v. 65, p. 99-105, 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.01.017>.

[77] MOGHARI, Mahdieh Dashtbani. OPTIMISED METHYLENE-BLUE DETECTION AND QUANTIFICATION UTILISING CONVENTIONAL RAMAN SPECTROSCOPY. 2016. 73 f. **Tese (Doutorado)** - Curso de Física e Astronomia, Macquarie University, Austrália, 2016.

[78] HOYO J., GUAUS E., ONCINS G., TORRENT-BURGUÉS J., and SANZ F. Incorporation of Ubiquinone in Supported Lipid Bilayers on ITO. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 117, n.25, p. 7498-7506, 2013. DOI: 10.1021/jp4004517.

[79] NICOLAI, S. H. de A.; RODRIGUES, P. R.P; AGOSTINHO, S. M.L; RUBIM, J. C. Electrochemical and spectroelectrochemical (SERS) studies of the reduction of methylene blue on a silver electrode. **Journal Of Electroanalytical Chemistry**, v. 527, n. 1-2, p. 103-111, 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0022-0728\(02\)00832-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0022-0728(02)00832-x).

[80] KARA, P. et al. Electrochemical genosensor for the detection of interaction between methylene blue and DNA. **Electrochemistry Communications**, v. 4, n. 9, p. 705-709, 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1388-2481\(02\)00428-9](http://dx.doi.org/10.1016/s1388-2481(02)00428-9).

[81] LI, Y. et al. Quercetin, Inflammation and Immunity. **Nutrients**, v. 8, n. 3, p. 167, 15 2016. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nu8030167>.

[82] SINGH, P.; ARIF, Y.; BAJGUZ, A.; HAYAT, S. The role of quercetin in plants. **Plant Physiology And Biochemistry**, v. 166, p. 10-19, 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.05.023>.

[83] ZHANG, D. et al. Analysis of the Antioxidant Capacities of Flavonoids under Different Spectrophotometric Assays Using Cyclic Voltammetry and Density Functional

Theory, **J. Agric. Food Chem.**, v. 59, n. 18, p. 10277-10285, 2011. <https://doi.org/10.1021/jf201773q>.

[84] LIU, J. et al. A biomass-derived porous carbon-based nanocomposite for voltammetric determination of quercetin. **Microchimica Acta**, v. 186, n. 12, p. 1, 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00604-019-3953-0>.

[85] ALESSIO, P.; AOKI, P. H. B.; SAEZ, J. A. de S.; RODRÍGUEZ-MÉNDEZ, M. L.; CONSTANTINO, C. J. L. Combining SERRS and electrochemistry to characterize sensors based on biomembrane mimetic models formed by phospholipids. **Rsc Advances**, v. 1, n. 2, p. 211, 2011. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c1ra00141h>.

[86] AOKI, P. H. B.; ALESSIO, P.; RODRÍGUEZ-MÉNDEZ, M. L.; SAEZ, J. A. de S.; CONSTANTINO, C. J. L. Taking Advantage of Electrostatic Interactions To Grow Langmuir–Blodgett Films Containing Multilayers of the Phospholipid Dipalmitoylphosphatidylglycerol. **Langmuir**, Brasil, v. 25, n. 22, p. 13062-13070, 14 jul. 2009. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/la901923v>.

[87] WANG, R. *et al.* A Molecularly Imprinted Fluorescence Sensor Based on the ZnO Quantum Dot Core–Shell Structure for High Selectivity and Photolysis Function of Methylene Blue. **Acs Omega**, v. 5, n. 32, p. 20664-20673, 6 ago. 2020. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acsomega.0c03095>.

[88] TIMBOLA, A.K.; SOUZA, C. D. de; GIACOMELLI, C.; SPINELLI, A.. Electrochemical oxidation of quercetin in hydro-alcoholic solution. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 1, p. 139-148, fev. 2006. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-50532006000100020>.

[89] SUFFREDINI, H. B. *et al.* AFM studies and electrochemical characterization of boron-doped diamond surfaces modified with metal oxides by the Sol-Gel method. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 2, p. 257-264, abr. 2006. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-50532006000200007>.

[90] GUIMARAES, G. A. A. *et al.* Development and application of electrochemical sensor of boron-doped diamond (BDD) modified by drop casting with tin hexacyanoferrate. **Journal Of Solid State Electrochemistry**, v. 24, n. 8, p. 1769-1779, 3 abr. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10008-020-04558-6>.

[91] LVARES, D. S.; FANANI, M. L.; RUGGIERO NETO, J.; WILKE, N.. The interfacial properties of the peptide Polybia-MP1 and its interaction with DPPC are modulated by lateral electrostatic attractions. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Biomembranes**, v. 1858, n. 2, p. 393-402, fev. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.12.010>