

Mariana Carvalhaes Gallo

Obtenção de sensores electroquímicos e ópticos formados por filmes automontados de nanopartículas de ouro e porfirina

Mestrado em Química

Departamento de Química

FCTUC

Julho/2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Agradecimentos

À Deus, por tudo!

Aos meus pais, Mário e Lourdes, por terem acreditado e investido em mim, por todo o apoio, carinho e compreensão em todo esse percurso mesmo com todos os quilómetros de distancia.

Aos professores, Dr. Hugh Douglas Burrows, Dra Marta Piñeiro e Dr. Juliano Alves Bonacin pelo apoio, orientação e amizade.

Aos amigos/irmãos, Sergio e Eduardo pelas loucuras e discussões no desenvolvimento da síntese da porfirina e pelo fornecimento da MnTPFPP.

Às queridas Margarida Trindade e Andreia Oliveira por me fazer sentir tão bem estando tão longe de casa e por serem minhas irmãzinhas portuguesas que irei levar pra sempre no coração.

Aos amigos que conquistei no período de pesquisa na UNICAMP, Pâmyla Santos, Bruno Morandi, Kalil e Sabrina, que mesmo em meio de tanto trabalho e colaboração, sempre há motivos para sorrir (e um tempo para um bom pão de queijo com suco na lanchonete do ciclo-básico, gordices da feirinha, etc).

Aos membros do grupo do Laboratório Integrado de Química Inorgânica, LIQI, da UNICAMP por todo apoio.

À querida técnica Cíntia, que sempre mostrou disposição e um belo sorriso no rosto a cada pedido de socorro.

Ao Prof. Dr. André Formiga, pela colaboração directa ou indirectamente.

Ao departamento de Química da Universidade de Coimbra, pela autorização em realizar a pesquisa fora dos limites da Universidade

À Universidade de Campinas, por ter me recebido como aluna de intercambio pelo período de desenvolvimento deste trabalho.

À FEPEX-UNICAMP pelo apoio financeiro do projecto.

Índice

Índice	iii
Índice de figuras	v
Índice de tabelas	vii
Abreviações.....	ix
Resumo	xi
Abstract	xiii
Capítulo 1	1
Introdução.....	1
1.1. Propriedades das porfirinas	1
1.1.1. Síntese da porfirina	6
1.2. Nanopartículas de ouro.....	8
1.3. Cisteína	10
1.4. Sensores químicos.....	11
Capítulo 2.....	13
Resultados e Discussão	13
2.1 Síntese da MnTPFPP	13
2.2. Síntese da AuNP.....	18
2.3. Modificação dos eléctrodos.....	19
2.4. Estudos electroquímicos.....	20
2.4.1. Estudos electroquímicos da MnTPFPP	20
2.4.2. Estudo electroquímico dos eléctrodos modificados	22
2.4.3. Caracterização analítica.....	25
Capítulo 3	31
Conclusões	31
Capítulo 4.....	33
Experimental.....	33
4.1 Material e métodos	33

4.1.1. Reagentes	33
4.1.2. Procedimentos e equipamentos.....	34
4.1.2.1. Solução tampão.....	34
4.2. Síntese da MnTPFPP	35
4.3. Síntese das nanopartículas de ouro	36
4.4. Modificação dos eléctrodos de FTO	36
Bibliografia	39
Apêndices	45

Índice de figuras

Figura 1. Estrutura do pirrol (A) e base estrutural de um anel porfirínico (B).....	2
Figura 2. Espectro UV-Vis típico da porfirina. ⁴	3
Figura 3. Esquema dos quatro orbitais de Gouterman.....	4
Figura 4. Transições electrónicas segundo o modelo dos quatro orbitais de fronteira de Gouterman.....	5
Figura 5. Espectro de absorção de uma porfirina em estado de protonação (linha cheia) e desprotonada (linha pontilhada). ¹²	6
Figura 6. Síntese da tetrafenilporfirina realizada por Rothemund.....	7
Figura 7. Síntese de porfirinas segundo a metodologia de Lindsey.....	8
Figura 8. Taça de Licurgo, sob a luz do sol (A) e com foco de luz interna (B).....	9
Figura 9. Estrutura da <i>L</i> -cisteína.....	10
Figura 10. Exemplos de sensores químicos e físicos: (A) detector de CO, (B) glicosímetro e (C) sensor de radiação ultravioleta.....	11
Figura 11. (A) estrutura da H ₂ TPFPP e (B) estrutura da MnTPFPP.....	14
Figura 12. Espectro electrónico para a H ₂ TPFPP (vermelho) e MnTPFPP (preto).....	14
Figura 13. Estrutura da 4-mercaptopiridina.....	16
Figura 14. Espectro electrónico do estudo cinético da reacção da MnTPFPP com 4-MPy, sendo o espectro pontilhado para a 4-MPy e o espectro preto em destaque a MnTPFPP. Em destaque a variação da absorbância das bandas em <i>w</i> tempo para as bandas em 276 nm (preto), 367 nm (azul) e 474 nm (vermelho).....	17
Figura 15. Espectro electrónico da AuNP.....	18

Figura 16. Espectro de absorção UV-Vis da MnTPFPP em solução de CH ₂ Cl ₂ (linha tracejada) e do eléctrodo modificado com AuNP/MnTPFPP (linha cheia). Em destaque, a banda-Q presente na região entre 500 e 600 nm.....	20
Figura 17. Voltamograma cíclico da MnTPFPP em MeCN 0,1M de TBAPF ₆ , com velocidade de varredura de 50, 100 e 200 mV.s ⁻¹	21
Figura 18. Estrutura da MnTPP(CH ₃ COO)	22
Figura 19. Voltamogramas cíclicos para o electrodo de FTO limpo em soluções tampão com pH 5,00, pH 6, 00 e pH 7,00 com velocidade de varredura de 50 mV.s ⁻¹ , sem adição de cisteína (linha me preto) e com sucessivas adições de 100 µL a partir de uma solução estoque de 4,98 mM.....	23
Figura 20. Voltamogramas cíclicos em pH 7,00, com velocidade de varredura de 50 mV.s ⁻¹ sem a adição de cisteína (linha em preto) e com a adição sucessiva de 100 µL da solução estoque com 4,98 mmol.L ⁻¹ de cisteína para os eléctrodos de FTO sem modificação, e modificados com AuNP, com MnTPFPP e com AuNP/MnTPFPP.	24
Figura 21. Curva analítica de [cys] vs corrente, com velocidade de varredura de 50 mV.s ⁻¹ . (■) Eléctrodo de FTO limpo e modificado com (▼) AuNP, (●) MnTPFPP e (▲) AuNP/MnTPFPP	25
Figura 22. Resposta cronoamperométrica observada apos sucessivas adições de cys 4,98 mmol.L ⁻¹ de solução estoque em tampão BRB 0,1 M em pH 7,00 para o eléctrodo de FTO modificado com AuNP/MnTPFPP. Potencial aplicado de 75 mV <i>vs</i> Ag/AgCl.....	26
Figura 23. Curva de calibração.....	27
Figura 24. Eléctrodos de FTO após a modificação. (1) eléctrodo limpo, e modificado com (2) AuNP, (3) MnTPFPP e (4) AuNP/MnTPFPP	38

Índice de tabelas

Tabela 1. Bandas de absorção para a H ₂ TPFPP. ⁶	15
Tabela 2. Comparação dos materiais utilizados para a detecção amperométrica da cisteína.....	29

Abreviações

- HOMO – Highest occupied molecular orbital
LUMO – Lowest unoccupied molecular orbital
AuNP – nanopartículas de ouro
FTO – eletrodo de vidro dopado com óxido de estanho
Cys – *L*-cisteína
HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência
BRB – tampão Britton-Robson
4-MPy – 4-mercaptopiridina
MPA – ácido 3-mercaptopropiônico
TBAPF₆ – tetrabutilamonio hexafluorofosfato
pH – potencial hidrogênionico
CH₂Cl₂ – diclorometano
CDCl₃ – clorofórmio deuterado
ppm – partes por milhão
MHz - megahertz
DDQ – 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona
BF₃.Et₂O – Boro trifluoreto dietil eterato
LOD – Limite de detecção
LOQ – Limite de quantificação
E⁰ – potencial padrão
MeCN - acetonitrila
TPP – 5,10,15,20-(tetrafenil)porfirina
H₂TPFPP – 5,10,15,20-*tetrakis*-(pentafluorfenil)porfirina
MnTPFPP – 5,10,15,20-*tetrakis*-(pentafluorfenil)porfirina de Manganês (III)
H₃BO₃ – ácido bórico
H₃PO₄ – ácido fosfórico
CH₃COOH – ácido acético
NaOH – hidróxido de sódio

Resumo

A busca de sensores eletroquímicos é uma alternativa para o diagnóstico rápido e confiável de várias doenças, tais como edemas, letargia, mal de Alzheimer, leucemia, diabetes entre outras, que estão associadas às alterações nos níveis de *L*-cisteína pelo que é de grande interesse o desenvolvimento de métodos que permitam uma determinação rápida e fiável dos seus níveis em sistemas biológicos. Os sensores electroquímicos são uma alternativa para a determinação de *L*-cisteína.

Neste trabalho, desenvolveram-se electrodos de FTO modificados com nanopartículas de ouro e porfirina. Para isto foi sintetizada a porfirina 5,10,15,20-*tetrakis*-(pentafluorfenil)porfirina de Manganês (III) através do método aplicado por Lindsey, sendo um processo simples e com bom rendimento, que foi posteriormente derivatizada sintetizando o respectivo complexo de manganês (III). A porfirina foi caracterizada por espectroscopia UV-Vis, ressonância magnética, espectrometria de massas e voltametria cíclica.

Desenvolveu-se um método de preparação dos electrodos modificados e estudaram-se as suas propriedades eletrocatalíticas em solução tampão com pH 7,00, a fim de se obter novos sensores amperométricos na detecção de *L*-cisteína.

O electrodo modificado obtido mostrou boa resposta para a oxidação da *L*-cisteína em estudos amperométricos com valores de mérito comparáveis a outros sensores descritos na literatura.

Abstract

A search of electrochemical sensors is an alternative to the fast and reliable diagnosis of various diseases, such as edema, lethargy, Alzheimer's disease, leukemia, diabetes, among others, which are associated with changes in levels of *L*-cysteine and it is of great interest to develop methods that allow rapid and reliable determination of its levels in biological systems. Electrochemical sensors are an alternative for the determination of *L*-cysteine.

This work was developed FTO electrodes modified with gold nanoparticles and porphyrin. For this porphyrin 5,10,15,20-tetrakis (pentafluorophenyl) porphyrin Manganese (III) by the method used was synthesized by Lindsey, with a simple and good yield, which was subsequently derivatized process of synthesizing the respective complex manganese (III). The porphyrin was characterized by UV-Vis spectroscopy, magnetic resonance, mass spectrometry and cyclic voltammetry.

We developed a method for the preparation of modified electrodes have been studied and its electrochemical properties in buffer solution with pH 7.00 in order to obtain new amperometric sensors for the detection of *L*-cysteine.

The modified electrode obtained showed a good response for the oxidation of *L*-cysteine in amperometric studies, with values comparable with other sensors described in the literature.

Capítulo 1

Introdução

1.1. Propriedades das porfirinas

As porfirinas são compostos macrocíclos bastante presentes na natureza, onde desempenham uma grande variedade de funções biológicas. Estes compostos formam o grupo prostético de muitas metaloproteínas, como a mioglobina e a hemoglobina (que atuam no transporte de oxigénio de gás carbónico).

A primeira proposta da estrutura da porfirina foi descrita por Küster em 1912, mas apenas Fisher, em 1929 realizou com sucesso sua síntese a partir do pirrol.¹ As porfirinas são formadas pela união de quatro anéis pirrólicos ligados por pontes metilénicas, como mostrado na **Figura 1**. O macrociclo porfirínico é um sistema aromático com 22 electrões π e 18 electrões aromáticos, obedecendo a regra de Hückel e apresentando uma geometria consideravelmente planar.

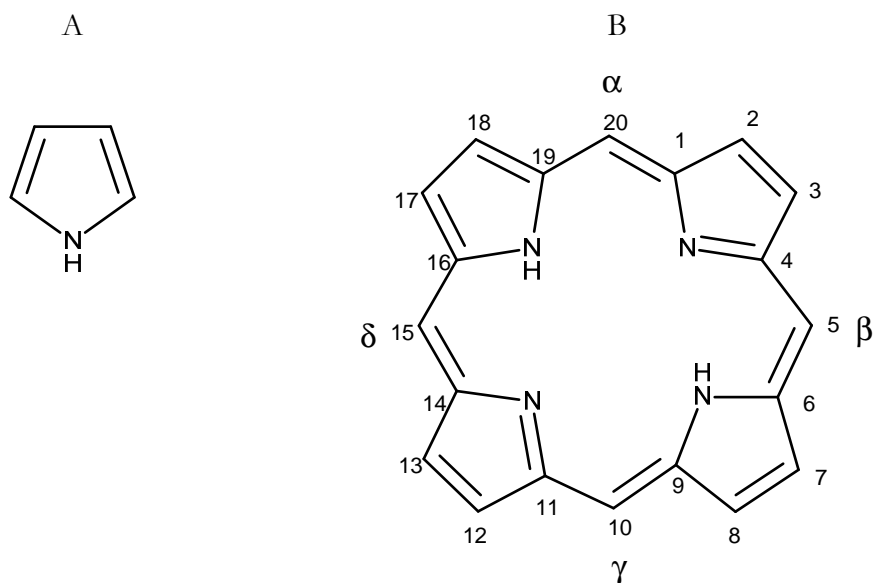


Figura 1. Estrutura do pirrol (A) e base estrutural de um anel porfirínico (B)

As porfirinas são substâncias anfotéricas, apresentam dois nitrogénios protonados e dois não protonados no anel porfirínico da base livre, conforme observado na **Figura 1**. Assim, dois hidrogénios podem ser removidos gerando um diânion, ou adicionados para gerar um dicátion. As propriedades acido-base das porfirinas podem ser influenciadas pelos substituintes presentes no anel. A nomenclatura utilizada para nomear as porfirinas foi estabelecida por Smith e Falk^{2,3}, na qual as posições do anel porfirínico são denominadas de α , β , γ e δ , por *meso* ou ainda pela numeração 5, 10, 15 e 20 de acordo com a mais recente nomenclatura proposta pela IUPAC⁴. A introdução de substituintes nessas posições leva a diferentes propriedades físico-químicas como estabilidade fotoquímica, solubilidade, etc.

As porfirinas apresentam coloração intensa, apresentando espectros de absorção característicos. Devido a sua conjugação cíclica, elas apresentam uma intensa absorção de energia conhecida como Banda Soret ou banda B localizada entre 400 e 420 nm e, na base livre, usualmente quatro bandas Q de menos absorção na região visível, entre 510 e 660 nm, conforme apresentando na **Figura 2**. A intensidade relativa destas bandas sofre alteração devido a perturbação dos níveis de energia electrónicos devido a presença de substituintes na periferia da porfirina.

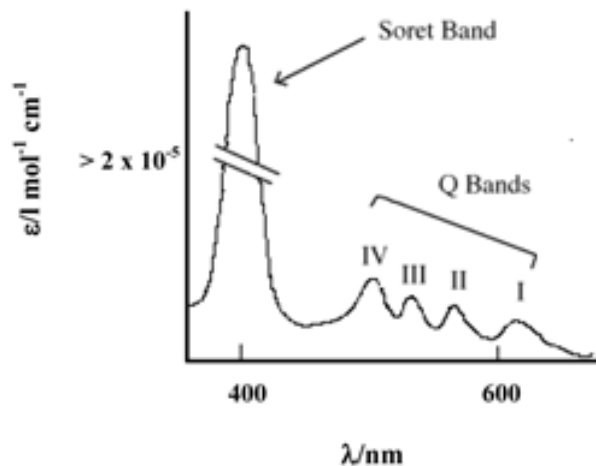


Figura 2. Espectro UV-Vis típico da porfirina. ⁵

As bandas observáveis no espectro de absorção electrónica das porfirinas são devido as transições do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$. O modelo mais simples para explicar as propriedades electrónicas das porfirinas é o dos quatro orbitais de fronteira de Gouterman⁶⁻⁹. Onde, supondo-se que a simetria da porfirina seja D_{2h} , os orbitais ocupados de maior energia, (HOMO, designados por a_{2u} e a_{1u}) se encontram totalmente preenchidos e o orbital vazio de menor energia (LUMO) possui simetria e_g .

Através de cálculos das densidades electrónicas sobre os átomos do anel porfirínico tornaram possíveis uma representação esquemática da distribuição da densidade electrónica nos quatro orbitais envolvidos (**Figura 3**). Os mapas de densidade demonstram a acumulação de electrões π sobre os átomos de nitrogénio pirrólicos, o que sugere que a estabilidade da porfirina está relacionada a presença deste átomos posicionados no esqueleto da porfirina.

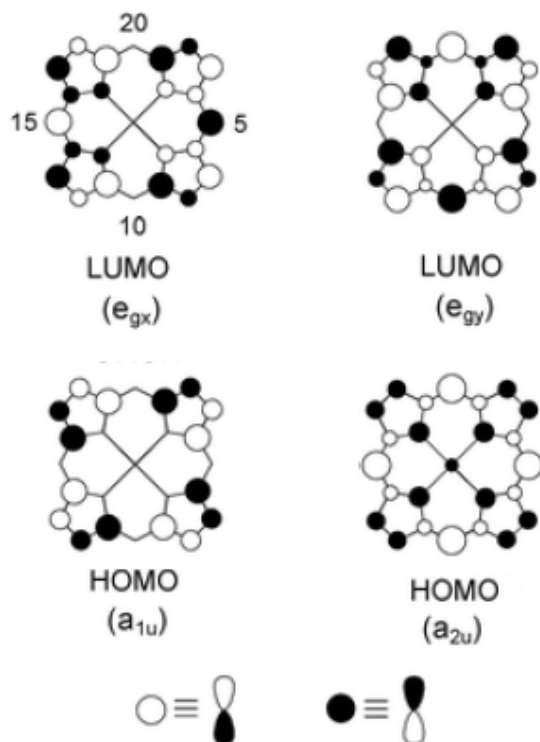


Figura 3. Esquema dos quatro orbitais de Gouterman

Esta representação em diagrama indica que as transições HOMO-LUMO envolvem o deslocamento das densidades electrónicas centralizadas principalmente sobre os átomos de nitrogénio electronegativos para as extremidades do anel porfirínico.

As transições $a_{1u} \rightarrow e_g$ e $a_{2u} \rightarrow e_g$ nas metaloporfirinas resultam em dois estados excitados de simetria E_u com energias próximas. Esta degenerescência é consequência da equivalência dos dipolos nas direcções x e y no plano da molécula¹⁰. Gouterman considerou que interacções de configuração entre estes estados eram de grande importância para a interpretação dos espectros electrónicos das porfirinas. Desta forma, as interacções de configuração resultam em bandas de comprimentos de onda e intensidades diferentes. A interacção construtiva apresenta banda intensa e com menor comprimento de onda (banda Soret ou B), e a interacção destrutiva apresentam bandas com fraca intensidade e maior comprimento de onda (bandas Q).

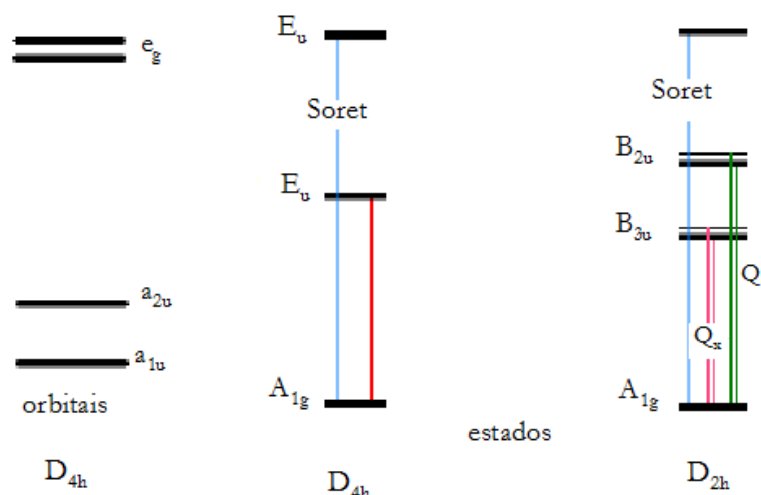


Figura 4. Transições electrónicas segundo o modelo dos quatro orbitais de fronteira de Gouterman.

As metaloporfirinas com simetria D_{4h} apresentam duas bandas Q, sendo uma delas a transição para o estado singleto excitado de menor energia e a segunda é atribuída à transição do estado vibracional v_0 do estado fundamental para o estado vibracional v_1 do estado excitado. No caso das porfirinas base-livre, com a diminuição da simetria de D_{4h} para D_{2h} , os estados E_u passam a ser não degenerados e ocorre o desdobramento dos dipolos de transição nas direcções x e y, consequentemente, surgem duas transições, conforme apresentado na **Figura 4**. A combinação vibrônica destas duas transições resultam nas bandas $Q_{y(1,0)}$, $Q_{y(0,0)}$, $Q_{x(1,0)}$ e $Q_{x(0,0)}$ em ordem decrescente de energia e intensidade, explicando o aparecimento das quatro bandas Q observadas nas porfirinas base-livre.

Uma outra característica interessante destes compostos é a fácil reacção de protonação dos nitrogénios pirrólicos por adição de vapor de HCl e a coordenação de íons ao anel simultaneamente com a perda dos dois protões internos^{11,12}. Os íons H^+ competem com os íons metálicos pelos sítios de coordenação, podendo ser removidos quando tratados com bases fortes, estas reacções podem ser facilmente acompanhadas através da variação do espectro UV-Vis, conforme apresentado na **Figura 5**.

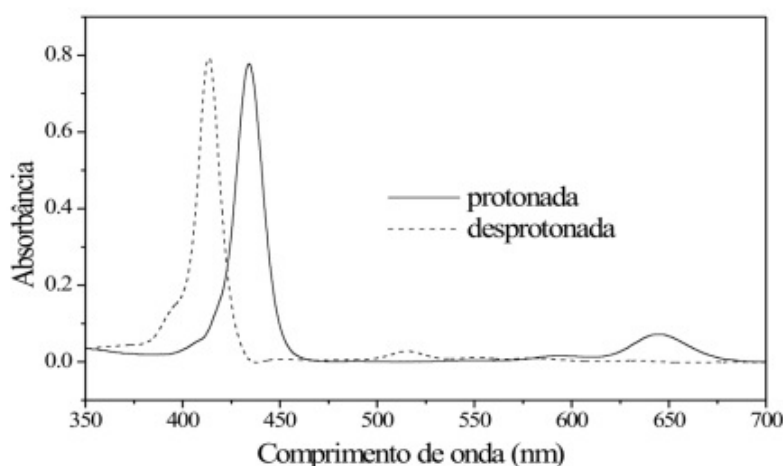


Figura 5. Espectro de absorção de uma porfirina em estado de protonação (linha cheia) e desprotonada (linha pontilhada).¹³

1.1.1. Síntese da porfirina

As porfirinas podem ser obtidas de duas maneiras, pela modificação de uma porfirina natural (como o grupo heme presente na hemoglobina) ou pela síntese total. A modificação de porfirinas naturais possui limitações na escolha dos substituintes devido a dificuldade em alguns grupos sofrerem modificações, sendo assim, a síntese total supera tais limitações.

Em 1929, Fisher foi o primeiro a sintetizar porfirinas com sucesso a partir do pirrol⁴, a partir disso, houveram varias tentativas de aperfeiçoar o processo de síntese. Estas metodologias possuem o mesmo principio básico, onde uma reacção de condensação entre aldeídos e pirróis ou dipirrilmetanos em condições acidas, seguidas da oxidação do porfirinogênio resultando a porfirina correspondente.

A primeira síntese de uma porfirina meso substituída ocorreu em 1935, quando Rothmund conseguiu sintetizar a *meso*-tetrafenilporfirina através da condensação do benzaldeído com o pirrol, tendo piridina como solvente num recipiente pressurizado a 150 °C por 24 horas.¹⁴ Mais tarde, em 1941, Rothmund e Menotti condensaram os mesmos reagentes (pirrol e benzaldeído) em solução de piridina sob ambiente pressurizado a 220°C, tendo como produto a *meso*-tetrafenilporfirina. Esta mesma reacção foi realizada sob refluxo de metanol à pressão atmosférica, obtendo como produto a tetrafenilporfirina e sua respectiva clorina (**Figura 6**), com rendimento inferior a 3%.^{15,16}

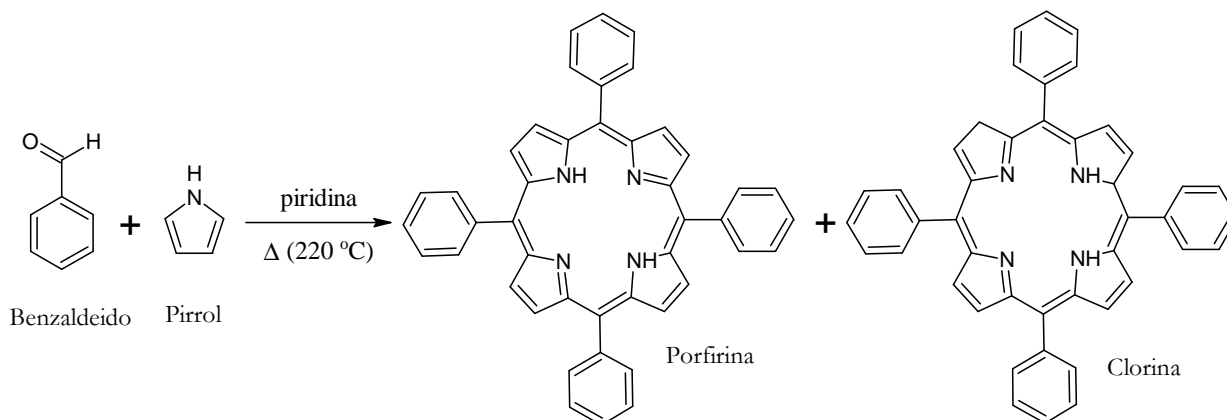


Figura 6. Síntese da tetrafenilporfirina realizada por Rothemund

Um maior avanço na síntese da porfirina ocorreu com o trabalho de Adler e Longo, em 1964. O processo da síntese consistia na reação de benzaldeído com pirrol recém destilado, na proporção de 1:1, em refluxo de ácido propiônico, a 141 °C, por 30 minutos ao ar. Após o refluxo, a solução era enfiada e lavada com metanol. Depois lavada com água quente, e filtrada sob pressão reduzida para retirar o restante de ácido obtendo-se a porfirina na forma de cristais de cor púrpura com rendimento de 20%. Maiores rendimentos, 30-40%, foram obtidos ao utilizar ácido acético, porém, o produto não sofria cristalização no final da reação devido ao elevado valor de pK_a do ácido acético, tornando o processo de isolamento e purificação mais difícil.¹⁷⁻¹⁹

Estas condições permitiram utilizar mais aldeídos substituídos que poderiam ser convertidos nas suas porfirinas correspondentes. Mas ainda assim, este método era limitado por conduzir a uma série de problemas com a formação de vários subprodutos, dificultando a purificação da porfirina já que, assim como a síntese de Rothemund, a porfirina sintetizada era contaminada com a clorina correspondente.²⁰

Desta forma, surgiram muitos estudos na modificação destes métodos, com o intuito de diminuir a quantidade de subprodutos, facilitar a purificação e aumentar o rendimento. Dentre os estudos que se destacam, esta a síntese proposta por Lindsey em 1987¹⁶, que foi a utilizada como rota de síntese no presente trabalho de mestrado.

Este método consiste na reação do pirrol e do aldeído em diclorometano anidro sob atmosfera inerte, na presença de um catalisador ácido, para formar o porfirinogênio. Numa segunda etapa, utiliza-se um oxidante, geralmente o *p*-cloroanil (tetracloro-1,2-benzoquinona) ou DDQ (2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona), para oxidar o porfirinogênio à porfirina (**Figura 7**), podendo chegar a um rendimento de 50% e sem grandes dificuldades de purificação.

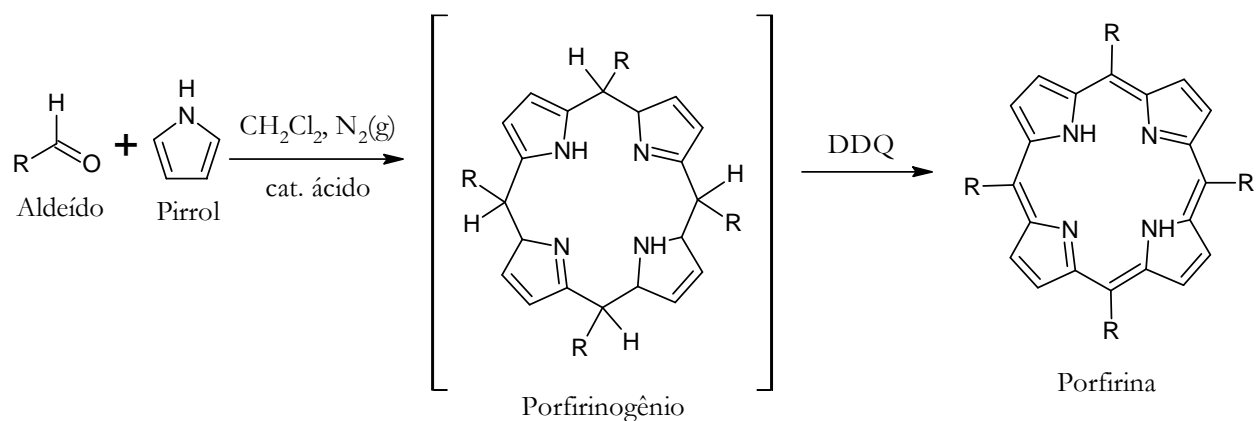


Figura 7. Síntese de porfirinas segundo a metodologia de Lindsey.

1.2. Nanopartículas de ouro

O ouro é um metal que sempre foi considerado especial. Apresenta maleabilidade e pouca reactividade, o que o tornou atractivo desde os tempos pré-históricos. A utilização deste metal em jóias e em outros materiais ornamentais transformou-o em objecto de desejo e exploração intercontinental, e com o tempo este metal foi ganhando mais atenção ao aparecerem as variações em sua cor.

Há indícios de utilização de nanopartículas de ouro no Império Romano, por volta do século 4 a.C.. Trata-se da taça de Licurgo (**Figura 8**) que era feita de vidro e impregnada com nanopartículas de ouro. A taça de Licurgo tornava-se verde quando reflectia a luz do sol e vermelha quando transmitia a luz a partir de um foco de luz situado dentro do vidro. Isto ocorre devido a composição do seu vidro, que contia cerca de 330 ppm de prata e 40 ppm de ouro, ambos no estado coloidal.²¹

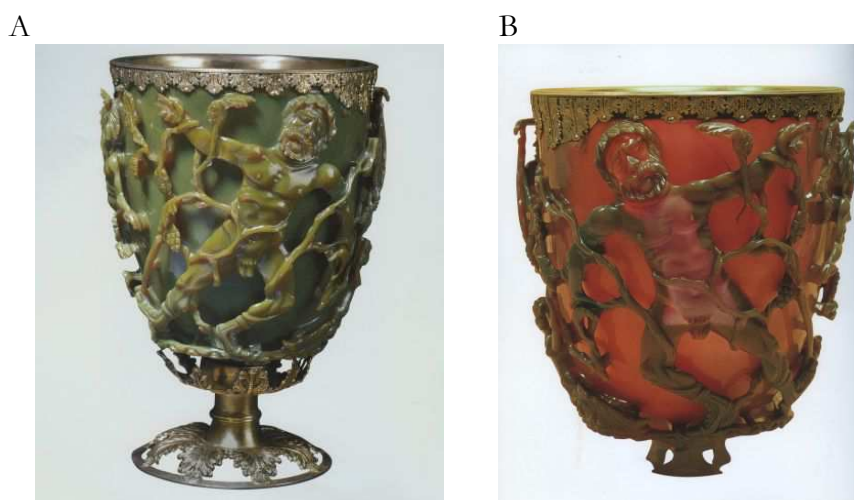


Figura 8. Taça de Licurgo, sob a luz do sol (A) e com foco de luz interna (B)

O ouro coloidal, além de ser utilizado como corante, era utilizado para fins medicinais pelos alquimistas e era considerado capaz de curar qualquer doença, segundo Paracelsus, era capaz de tornar o corpo “indestrutível”.

Os métodos de preparação do ouro coloidal eram bastante conhecidos pelos alquimistas, porem somente em 1857 surgiu o primeiro método relatado, por Michael Faraday, onde ele reduziu um sal de Au(III) em solução de dissulfeto de carbono, com fosforo branco utilizado como agente redutor, gerando uma suspensão estável de ouro coloidal.^{22,23} A partir daí, foram relatados inúmeros outros métodos de preparação de nanopartículas (ou ouro coloidal).

Um método a ser destacado, e que foi utilizado no presente trabalho, é o publicado por Turkevich em 1951.²⁴ As nanopartículas são obtidas a partir de uma solução aquosa de AuCl₃ reduzida com uma solução de citrato de sódio, que atua como agente redutor e estabilizante. O método de Turkevich é um dos mais utilizados por ser um método simples, haver a possibilidade de obter partículas de vários tamanhos (10 a 100 nm) e as partículas sintetizadas serem facilmente modificadas. O estabilizante da superfície das nanopartículas, citrato, é muito lábil e pode ser facilmente trocado por moléculas mais co-ordenantes como tióis, aminas e piridinas entre outros.

As nanopartículas de ouro podem ser versáteis “blocos de construção” para obtenção de nanomateriais híbridos funcionais devido a versatilidade de funcionalização com moléculas com propriedades específicas, seguida de seu arranjo bi- ou tridimensional sobre um substrato. Avanços significativos têm sido alcançados nos últimos anos no *design* de nanomateriais similares com novas propriedades ópticas, elétricas e magnéticas. Esses novos materiais apresentam aplicações na área biológica, em catálise e eletrônica, entre outras.²⁵⁻³¹

1.3. Cisteína

A cisteína é um α -aminoácido que contém em sua composição um grupo tiol, **Figura 9**; é considerada um dos aminoácidos mais importantes estando presente na composição do sítio activo de muitas enzimas, proteínas e peptídeos.³² A molécula de cisteína desempenha um importante papel nos sistemas biológicos, actuando em diversas funções celulares, como no metabolismo, desintoxicação e comunicação entre as células do sistema imunológico.^{33,34} A ingestão inadequada de cisteína pode causar diversos problemas clínicos, como por exemplo, perda de massa muscular e de gordura, doenças como o mal de Parkinson e de Alzheimer, leucemia, diabetes, lesões na pele, danos ao fígado, despigmentação do cabelo, edemas, e em crianças o crescimento lento.^{33,35-37} Sendo assim, a cisteína é empregada em diversos fármacos e suplementos alimentares. Devido a isso, a determinação sensível deste composto possui grande importância para finalidades clínicas e comerciais.

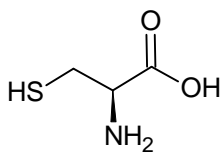


Figura 9. Estrutura da *L*-cisteína

Muitos métodos têm sido utilizados para a determinação da cisteína,³⁸ como os métodos espectrofotométricos^{39,40}, cromatográficos^{41,42} e electroquímicos⁴³⁻⁴⁶. Através da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é possível obter uma determinação selectiva e sensível da cisteína no interior de células de fibras musculares multinucleadas, porém, esta metodologia apresenta algumas desvantagens tal como, elevado tempo de análise devido as etapas de pré-tratamento das amostras e um alto custo, pois é necessário um grande volume de reagentes de elevado grau de pureza.⁴⁷

Em contrapartida, os métodos electroquímicos são destacados pela sua simplicidade, alta sensibilidade, estabilidade e baixo custo de instrumentação.⁴⁸

1.4. Sensores químicos

O desenvolvimento de sensores químicos e físicos é uma das práticas mais importantes em química, hoje em dia, requisitada pela importância para a monitorização do meio ambiente e o bem-estar da sociedade através da sua capacidade na identificação de iões ou moléculas (como NO_2^- , SO_3^{2-} , hormônios, etc.), poluentes gasosos (CO , O_3 , SO_2 , etc.) ou mesmo radiações de alta energia prejudiciais a saúde (nuclear ou ultravioleta). Na **Figura 10** encontram-se alguns exemplos de sensores químicos.



Figura 10. Exemplos de sensores químicos e físicos: (A) detector de CO , (B) glicosímetro e (C) sensor de radiação ultravioleta.

Podem ser considerados sensor químico qualquer equipamento ou sistema capaz de responder à presença de espécies químicas. Esta resposta pode ser colorimétrica (como a degradação de corante), electroquímica (através de um filme electroquimicamente activo) ou mesmo indirecta (utilizando um reagente ou outras espécies capazes de identificar características do analito de interesse para a detecção por um equipamento).

Nesta dissertação será aplicada a técnica electroquímica, através de análises de voltametria cíclica e amperometria.

1.5. Justificativa e Objetivos

A aplicação de sensores electroquímicos tem sido uma alternativa para o diagnóstico rápido e confiável de várias doenças, evitando métodos de ensaio antígeno ou de métodos de separação.⁴⁹ Muitas doenças estão associadas a *L*-cisteína, tais como edemas, letargia, mal de Alzheimer, leucemia, diabetes entre outras.^{33,37} Perante isto, a busca de sensores (calorimétricos, HPLC e electroquímicos) tem uma grande importância.

As porfirinas de manganês têm sido muito utilizadas em reacções de oxidação inspiradas na função natural do citocromo P450, que contém um grupo protético de ferro heme, porém, estas porfirinas possuem uma menor tendência em formar agregados, tornando um catalisador mais controlado do que as porfirinas de ferro.⁵⁰

A associação entre o electrocatalisador e uma plataforma condutora, tal como nanotubos de carbono⁵¹, grafeno⁵² ou nanopartículas metálicas⁵³ é importante para melhorar o desempenho dos dispositivos electroquímicos. Para esta finalidade, as nanopartículas de ouro são interessantes, por muitas razões: eles podem ser montados sobre uma superfície do eléctrodo para aumentar a área efectiva e, devido à morfologia esférica, o espaço intersticial permite a transferência de massa eficiente.⁵⁴ Sua natureza metálica proporciona uma via condutora para o transporte de carga e a superfície pode ser funcionalizada por moléculas fluorescentes⁵⁵ ou de compostos de metal usando estratégias convencionais em química de coordenação.⁵⁶⁻⁵⁸

Este presente trabalho teve como objectivo obter um sensor electroquímico através da modificação do FTO com as nanopartículas de ouro e a 5,10,15,20-*tetrakis*-(pentafluorfenil)porfirina de manganês (III), MnTPFPP, para a determinação de cisteína.

Capítulo 2

Resultados e Discussão

2.1 Síntese da MnTPFPP

Como indicado em Secção 4.2, a síntese da 5,10,15,20-tetrakis(pentafluorofenilporfirina) foi feita pelo método de Lindsay, que envolveu a reacção entre pirrol e pentafluorobenzaldeído em diclorometano sob refluxo em atmosfera inerte. A seguir, foi adicionado (i) $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$; (ii) DDQ. Após a recristalização, o rendimento obtido foi de 19,4%. A inserção do Mn(III) na porfirina foi feita utilizando o método de Kadish desenvolvido pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Química de Coordenação da UNICAMP. A estrutura de ambas as porfirinas estão demonstradas na **Figura 11** a seguir.

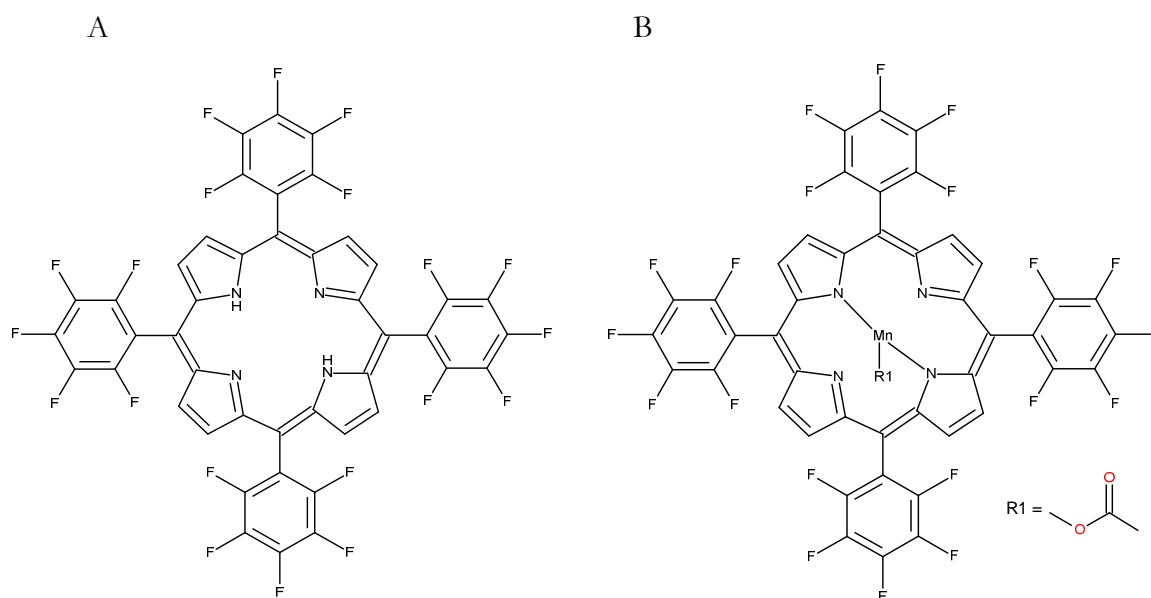


Figura 11. (A) estrutura da H₂TPFPP e (B) estrutura da MnTPFPP

Para acompanhar a síntese da porfirina, foram obtidos os espectros electrónicos para a porfirina com a base livre e após a inserção do Mn(III), conforme apresentado na **Figura 12** abaixo.

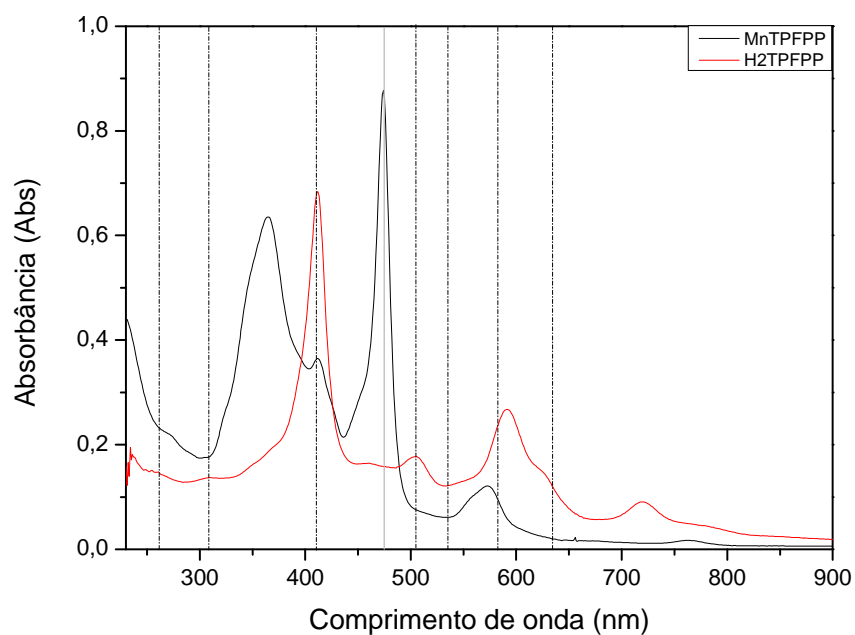


Figura 12. Espectro electrónico para a H₂TPFPP (vermelho) e MnTPFPP (preto).

No espectro obtido, pode-se observar com as marcações realizadas, que em comparação com os dados publicados por Spellane⁹, obteve-se o mesmo composto. As linhas pontilhadas estão referenciadas os comprimentos de onda para a H₂TPFPP, onde se podem observar os máximos de absorção apresentados na tabela abaixo:

Tabela 1. Bandas de absorção para a H₂TPFPP. Entre parenteses os valores de absorção molar em 10³ M⁻¹cm⁻¹.⁹

	L	N	B (Soret)	Qy(1,0)	Qy(0,0)	Qx(1,0)	Qx(0,0)
Comprimento de onda (nm)	262	309	410 (264)	505 (18,5)	535 (2,2)	582 (5,9)	635 (0,92)

Comparando com o espectro obtido, pode-se considerar que se obteve a mesma porfirina. Para a MnTPFPP, segundo o trabalho publicado por Mohajer⁵⁹, o pico de absorção para a banda Soret, característica para as porfirinas, desloca-se para 474 nm, o que pode ser observado na **Figura 12** com a linha cinza sobre o pico, confirmando também a obtenção desta porfirina.

Para confirmar a estrutura, foram obtidos também os espectros de ressonância magnética nuclear, RMN, de ¹H e ¹⁹F para a porfirina com base livre, e o espectro de massas (EM) para ambas porfirinas.

No espectro de RMN de ¹H, **Apêndice 1**, apareceram dois sinais em forma de singleto característicos de uma estrutura simétrica. Um dos sinais é observado a δ 9,92 ppm, sendo um desvio químico característico da ressonância dos 8 prótons β -pirrólicos. Estes prótons se encontram desprotegidos devido à corrente do anel. O segundo sinal em forma de singleto é observado a δ -2,92 ppm, este é gerado pela ressonância dos dois prótons, os prótons NH. Estes estão mais protegidos que os prótons “externos” do anel, este facto se deve à forte blindagem electrónica que gira em torno do anel. Pode-se confirmar então que ocorre o efeito anisotrópico, onde a mesma corrente electrónica desprotege os prótons exteriores do macrociclo e protege os prótons no interior do macrociclo, que é comumente observado nas porfirinas. No espectro de RMN de ¹⁹F, **Apêndice 2**, aparecem três sinais, um em forma de tripleto a δ -151,24 ppm que é atribuído à ressonância dos quatro átomos de flúor na posição *para*. A multiplicidade é devido ao acoplamento com os dois átomos de flúor na posição *meso*. Outros sinais em forma de duplo duplete e multiplete são observados a δ -136,54 e a δ -161,36 ppm respectivamente, estes correspondem à ressonância dos átomos de fluor nas posições *orto* e *meta* respectivamente. A estrutura do composto é confirmada por

EM, apresentando um pico com a razão m/z de 975,3, correspondente ao ião molecular $[M+H]^+$, sendo o valor da massa previsto de 976,56 g.mol⁻¹.

A MnTPFPP foi caracterizado por EM, devido a molécula ser paramagnética, o que não permite obter o correspondente espectro de RMN. O resultado obtido foi na razão m/z de 1068,3 correspondente ao ião molecular $[M+CH_3CN]^+$, o valor calculado para a MnTPFPP é de 1058,31 g.mol⁻¹, o que pode confirmar a obtenção do composto.

A escolha do centro metálico da porfirina foi a capacidade deste metal ligar-se axialmente a um ligante que permita por sua vez a coordenação á nanopartícula de ouro na superfície do eléctrodo. O ligante utilizado foi a 4-mercaptopiridina, que possui em posições opostas um átomo de nitrogénio com um par de electrões não partilhado que permite a coordenação ao manganês(III) no centro do macrociclo tetrapirrólico e na outra extremidade o grupo tiol, que se coordena facilmente ao ouro, conforme apresentado na **Figura 13** abaixo.

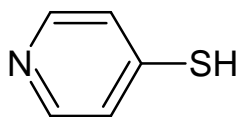


Figura 13. Estrutura da 4-mercaptopiridina.

A fim de comprovar a efectiva coordenação através de ligação axial da mercaptopiridina ao centro metálico da porfirina que requer a deslocação do contraíão acetato, foi realizado o estudo cinético com o auxílio da espectroscopia UV-Vis. Neste experimento foram colocados em uma cubeta de quartzo 90 u(parece-me um u em lugar do sinal de micro)L da solução de MnTPFPP (0,5 mM em diclorometano) e 50 uL de uma solução de 4-MPy (1,15 mM em diclorometano) e esta mistura foi diluída em 3 mL de diclorometano, obtendo uma proporção equimolar.

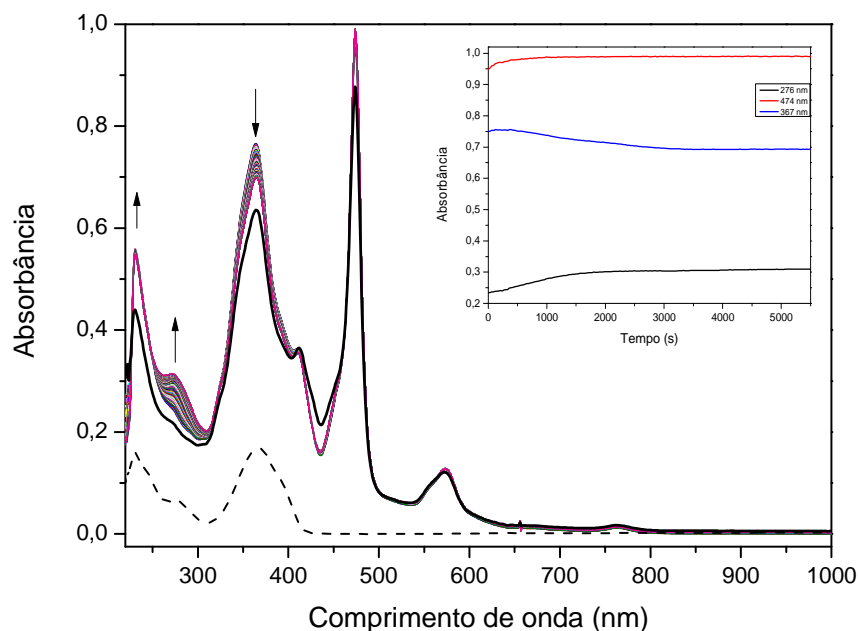


Figura 14. Espectro electrónico do estudo cinético da reacção da MnTPFP com 4-MPy, sendo o espectro pontilhado para a 4-MPy e o espectro preto em destaque a MnTPFP. Em destaque a variação da absorbância das bandas em *vs* tempo para as bandas em 276 nm (preto), 367 nm (azul) e 474 nm (vermelho)

No espectro obtido, **Figura 14**, é possível observar que houve o aumento na absorbância nos comprimento de onda da banda 276 nm, e a banda em 367 nm teve um aumento considerável ao adicionar a 4-MPy e no decorrer da reacção ela diminuiu, essas alterações nas absorbâncias podem sugerir a ocorrência da ligação axial, porém será necessário efectuar o calculo computacional e espectroscopia Raman. Através do espectro obtido, pode se sugerir que tenha ocorrido sobreposição das bandas da 4-MPy e da MnTPFP, tomando como base a expectativa de que houvesse o deslocamento da banda Soret, em 424 nm, que teve o aumento da absorbância no inicio da reacção, porém se manteve estável no decorrer do tempo. Contudo, na modificação do eléctrodo de FTO, conforme descrito na secção 2.3, observa-se um desvio da banda Soret da metaloporfirina quando se coloca em contacto com a 4-MPy o que sugere a ocorrência da ligação axial com o átomo de manganês.

2.2. Síntese da AuNP

Como indicado na secção 4.3, a síntese das nanopartículas de ouro seguiram o método proposto por Turkevich, onde o citrato de sódio foi adicionado a uma solução aquosa em ebulição de HAuCl_4 sob vigorosa agitação, sendo acompanhada por espectroscopia UV-Vis e obtendo o espectro demonstrado na **Figura 15** abaixo.

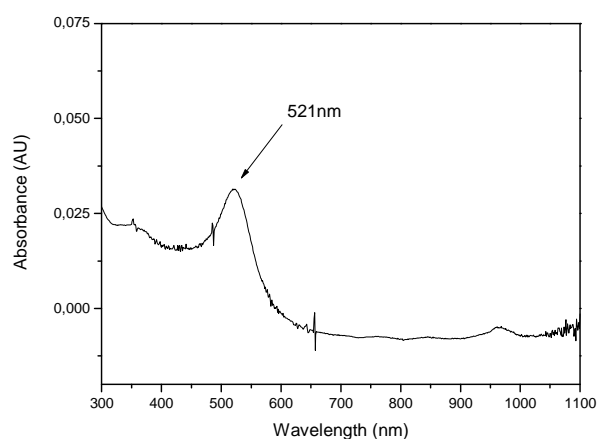


Figura 15. Espectro electrónico da AuNP.

Foi observada a presença da banda plasmônica, característica nas nanopartículas de ouro descritas na literatura⁶⁰, onde apresenta comprimento de onda ao redor de 520 nm, além de um perfil de espalhamento característico de sistemas com tamanhos menores que o comprimento da luz incidente, onde segundo Toma⁶¹, o tamanho das nanopartículas de ouro influencia na posição da banda plasmon, sendo que, quanto menor a nanopartículas, menor será o comprimento de onda observado, podendo considerar que as nanopartículas sintetizadas tem um tamanho entre 3 a 30 nm.⁶²

2.3. Modificação dos eléctrodos

Os eléctrodos foram modificados conforme o procedimento descrito na secção 4.4, sendo todos os eléctrodos previamente limpos em solução piranha, e activados com MPA. Em cada experiência preparou-se um conjunto de quatro eléctrodos, um primeiro eléctrodo foi reservado sem modificação, o segundo foi modificado apenas com o gotejamento das AuNPs, o terceiro eléctrodo foi modificado somente gotejando a MnTPFPP e o quarto e ultimo eléctrodo foi modificado gotejando as AuNPs, em seguida a 4-MPy (solução descrita na modificação do Eléctrodo 4 da secção 4.4) e por fim, a MnTPFPP, secando sob fluxo de ar quente e lavando para retirar o excesso de composto em cada etapa de modificação.

Para observar a modificação dos eléctrodos com o sistema híbrido AuNP/MnTPFPP, foram obtidos os espectros electrónicos dos eléctrodos.

Sabe-se que os espectros de absorção ultravioleta-visível (UV-Vis) de metaloporfirinas de Mn(III) são caracterizados por uma banda bem definida e intensa na região de 450-500 nm (banda Soret) e duas outras bandas na região de 500 nm, chamadas bandas Q, cuja posição é sensível a coordenação axial. A MnTPFPP em solução de diclorometano, apresentam a primeira banda característica em 474 nm e a última em 572 nm, ao passo que, no eléctrodo modificado com a MnTPFPP a Soret é alargada, tem deslocado ao azul para 446 nm e as bandas Q fundiram-se em 566 nm (**Figura 16**), indicando, assim, a existência de interacções electrónicas entre AuNP e MnTPFPP, o que está de acordo com os resultados de Fratoddi et al.⁶³ Além disso, o deslocamento das bandas Q sugerem coordenação axial⁶⁴ do manganês com os grupos piridil da superfície de ouro 4MPy-funcionalizado.

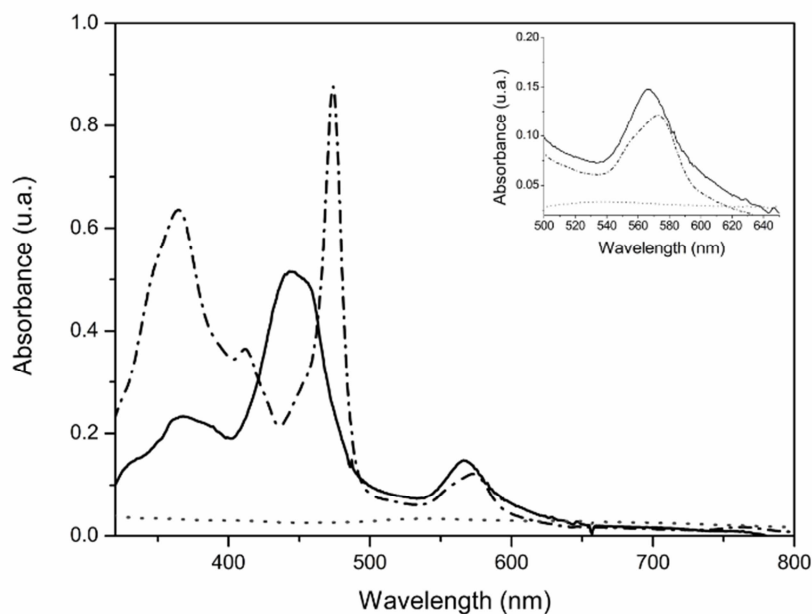


Figura 16. Espectro de absorção UV-Vis da MnTPFPP em solução de CH_2Cl_2 (linha tracejada) e do eléctrodo modificado com AuNP/MnTPFPP (linha cheia). Em destaque, a banda-Q presente na região entre 500 e 600 nm.

2.4. Estudos electroquímicos

Foram realizados estudos de voltametria cíclica para observar o comportamento redox da metaloporfirina e para estudar o comportamento dos eléctrodos modificados na detecção de *L*-cisteína. Em seguida, foi obtido a curva amperimétrica de eléctrodo de FTO modificado com AuNP/MnTPFPP.

2.4.1. Estudos electroquímicos da MnTPFPP

O primeiro passo do desenvolvimento dos estudos electroquímicos foi a caracterização do comportamento da MnTPFPP em solução utilizando um electrodo de referencia de ECS[®]. Os voltamogramas obtidos por voltametria cíclica da MnTPFPP em solução de acetonitrilo são

mostrados na **Figura 17**. Baseado nos voltamogramas é possível atribuir a onda de $E^{0'} = 0,2$ V vs ECS para a redução do teor de manganês (III) ao manganês (II).¹⁷ Além disso, o par redox atribuído à oxidação do metal é encontrado em $E^{0'} = 0,38$ V vs ECS (não é ECS?). o que pode ser confirmado por análise do voltamograma cíclico de varredura catódica. Quando a análise é realizada entre 0 e 1,5 V vs ECS, o par redox não é observado, de modo que a onda pode ser atribuída à redução de manganês.

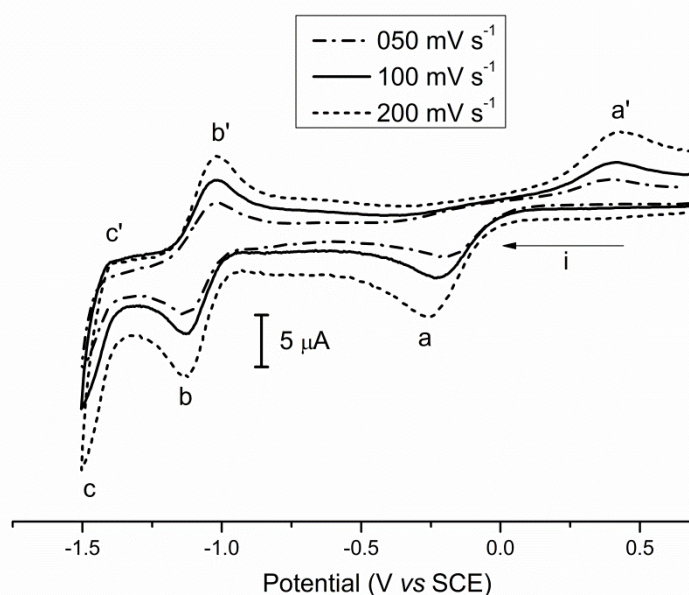


Figura 17. Voltamograma cíclico da MnTPFP em MeCN 0,1M de TBAPF₆, com velocidade de varredura de 50, 100 e 200 mV.s⁻¹

Na **Figura 17**, pode-se observar um par redox quasi-reversível com $E^{0'}$ em -1,07 V vs SCE (AE = 120 mV) atribuído à redução da porfirina. Um deslocamento do potencial de redução é observado em comparação com MnTPP (CH₃COO), **Figura 18**, em que a primeira redução de porfirina é observada a -1,28 V vs SCE⁶⁵. Esta mudança pode ser explicada pelo efeito de substituição os átomos de flúor presentes por hidrogénio, por conseguinte, o potencial observado tem um desvio anódico. Não se observa o mesmo comportamento na redução do de manganês (III).⁶⁵

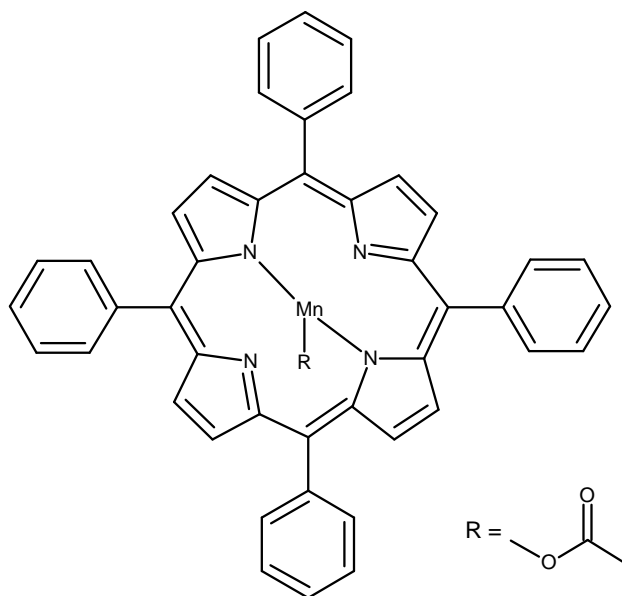


Figura 18. Estrutura da MnTPP(CH₃COO)

2.4.2. Estudo electroquímico dos eléctrodos modificados

Foram realizados estudos de oxidação de cisteína em solução aquosa com pH 5,00, 6,00 e 7,00, porém apenas no pH 7,00 se obteve o melhor resultado, sendo que os demais voltamogramas apresentaram valores de corrente muito inferior, como demonstrado na **Figura 19**.

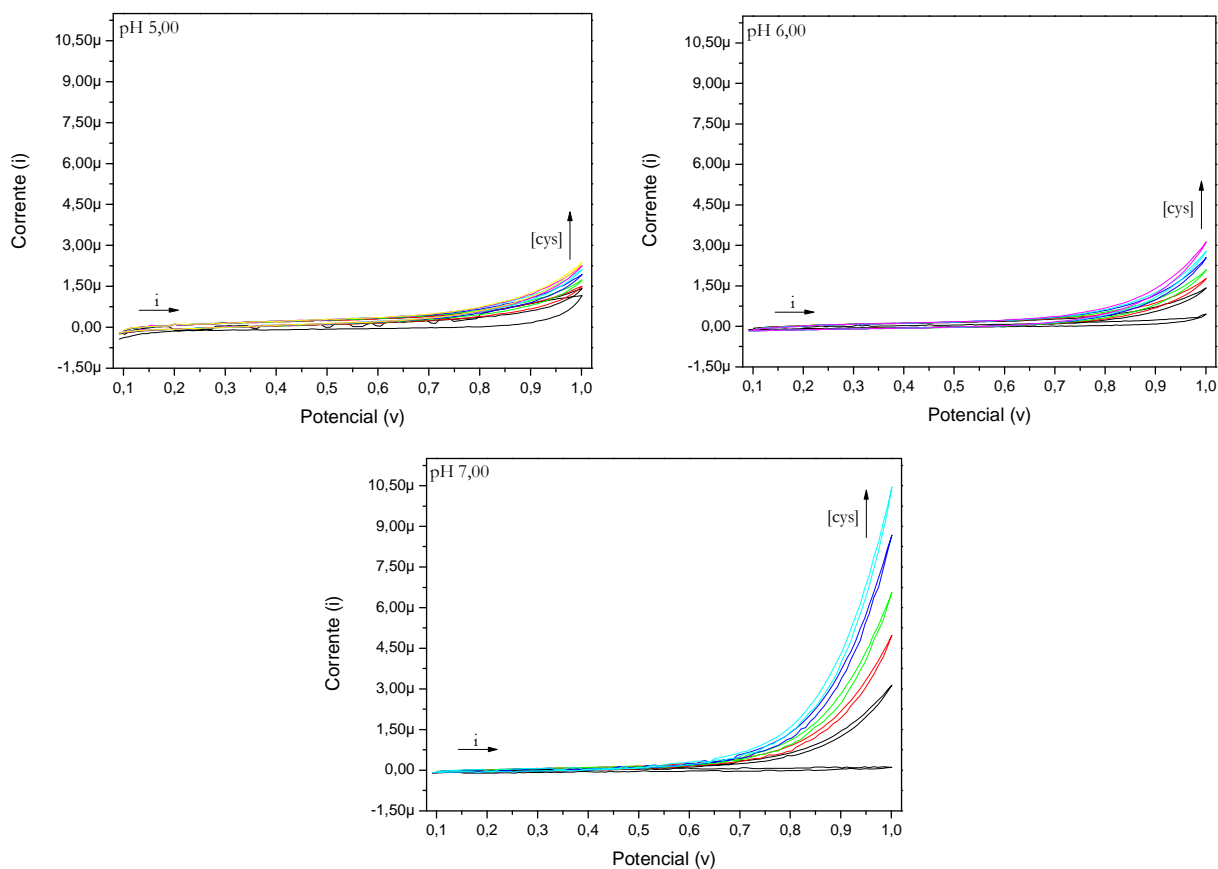


Figura 19. Voltamogramas cíclicos para o electrodo de FTO limpo em soluções tampão com pH 5,00, pH 6, 00 e pH 7,00 com velocidade de varredura de $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, sem adição de cisteína (linha me preto) e com sucessivas adições de $100 \mu\text{L}$ a partir de uma solução estoque de $4,98 \text{ mM}$.

Tendo escolhido o valor do pH para as medidas, foram obtidos os voltamogramas para os eléctrodos sem modificação e com modificação, comparando a cada camada acrescentada ao FTO para a detecção de cisteína. A cisteína foi adicionada a partir de uma solução estoque de $4,98 \text{ mM}$, em sucessivas adições de $100 \mu\text{L}$ a cada voltamograma obtido.

A **Figura 20** compara voltamogramas de eléctrodo de FTO limpo, e modificado com AuNP, MnTPFPP e pelo sistema híbrido AuNP/MnTPFPP. Os voltamogramas apresentados foram registrados após 30 ciclos de estabilização.

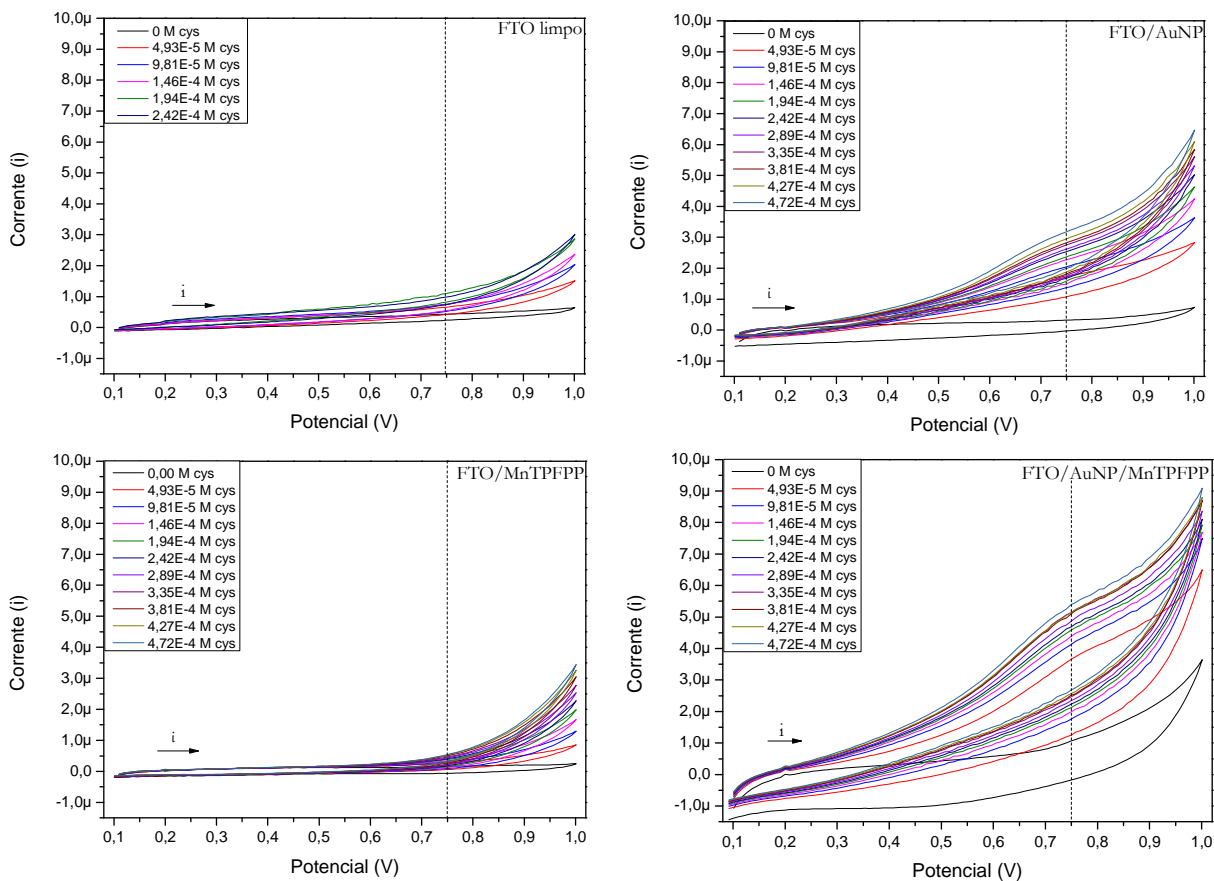


Figura 20. Voltamogramas cíclicos em pH 7,00, com velocidade de varredura de $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ sem a adição de cisteína (linha em preto) e com a adição sucessiva de $100 \mu\text{L}$ da solução estoque com $4,98 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de cisteína para os eléctrodos de FTO sem modificação, e modificados com AuNP, com MnTPFP e com AuNP/MnTPFP.

São observados o aumento da corrente capacitiva em todos os eléctrodos, mas apenas nos eléctrodos modificados com AuNP e no sistema híbrido AuNP/MnTPFP, é possível encontrar um aumento de corrente. Essa corrente é devida à variação da concentração de cisteína, o que demonstra o uso potencial de AuNP/MnTPFP como sensor. No eléctrodo de FTO com AuNP o sinal observado é provavelmente devido a uma reacção entre o ouro e o grupo tiol presente na cisteína. No sistema híbrido o valor do sinal é aumentado pela transferência electrónica mais eficaz entre a superfície modificada e a superfície do eléctrodo, esta comparação pode observar na **Figura 21** onde é possível encontrar a corrente máxima no potencial de $0,75 \text{ V}$, em diferentes eléctrodos.

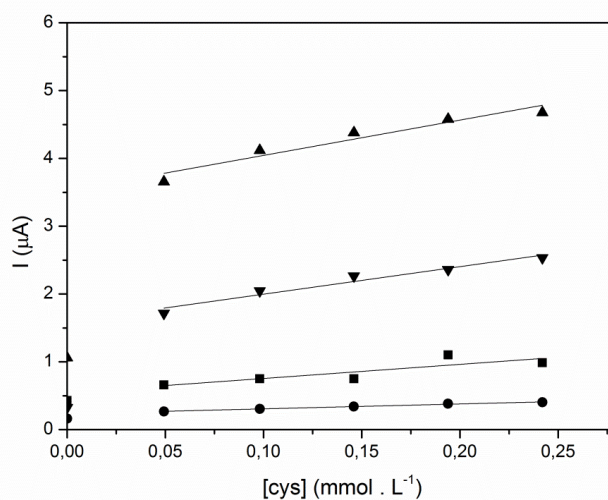


Figura 21. Curva analítica de [cys] vs corrente, com velocidade de varredura de 50 mV.s⁻¹. (■) Eléctrodo de FTO limpo e modificado com (▼) AuNP, (●) MnTPFP e (▲) AuNP/MnTPFP

2.4.3. Caracterização analítica

A partir dos resultados obtidos nos estudos de voltametria cíclica, confirmou-se que os eléctrodos FTO/AuNP/MnTPFP poderia ser usado no estudo da oxidação electrocatalítica da *L*-cisteína. Além disso, o pico de corrente anódica mostrou um máximo a 0,75 V vs NHE, indicando que este potencial deve ser aplicado numa experiência amperométrica de modo a proporcionar o máximo de sensibilidade do método. A resposta cronoamperométrica do eléctrodo é mostrado na **Figura 22** a seguir.

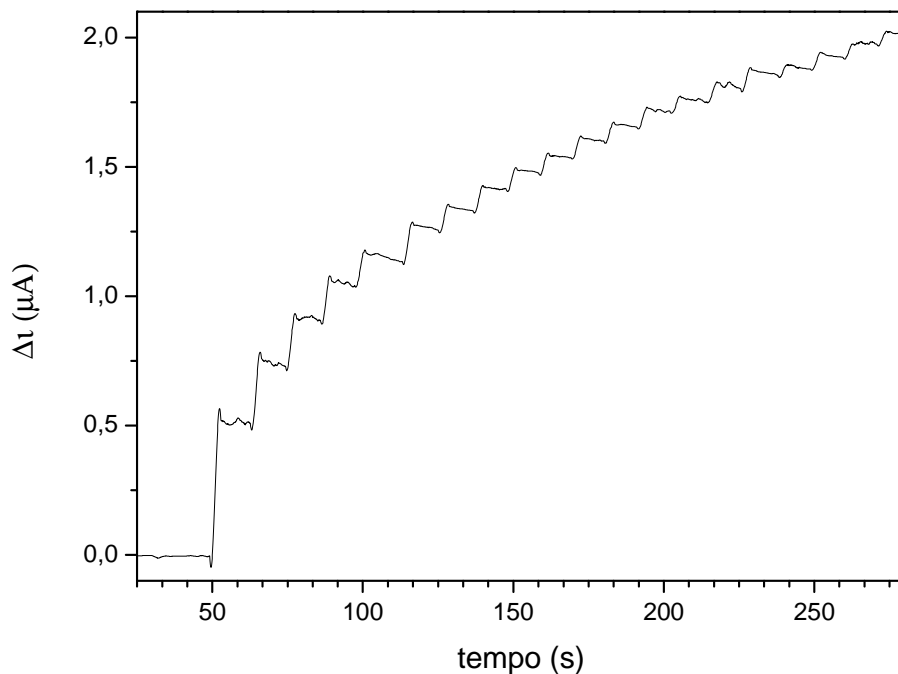


Figura 22. Resposta cronoamperométrica observada após sucessivas adições de cys 4,98 mmol.L⁻¹ de solução estoque em tampão BRB 0,1 M em pH 7,00 para o eléctrodo de FTO modificado com AuNP/MnTPFPP. Potencial aplicado de 75 mV vs Ag/AgCl

A partir da curva de resposta cronoamperométrica, foi obtido a curva de calibração, **Figura 23**, com as correntes máximas obtidas a cada adição de 4,98 mM de cisteína; através desta curva foi possível obter os parâmetros analíticos necessários para estudar a eficiência do eléctrodo utilizado.

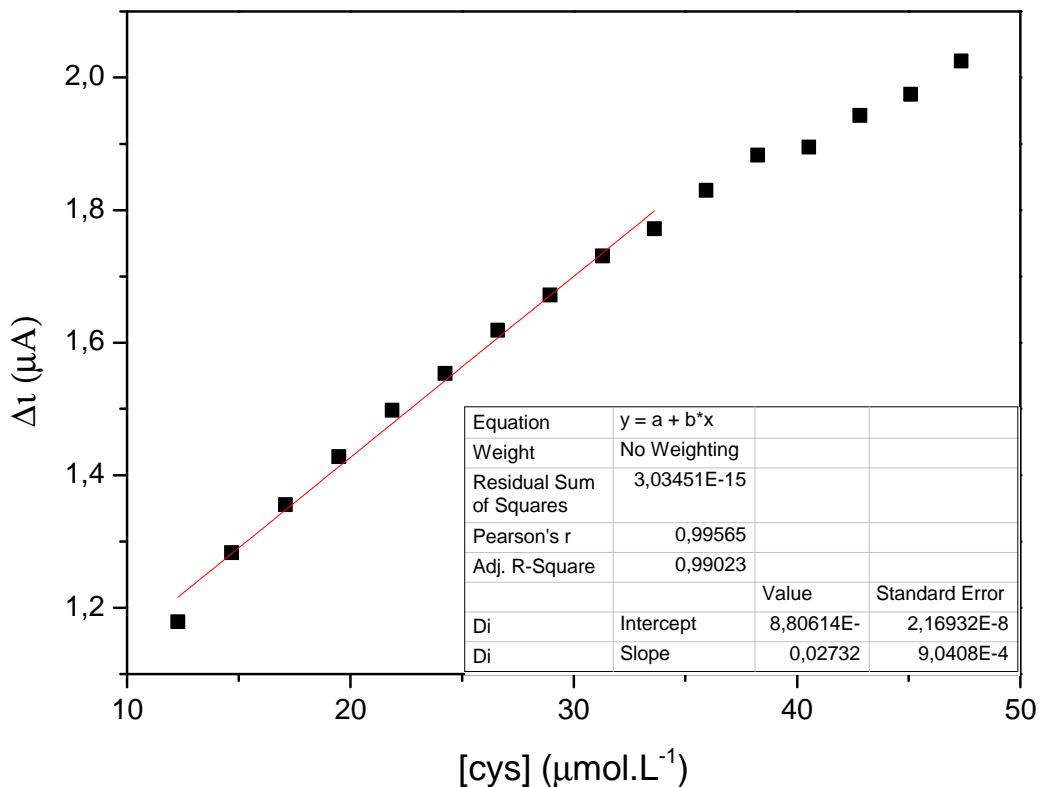


Figura 23. Curva de calibração

Foi observado que o aumento de corrente pode ser considerado linear no intervalo de concentração de 12,2 a 33,6 mmol L⁻¹, acima deste valor é suposto que haja uma saturação de cisteína na superfície do eléctrodo, podendo ocasionar na falta de linearidade, que pode ser descrita de acordo com a seguinte equação:

$$\Delta i = 8.81 \times 10^{-7} + 0.027 [\text{cys}] (\mu\text{molL}^{-1})$$

O coeficiente de correlação obtida foi 0,990, *R-square*, e a sensibilidade foi calculada como 0,027 μA.L.μmol⁻¹.

O valor do limite de detecção (LOD) é calculado através da equação

$$LOD = \frac{3 \times SD}{\text{inclinação}}$$

Onde, SD é o desvio padrão do ponto de intercepção da recta (*standard error*), o qual foi $2,169 \cdot 10^{-8}$, e a inclinação é o valor descrito como *slope* na figura e também pode ser considerada como a sensibilidade do eléctrodo, cujo valor foi de $0,027 \mu\text{A.L.}\mu\text{mol}^{-1}$. Substituindo por esses valores, temos:

$$LOD = \frac{3 \times (2,17 \cdot 10^{-8})}{0,027} = 2,4 \cdot 10^{-6} \mu\text{mol.L}^{-1}$$

O limite de quantificação obtida (LOQ) é calculado através da seguinte equação:

$$LQD = \frac{10 \times SD}{\text{inclinação}}$$

Onde, apos substituir os valores, temos:

$$LOQ = \frac{10 \times (2,17 \cdot 10^{-8})}{0,027} = 8,04 \cdot 10^{-6} \mu\text{mol.L}^{-1}$$

Para efeito de comparação, foi construída a **Tabela 2** comparando outros trabalhos presentes na literatura com este presente trabalho para a detecção de cisteína. Pode se verificar que a sensibilidade e o LOD obtidos são comparáveis aos demais eléctrodos demonstrados, por outro lado, quando se compara com um LOD melhor se observa no presente trabalho.

Tabela 2. Comparação dos materiais utilizados para a detecção amperométrica da cisteína

Eléctrodos modificados	E_{ap1}	Electrólito de suporte	LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Sensibilidade $\text{nA L } \mu\text{mol}^{-1}$	Faixa linear ($\mu\text{mol mol L}^{-1}$)	Referência
FTO/AuNP/MnTPFPP	0,75 V vs NHE	Tampão BRB pH 7,0	2,40	27,0	12-34	Este trabalho
GC/MWCNT	0,30 V vs Ag/AgCl	PBS pH 5,0	5,40	3,00	10-500	⁶⁶
Eléctrodo de diamante dopado com Boro	0,85V vs SCE	PBS pH 7,5	5,70	30,7	-	⁴⁵
Pasta de carbono modificada com Co(II)-salophen	0,60 V vs Ag/AgCl	PBS pH 6,0	0,40	22,0	2-20	⁶⁷
Eléctrodo de GC modificado com GNS/MnOx (eléctrodo rotativo)	0,65 V vs Ag/AgCl	Tampão de acetato pH 6,0	0,07	27,0	1-24	⁶⁸
MWCNTs/PEI /AuNPs/DITNB	0,0 V vs SCE	PBS pH 7,0	2,7	21,0	9-250	⁶⁹
Eléctrodo de carbono ceramico modificado com Nafion/PbNP	0,9 V vs SCE	Tampão de acetato pH 4,0	0,46	168,8	1-67,2	⁷⁰

Capítulo 3

Conclusões

O trabalho apresentado dessa dissertação descreve a síntese e caracterização da 5,10,15,20-*tetrakis*-(pentafluorfenil)porfirina de manganês, MnTPFPP, através do método proposto por Lindsey para a síntese e a inserção do Manganês pelo método proposto por Kadish, realizado em parceria com o grupo de pesquisa do Laboratório de Química de Coordenação, LQI, da Universidade de Campinas, e caracterizada por espectroscopia UV-Vis, ressonância magnética, espectrometria de massas e voltametria cíclica. Descreve-se ainda a síntese de nanopartículas de ouro pelo método de Turkevich e sua caracterização por espectroscopia UV-Vis.

As nanopartículas de ouro e o complexo de manganês da porfirina sintetizada foram ligados entre si através da utilização de 4-mercaptopiridina como ligando axial e imobilizados em eléctrodos de FTO realizando sua caracterização por espectroscopia UV-Vis e estudando suas propriedades electroanalíticas.

Os filmes estudados mostraram-se electricamente activos para o estudo da oxidação de *L*-cisteína, apresentando processo electrocatalítico em 0,75 V, com sensibilidade na faixa dos μM ate mM. A intensidade de corrente do pico de oxidação é consideravelmente linear a medida que se aumenta a concentração do analito, sendo a resposta da corrente proporcional à concentração do analito. Os melhores resultados foram encontrados para o sistema híbrido AuNP/MnTPFPP. Este foi utilizado para a determinação analítica de *L*-cisteína, que mostra uma resposta linear na faixa de 12,2 a 33,6 mmol.L^{-1} , com LOD e LOQ igual a 2,40 e 8,15 mmol.L^{-1} , respectivamente. Estes resultados demonstram a eficiência do sistema montado para o analito. O eléctrodo de FTO fornece um dispositivo barato e fácil fabricação para a detecção electroquímica de *L*-cisteína.

Capítulo 4

Experimental

4.1 Material e métodos

4.1.1. Reagentes

Os reagentes utilizados foram de grau analítico e sem purificação preliminar, com a excepção do pirrol e diclorometano (CH_2Cl_2) utilizado na síntese da porfirina que foram destilados previamente sua utilização.

As soluções aquosas foram preparadas em purificada água Milli-Q (Millipore Corp.).

Os eléctrodos de vidro revestidos com oxido de estanho dopado com fluor (FTO), 2,3,4,5,6-pentafluorobenzaldeido, pirrol, $\text{HAuCl}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, *L*-cisteína, ácido 3-mercaptopropiónico (MPA), 4-mercaptopiridina (4MPy), o DDQ (2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona), $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ e TBAPF₆

(tetrabutilamônio hexafluorofosfato) foram adquiridos na Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). O citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) e diclorometano foram adquiridos da Synth (São Paulo, Brasil).

4.1.2. Procedimentos e equipamentos

Os estudos de espectroscopia em UV-Vis foram efetuados em um espectrofotômetro de matriz de díodos Hewlett-Packard HP8453 equipado com Peltier HP89090A, utilizando cubeta de quartzo de 1cm^2 .

As análises estruturais por espectroscopia de ressonância magnética nuclear, RMN, de ^1H e ^{19}F foram realizadas num espectrômetro Bruker 250 MHz Avance da central analítica do IQ-UNICAMP. A análise de espectrometria de massas foi realizada no ESI-MS CG/MS Saturn 2100D da Varian, também da central analítica do IQ-UNICAMP.

Os voltamogramas cíclicos e medidas de cronoamperometria foram obtidos utilizando-se um potencióstato/galvanostato da Autolab, modelo PGSTAT 20 (Eco Chemie, Holanda) ligado a um computador controlado pelo *software* GPES. A cela electroquímica utilizada foi a tradicional, de três eléctrodos: eléctrodo de trabalho (de platina para a obtenção do voltamograma da MnTPFPP, e de FTO modificado para as análises de detecção de cisteína), eléctrodo de referencia (de calomelano saturado para a obtenção do voltamograma da MnTPFPP e Ag/AgCl para as análises de detecção de cisteína) e eléctrodo auxiliar (fio de platina helicoidal).

O do voltamograma da MnTPFPP foi obtido em solução de acetonitrilo, utilizando TBAPF_6 como electrólito de suporte. Para os estudos electrocatalíticos dos filmes de MnTPFPP e AuNPs montados sobre FTO foram realizados utilizando solução tampão Britton-Robson, preparado conforme descrito na secção a seguir, 4.1.2.1.

4.1.2.1. Solução tampão

As soluções tampão Britton-Robson (BRB) utilizadas foram preparadas conforme descrito na literatura⁷¹, onde foi preparada uma mistura de 0,04 M de H_3BO_3 , 0,04 M de H_3PO_4 e 0,04 M de CH_3COOH , como solução base e o pH concertado titulando esta solução com uma solução

saturada de NaOH até o pH esperado. Para este trabalho foram obtidas soluções BRB com pH 5,00, 6,00 e 7,00. A cada solução foi adicionado KCl até a concentração de 0,1 M para atuar como eletrólito de suporte.

4.2. Síntese da MnTPFPP

A síntese da porfirina com a base livre, H₂TPFPP foi realizada em colaboração com o grupo do Laboratório de Química de Coordenação (LQC) do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, o processo de metalação foi feito inteiramente pelo grupo parceiro.

Para a síntese da H₂TPFPP foi seguido o procedimento descrito por Lindsey¹⁶, onde, 200 mL de diclorometano seco e destilado foram colocados sob refluxo em atmosfera inerte, e foram adicionados 0,208 mL de pirrol recém-destilado sob pressão reduzida e 0,370 mL de pentafluorobenzaldeído. Em seguida, a mistura reacional foi mantida sob refluxo e agitação por 15 minutos em temperatura ambiente. 0,081 mL de BF₃.Et₂O foram adicionados a mistura com o auxílio de uma seringa equipada com agulha revestida, abrindo o sistema da luz logo após a adição e mantendo sob agitação por 1 hora. Adicionou-se 0,511 g de DDQ e manteve sob agitação por mais 1 hora em banho pré-aquecido a 45 °C. Decorrido esse tempo, foram adicionados 0,092 mL de trietilamina. A solução foi levada ao evaporador rotatório com 0,75 g de florasil adicionados, afim de auxiliar a evaporação e manter a extração do solvente sem ocorrer perda do produto com a redução da pressão. O produto de cor verde-escuro obtido foi colocado em um funil de placa sinterizada acoplado a um sistema de vácuo e lavado com metanol até o filtrado não apresentar mais a coloração esverdeada e o sólido presente no funil apresentar a coloração roxa característica da porfirina. O sólido foi retirado do funil e lavado com diclorometano e filtrado em sistema de filtração simples com papel para a retirada do florizil e reservado até a total evaporação do solvente. O rendimento obtido foi de 19,4%, podendo considerar favorável conforme observado na literatura. Os rendimentos deste tipo de reação geralmente são baixos devido a ocorrência de reações paralelas competitivas de polimerização.

Para a inserção do Mn(III) na porfirina, o grupo do LQC seguiu o procedimento descrito por Kadish et al.⁷² Para ambos os produtos, H₂TPFPP e MnTPFPP, obteve-se caracterização

espectroscópicas e espectrométricas para sua caracterização, obtendo resultados consistentes com os observados na literatura.^{59,73}

4.3. Síntese das nanopartículas de ouro

As nanopartículas de ouro utilizadas neste trabalho foram obtidas através do método de Turkevitch.⁶⁰ Este método é baseado na redução dos íons tetracloroaurato ($[\text{AuCl}_4]^-$) em solução aquosa pelos íons do citrato de sódio. Estes também atuam como camada protectora e estabilizante das nanopartículas de ouro formadas, sendo facilmente substituídos por outros ligantes mais coordenantes.

Toda vidraria utilizada nesta síntese foi previamente lavada com água régia (HNO_3/HCl , na proporção 1:3) e lavada com água destilada em abundância.

Foram adicionados 0,012 g de $\text{HAuCl}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ em 100 mL de água e levados a aquecimento sob agitação vigorosa. Após entrar em ebulição, foram adicionados 3 mL de uma solução 1% (m/v) de citrato de sódio, mantendo a agitação e o aquecimento por 30 minutos. A solução apresentou uma coloração azul escura após a adição do citrato, passando a roxo pouco tempo decorrido, e após um tempo maior apresentou coloração avermelhada.

4.4. Modificação dos eléctrodos de FTO

Os filmes sobre os eléctrodos de FTO foram preparados a partir da montagem camada por camada, mas antes de serem realizadas as modificações, os eléctrodos foram previamente limpos em solução piranha ácida (H_2O_2 e H_2SO_4 , 1:3) por 10 minutos, e básica (H_2O , H_2O_2 e NH_4OH , 5:1:1) por 15 minutos, sendo lavado em abundância após cada etapa e reservado em dessecador sob pressão reduzida até totalmente seco.

Para obter uma melhor funcionalização dos eléctrodos, estes foram modificados previamente com ácido 3-mercaptopropionico (MPA), onde foram imersos em uma solução 1 mM durante 12 horas. Após esse período, foram retirados da solução e lavados com água Milli-Q antes de secar, para que seja retirado da superfície o excesso de MPA que não estão ligados na superfície do vidro condutor.

Antes de seguir com a modificação, em cada eléctrodo utilizado, foi isolado uma área de 1 cm² como trabalho.

Foram obtidos 4 eléctrodos de FTO, sendo um sem modificação utilizado como controle (**Eléctrodo 1**), e três modificados conforme descrito a seguir:

Eléctrodo 2. AuNP

Para o eléctrodo 2, a modificação foi realizada adicionando 200 µL da solução de AuNP directamente sobre a superfície do eléctrodo com o auxílio de uma micropipeta e secando sob fluxo de ar quente com temperatura aproximadamente em 50°C por 2 horas, lavado com água Milli-Q para a retirada de partículas não ligadas e reservado em dessecador sob pressão reduzida.

Eléctrodo 3. MnTPFPP

No eléctrodo 3, a modificação foi realizada adicionando 200 µL de uma solução de MnTPFPP (2,5 mM em diclorometano) directamente sobre o eléctrodo com o auxílio de micropipeta, e secando também com o auxílio de ar quente (~50°C) por 2 horas, lavados com água Milli-Q em seguida e reservado em um dessecador sob pressão reduzida.

Eléctrodo 4. AuNP/MnTPFPP

O eléctrodo 4 foi modificado primeiramente adicionando a camada de nanopartícula de ouro, conforme descrito para o Eléctrodo 2, após estar totalmente seco, foi adicionado 200 µL de uma solução de 4-MPy (com concentração de 1,15 mM, onde 0,0128 g de 4-mercaptopiridina foram diluídas em 100 mL de diclorometano) secando com auxílio de fluxo de ar quente (~50°C) por 2 horas, lavado com água Milli-Q e seco no dessecador sob pressão reduzida. Após estar totalmente seco, foram adicionados 200 µL da solução de MnTPFPP (2,5 mM em diclorometano), conforme descrito no procedimento adoptado no eléctrodo 3.

Na **Figura 24** abaixo estão apresentados os eléctrodos após a modificação.

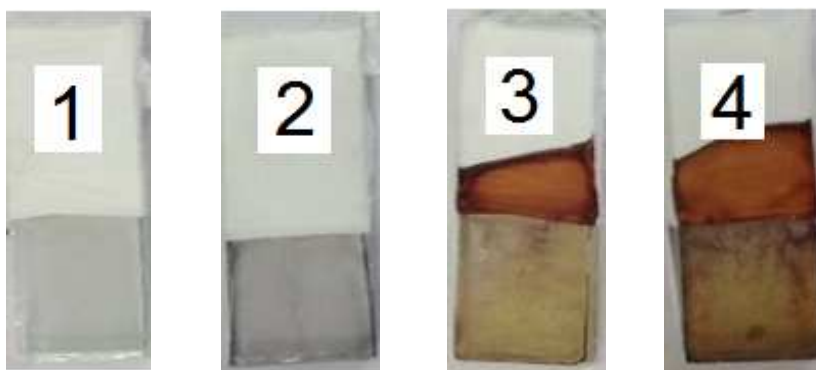


Figura 24. Eléctrodos de FTO após a modificação. (1) eléctrodo limpo, e modificado com (2) AuNP, (3) MnTPFP e (4) AuNP/MnTPFP

Bibliografia

- (1) Moore, M. R.; Birth, T.; Warren, M. J.; Smith, A. G.; Griffiths, T.; Jones, O. C CHAPTER 1 An Historical Introduction to Porphyrin and Chlorophyll Synthesis. In *Tetrapyrroles: Birth, Life and Death*; 2009; pp. 1–28.
- (2) Falk, J. E. *Porphyrim and Metalloporphyrin: Their General, Physical and Cordination Chemistry and Laboratory Methods*; B. B. Library: London, 1964.
- (3) Smith, K. M. *Porphyrins and Metalloporphyrins*; Smith, K. M., Ed.; second.; Elsevier B.V: Amsterdam, 1976.
- (4) Milgron, L. R. *The Colours of Life. An Introduction to the Chemistry of Porphyrins and Related Compounds*; Oxford University Press, 1997; Vol. 9.
- (5) Josefsen, L. B.; Boyle, R. W. Unique Diagnostic and Therapeutic Roles of Porphyrins and Phthalocyanines in Photodynamic Therapy, Imaging and Theranostics. *Theranostics* **2012**, *2*, 916–966.
- (6) Gouterman, M. Spectra of Porphyrins. *J. Mol. Spectrosc.* **1961**, *6*, 138–163.
- (7) Gouterman, M.; Wagnière, G. H.; Snyder, L. C. Spectra of Porphyrins. *J. Mol. Spectrosc.* **1963**, *11*, 108–127.
- (8) Seybold, P. G.; Gouterman, M. Porphyrins. *J. Mol. Spectrosc.* **1969**, *31*, 1–13.
- (9) Spellane, P. J.; Gouterman, M.; Antipas, a; Kim, S.; Liu, Y. C. Porphyrins. 40. Electronic Spectra and Four-Orbital Energies of Free-Base, Zinc, Copper, and Palladium Tetrakis(perfluorophenyl)porphyrins. *Inorg. Chem.* **1980**, *19*, 386–391.
- (10) Gouterman, M. Study of the Effects of Substitution on the Absorption Spectra of Porphin. **1959**, *1139*.
- (11) Stone, A.; Fleischer, E. B. The Molecular and Crystal Structure of Porphyrin Diacids. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 2735–2748.
- (12) Hambright, P.; Fleisher, E. B. Acid-Base Equilibriums, Kinetics of Copper Ion Incorporation, and Acid-Catalyzed Zinc Ion Displacement from the Water-Soluble Porphyrin .alpha.,.beta.,.gamma.,.delta.-tetrakis(1-Methyl-4-Pyridinio)porphine Tetraiodide. *Inorg. Chem.* **1970**, *9*, 1757–1761.

- (13) Tominaga, T. T.; Deda, D. K.; Borges, C. P. F. Estudos Espectroscópicos Da Porfirina Aniônica Hidrossolúvel Meso-Tetrakis (P-Fenilsulfonato) Em Meio Micelar. *Rev. Ciências Exatas e Nat.* **2007**, *9*, 9–21.
- (14) Rothmund, P. A New Porphyrin Synthesis. The Synthesis of Porphin 1. *J. Am. Chem. Soc.* **1936**, *58*, 625–627.
- (15) Rothmund, P.; Menotti, A. R. Porphyrin Studies. IV. 1 The Synthesis of $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -Tetraphenylporphine. *J. Am. Chem. Soc.* **1941**, *63*, 267–270.
- (16) Lindsey, J. S.; Wagner, R. W. The Synthesis of Ortho-Substituted Tetraphenylporphyrins. **1989**, 828–836.
- (17) Smith, K. M. Syntheses and Chemistry of Porphyrins. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2000**, *4*, 319–324.
- (18) Adler, A. D.; Longo, F. R.; Finarelli, J. D.; Goldmacher, J.; Assour, J.; Korsakoff, L. A Simplified Synthesis for Meso-Tetraphenylporphine. *J. Org. Chem.* **1967**, *32*, 476–476.
- (19) Kim, J. B.; Leonard, J. J.; Longo, F. R. Mechanistic Study of the Synthesis and Spectral Properties of Meso-Tetraarylporphyrins. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 3986–3992.
- (20) Schiavon, M. A.; Iwamoto, L. S.; Ferreira, A. G.; Iamamoto, Y.; Zanoni, M. V. B.; Assis, M. D. Synthesis and Characterization of a Novel Series of Meso (Nitrophenyl) and Meso (CarboxyPhenyl) Substituted Porphyrins. *J. Braz. Chem. Soc.* **2000**, *11*, 458–466.
- (21) British Museum - The Lycurgus Cup.
- (22) Faraday, M. The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light. *Philos. Trans. R. Soc. London* **1857**, *147*, 145–181.
- (23) Kelly, K. L.; Coronado, E.; Zhao, L. L.; Schatz, G. C. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 668–677.
- (24) Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold. *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, *11*, 55.
- (25) Verma, A.; Uzun, O.; Hu, Y.; Hu, Y.; Han, H.; Watson, N.; Chen, S.; Irvine, D. J.; Stellacci, F. Surface-Structure-Regulated Cell-Membrane Penetration by Monolayer-Protected Nanoparticles. *Nat. Mater.* **2008**, *7*, 588–595.
- (26) Guo, S.; Wang, E. Synthesis and Electrochemical Applications of Gold Nanoparticles. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *598*, 181–192.

- (27) Daniel, M.-C.; Astruc, D. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 293–346.
- (28) Haruta, M. Size- and Support-Dependency in the Catalysis of Gold. *Catal. Today* **1997**, *36*, 153–166.
- (29) Haruta, M. Nanoparticulate Gold Catalysts for Low-Temperature CO Oxidation. *J. New Mater. Electrochem. Syst.* **2004**, *7*, 163–172.
- (30) Hutchings, G. J. Catalysis by Gold. *Catal. Today* **2005**, *100*, 55–61.
- (31) Helland, A.; Kastenholz, H. Development of Nanotechnology in Light of Sustainability. *J. Clean. Prod.* **2008**, *16*, 885–888.
- (32) Dröge, W.; Eck, H. P.; Gmünder, H.; Mihm, S. Modulation of Lymphocyte Functions and Immune Responses by Cysteine and Cysteine Derivatives. *Am. J. Med.* **1991**, *91*, 140S–144S.
- (33) Shahrokhian, S. Lead Phthalocyanine as a Selective Carrier for Preparation of a Cysteine-Selective Electrode. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5972–5978.
- (34) Gazit, V.; Ben-Abraham, R.; Coleman, R.; Weizman, a; Katz, Y. Cysteine-Induced Hypoglycemic Brain Damage: An Alternative Mechanism to Excitotoxicity. *Amino Acids* **2004**, *26*, 163–168.
- (35) Shang, L.; Qin, C.; Wang, T.; Wang, M.; Wang, L.; Dong, S. Fluorescent Conjugated Polymer-Stabilized Gold Nanoparticles for Sensitive and Selective Detection of Cysteine. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 13414–13417.
- (36) Dröge, W.; Eck, H.; Mihm, S. HIV-Induced Cysteine Deficiency and T-Cell Dysfunction- a Rationale for Treatment with N-Acetylcysteine. *Immunol. Today* **1992**, *13*, 211–214.
- (37) Goodman, M. T.; McDuffie, K.; Hernandez, B.; Wilkens, L. R.; Selhub, J. Case-Control Study of Plasma Folate, Homocysteine, Vitamin B12, and Cysteine as Markers of Cervical Dysplasia. *Cancer* **2000**, *89*, 376–382.
- (38) Luz, R. D. C. S.; Moreira, A. B.; Damos, F. S.; Tanaka, A. A.; Kubota, L. T. Cobalt Tetrasulphonated Phthalocyanine Immobilized on Poly-L-Lysine Film onto Glassy Carbon Electrode as Amperometric Sensor for Cysteine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *42*, 184–191.
- (39) Liang, S.-C.; Wang, H.; Zhang, Z.-M.; Zhang, X.; Zhang, H.-S. Spectrofluorimetric Determination of Cysteine by 5-Maleimidyl-2-(m-Methylphenyl)benzoxazole. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2002**, *58*, 2605–2611.

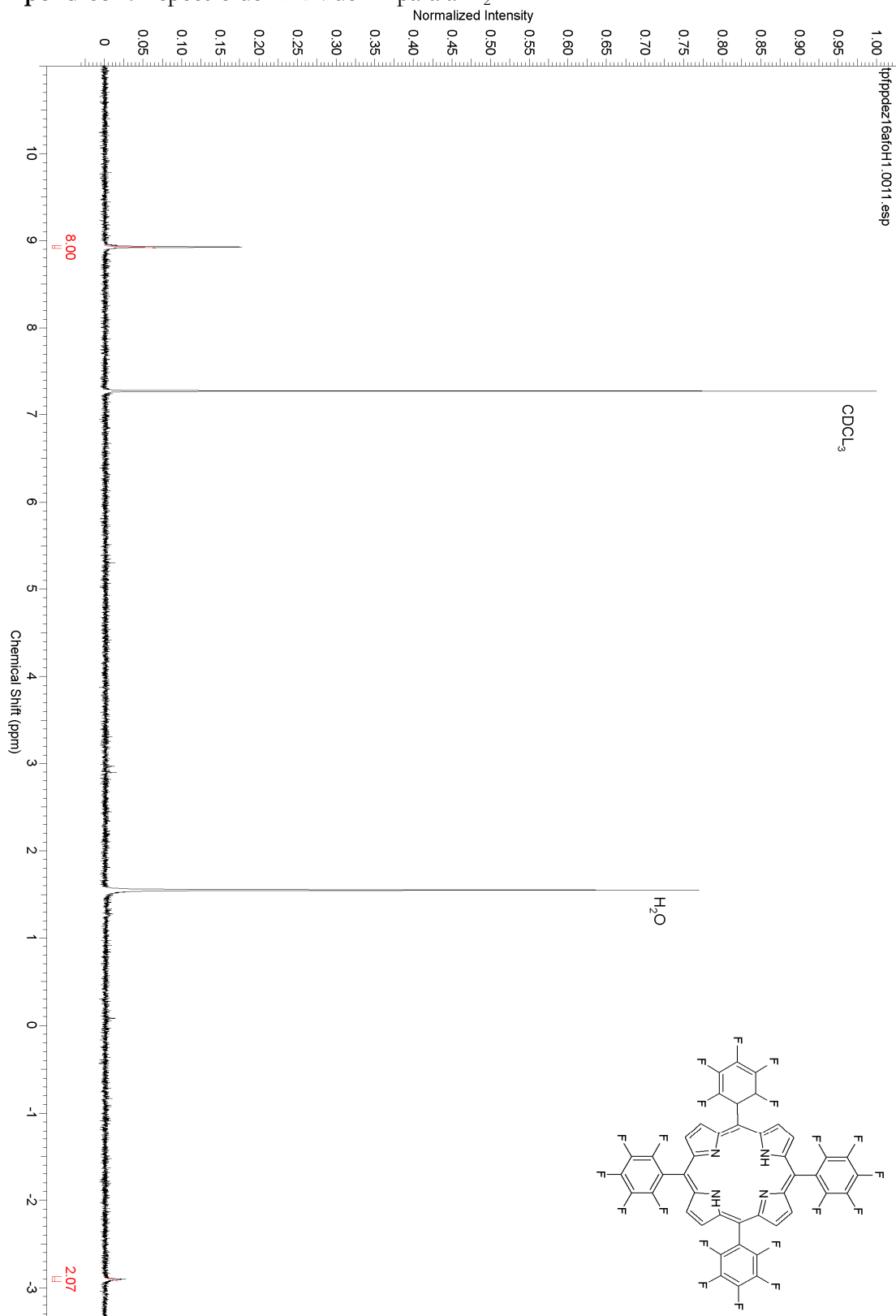
- (40) Wang, H.; Wang, W. S.; Zhang, H. S. Spectrofluorimetric Determination of Cysteine Based on the Fluorescence Inhibition of Cd(II)-8-Hydroxyquinoline-5-Sulphonic Acid Complex by Cysteine. *Talanta* **2001**, *53*, 1015–1019.
- (41) Pelletier, S.; Lucy, C. a. HPLC Simultaneous Analysis of Thiols and Disulfides: On-Line Reduction and Indirect Fluorescence Detection without Derivatization. *Analyst* **2004**, *129*, 710–713.
- (42) Liang, S.-C.; Wang, H.; Zhang, Z.-M.; Zhang, H.-S. Determination of Thiol by High-Performance Liquid Chromatography and Fluorescence Detection with 5-Methyl-(2-(m-Iodoacetylaminophenyl)benzoxazole). *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *381*, 1095–1100.
- (43) Casella, I. G.; Contursi, M.; Desimoni, E. Amperometric Detection of Sulfur-Containing Compounds in Alkaline Media. *Analyst* **2002**, *127*, 647–652.
- (44) Moore, R. R.; Banks, C. E.; Compton, R. G. Electrocatalytic Detection of Thiols Using an Edge Plane Pyrolytic Graphite Electrode. *Analyst* **2004**, *129*, 755–758.
- (45) Nekrassova, O.; Lawrence, N. S.; Compton, R. G. Electrochemically Initiated Catalytic Oxidation of 5-Thio-2-Nitrobenzoic Acid (TNBA) in the Presence of Thiols at a Boron Doped Diamond Electrode: Implications for Total Thiol Detection. *Electroanalysis* **2003**, *15*, 1655–1660.
- (46) Zhao, Y.-D.; Zhang, W.-D.; Chen, H.; Luo, Q.-M. Electrocatalytic Oxidation of Cysteine at Carbon Nanotube Powder Microelectrode and Its Detection. *Sensors Actuators B Chem.* **2003**, *92*, 279–285.
- (47) Conlan, X. a; Stupka, N.; McDermott, G. P.; Francis, P. S.; Barnett, N. W. Determination of Intracellular Glutathione and Cysteine Using HPLC with a Monolithic Column after Derivatization with Monobromobimane. *Biomed. Chromatogr.* **2010**, *24*, 455–457.
- (48) Sadik, O. A.; Land, W. H.; Wang, J. Targeting Chemical and Biological Warfare Agents at the Molecular Level. *Electroanalysis* **2003**, *15*, 1149–1159.
- (49) Wei, F.; Patel, P.; Liao, W.; Chaudhry, K.; Zhang, L.; Arellano-Garcia, M.; Hu, S.; Elashoff, D.; Zhou, H.; Shukla, S.; Shah, F.; Ho, C.-M.; Wong, D. T. Electrochemical Sensor for Multiplex Biomarkers Detection. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 4446–4452.
- (50) Collman, J. P.; Chien, A. S.; Eberspacher, T. A.; Zhong, M.; Brauman, J. I. Competitive Reaction of Axial Ligands during Biomimetic Oxygenations. *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 4625–4629.
- (51) Corrêa, C. C.; Jannuzzi, S. A. V.; Santhiago, M.; Timm, R. A.; Formiga, A. L. B.; Kubota, L. T. Modified Electrode Using Multi-Walled Carbon Nanotubes and a Metallopolymer for Amperometric Detection of L-Cysteine. *Electrochim. Acta* **2013**, *113*, 332–339.

- (52) Wu, Y.; Luo, S.; Chen, L. Manganese Porphyrin Functionalized Graphene and Its Application on Dimethoate Electrochemical Sensor. *Adv. Mater. Res.* **2014**, *850-851*, 152–155.
- (53) Kuwahara, Y.; Akiyama, T.; Yamada, S. Construction of Gold Nanoparticle-Ruthenium (II) tris(2,2'-Bipyridine) Self-Assembled Multistructures and Their Photocurrent Responses. *Thin Solid Films* **2001**, *393*, 273–277.
- (54) Pillay, J.; Ozoemena, K. I.; Tshikhudo, R. T.; Moutloali, R. M. Monolayer-Protected Clusters of Gold Nanoparticles: Impacts of Stabilizing Ligands on the Heterogeneous Electron Transfer Dynamics and Voltammetric Detection. *Langmuir* **2010**, *26*, 9061–9068.
- (55) De Carvalho, M. A.; Andrade, P. F.; Corbi, F. C. A.; Gonçalves, M. do C.; Formiga, A. L. B.; Mazali, I. O.; Bonacin, J. A.; Corbi, P. P. A Simple Method to Synthesize Fluorescent Modified Gold Nanoparticles Using Tryptamine as the Reducing and Capping Agent. *Synth. Met.* **2013**, *185-186*, 61–65.
- (56) Toma, S. H.; Bonacin, J. a.; Araki, K.; Toma, H. E. Controlled Stabilization and Flocculation of Gold Nanoparticles by Means of 2-Pyrazin-2-Ylethanethiol and Pentacyanidoferrate(II) Complexes. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, *2007*, 3356–3364.
- (57) Mao, L.; Yuan, R.; Chai, Y.; Zhuo, Y.; Yang, X.; Yuan, S. Multi-Walled Carbon Nanotubes and Ru(bpy)₃(2+)/nano-Au Nano-Sphere as Efficient Matrixes for a Novel Solid-State Electrochemiluminescence Sensor. *Talanta* **2010**, *80*, 1692–1697.
- (58) De Oliveira, K. M.; dos Santos, T. C. C.; Dinelli, L. R.; Marinho, J. Z.; Lima, R. C.; Bogado, A. L. Aggregates of Gold Nanoparticles with Complexes Containing Ruthenium as Modifiers in Carbon Paste Electrodes. *Polyhedron* **2013**, *50*, 410–417.
- (59) Mohajer, D.; Jahanbani, M. A UV-Vis Study of the Effects of Alcohols on Formation and Stability of Mn(por)(O)(OAc) Complexes. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2012**, *91*, 360–364.
- (60) Kimling, J.; Maier, M.; Okenve, B.; Kotaidis, V.; Ballot, H.; Plech, a. Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 15700–15707.
- (61) Toma, H. E. *O Mundo Nanométrico: A Dimensão Do Novo Século*; Editora Oficina de Textos, Ed.; São Paulo, 2004.
- (62) Yatsuzuka, R. E.; De, N. Nanomateriais Híbridos de Porfirinas Supramoleculares E Nanopartículas de Ouro E Suas Aplicações Em Dispositivos Amperométricos, Universidade de São Paulo, 2007.
- (63) Fratoddi, I.; Battocchio, C.; Polzonetti, G.; Sciubba, F.; Delfini, M.; Russo, M. V. A Porphyrin-Bridged Pd Dimer Complex Stabilizes Gold Nanoparticles. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2011**, *2011*, 4906–4913.

- (64) Mayer, I.; Nunes, G. S.; Toma, H. E.; Araki, K. Steric and Catalytic Effects in Tetraruthenated Manganese Porphyrins. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2006**, *2006*, 850–856.
- (65) Valicsek, Z.; Horváth, O. Application of the Electronic Spectra of Porphyrins for Analytical Purposes: The Effects of Metal Ions and Structural Distortions. *Microchem. J.* **2013**, *107*, 47–62.
- (66) Salimi, A.; Hallaj, R. Catalytic Oxidation of Thiols at Preheated Glassy Carbon Electrode Modified with Abrasive Immobilization of Multiwall Carbon Nanotubes: Applications to Amperometric Detection of Thiocytosine, L-Cysteine and Glutathione. *Talanta* **2005**, *66*, 967–975.
- (67) Amini, M. K.; Khorasani, J. H.; Khaloo, S. S.; Tangestaninejad, S. Cobalt(II) Salophen-Modified Carbon-Paste Electrode for Potentiometric and Voltammetric Determination of Cysteine. *Anal. Biochem.* **2003**, *320*, 32–38.
- (68) Majd, S. M.; Teymourian, H.; Salimi, A. Fabrication of an Electrochemical L-Cysteine Sensor Based on Graphene Nanosheets Decorated Manganese Oxide Nanocomposite Modified Glassy Carbon Electrode. *Electroanalysis* **2013**, *25*, 2201–2210.
- (69) Santhiago, M.; Lima, P. R.; Santos, W. de J. R.; Kubota, L. T. An Amperometric Sensor for L-Cysteine Based on Nanostructured Platform Modified with 5,5'-Dithiobis-2-Nitrobenzoic Acid (DTNB). *Sensors Actuators B Chem.* **2010**, *146*, 213–220.
- (70) Razmi, H.; Heidari, H. Nafion/lead Nitroprusside Nanoparticles Modified Carbon Ceramic Electrode as a Novel Amperometric Sensor for L-Cysteine. *Anal. Biochem.* **2009**, *388*, 15–22.
- (71) Britton, H. T. S.; Robinson, R. A. CXCVIII. Universal Buffer Solutions and the Dissociation Constant of Veronal. *J. Chem. Soc.* **1923**, 1456–1462.
- (72) Kadish, K. M.; Han, B. C.; Franzen, M. M. Syntheses and Spectroscopic Characterization of $(T(P-Me_2N)_4PP)_M$ Where $T(P-Me_2N)_4PP$ Is the Dianion of Porphyrin and $M = Co(II), Cu(II),$ or $Ni(II)$. Structures of $(TF_5PP)_CoA$. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 8364–8368.
- (73) Lindsey, J. S.; Wagner, R. W. Investigation of the Synthesis of Ortho-Substituted Tetraphenylporphyrins. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 828–836.

Apêndices

Apêndice 1. Espectro de RMN de ^1H para a H_2TPFPF



Apêndice 2. Espectro de RMN de ^{19}F para a H_2TPFPF

