



Instituto de Química
Departamento de
Química Analítica



Laboratório de Eletroquímica,
Eletroanalítica e Desenvolvimento
de Sensores



Instituto Nacional de
C&T de Bioanalítica

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

“CONSTRUÇÃO DE PLATAFORMAS NANOESTRUTURADAS PARA DETECÇÃO DE Cys e NADH”

Autor: Murilo Santhiago

Orientador: Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota

Campinas
Fevereiro / 2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP**

Sa59c	<p>Santhiago, Murilo. Construção de plataformas nanoestruturadas para detecção de Cys e NADH / Murilo Santhiago. -- Campinas, SP: [s.n], 2010.</p> <p>Orientador: Lauro Tatsuo Kubota.</p> <p>Dissertação - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.</p> <p>1. Sensor amperométrico. 2. Nanotubos de carbono. 3. Cisteína. 4. NADH. I. Kubota, Lauro Tatsuo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.</p>
-------	--

Título em inglês: Construction of nanostructured platforms for detection of Cys and NADH

Palavras-chaves em inglês: Amperometric sensor, Carbon nanotubes, Cysteine, NADH

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Mestre em Química na área de Química Analítica

Banca examinadora: Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota (orientador), Prof. Dr. Mauro Bertotti (IQ-USP/SP), Prof. Dr. Jarbas José Rodrigues Rohwedder (IQ-UNICAMP)

Data de defesa: 22/02/2010

*Dedico esta dissertação à minha família,
pelo apoio incondicional,
com amor.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota, por ter me incentivado e orientado de maneira grandiosa desde o início do mestrado. Ficam aqui os meus sinceros agradecimentos pela ajuda imediata nos momentos críticos e, principalmente, de tornar possível à realização deste trabalho;

Aos amigos Phabyanno, Wilney e Caio, pela ajuda, incentivo, amizade e principalmente, companheirismo, qualidade difícil de se encontrar em uma área em que o individualismo predomina. Pessoas batalhadoras que não desanimam ao enfrentar as dificuldades proporcionadas pela vida;

Aos amigos de Blumenau Eduardo, Aldori, Raquel e Juliano pelo companheirismo que já ultrapassa uma década;

A todos os funcionários do Instituto de Química que colaboraram para a realização deste trabalho, especialmente a Izabel Aquino Calasso, Izabel Ribeiro Filippi, Miguel da Silva Morel e Nestor P. Maia pela atenção e ajuda;

Aos colegas do Laboratório LEEDS;

Ao CNPq pelo apoio financeiro;

CURRICULUM VITAE

Nome: Murilo Santhiago

Naturalidade: Blumenau-SC

Data de nascimento: 26/04/1984

I.0 Formação acadêmica

I.1 Química

Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis-SC

Início: 2003 / 2º. semestre término: 2007 / 2º. semestre

Título da monografia: “**Determinação de Ácido Rosmarínico Utilizando Sensor Biomimético Contendo Complexo Binuclear de Fe-Zn e Eletroforese Capilar**”.

Orientadora: Profa. Dra. Iolanda da Cruz Vieira

I.2 Mestrado em Química

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas-SP

Início: 2008 / 1º. semestre término: 2010 / 1º. semestre

Título da dissertação: “**Construção de Plataformas Nanoestruturadas para Detecção de Cys e NADH**”.

Orientador: Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota

II.0 Produção científica

II.1 Artigos publicados

II.1.1 SANTHIAGO, M. ; LIMA, P. R. ; SANTOS, W. J. R. ; OLIVEIRA, A. B. ; Kubota, L. T. In situ activated 3,5-dinitrobenzoic acid covalent attached to nanostructured platform for NADH electrooxidation. ***Electrochimica Acta*** 54 (2009) 6609 – 6616.

II.1.2 SANTHIAGO, M. ; PERALTA, R. A. ; NEVES, A. ; MICKE, G. A. ; VIEIRA, I. C. Rosmarinic acid determination using biomimetic sensor based on purple acid phosphatase mimetic. ***Analytica Chimica Acta*** 613 (2008)91 – 97.

II.1.3 CARVALHO, M. L. ; SANTHIAGO, M. ; PERALTA, R. A. ; NEVES, A. ; MICKE, G. A. ; VIEIRA, I. C. Determination of chlorogenic acid in coffee using a biomimetic sensor based on a new tetranuclear copper(II) complex. ***Talanta*** 77 (2008) 394 – 399.

II.1.4 SANTHIAGO, M. ; VIEIRA, I. C. L-cysteine determination in pharmaceutical formulations using a biosensor based on laccase from *Aspergillus oryzae*.. ***Sensors and Actuators B*** 128 (2007) 279 – 285.

II.1.5 SANTHIAGO, M. ; LIMA, P. R. ; SANTOS, W. 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 and Actuators B***, 2010.

II.3 Trabalhos completos apresentados em eventos científicos

II.3.1 OLIVEIRA, C. N. ; LIMA, P. R. ; SANTHIAGO, M. ; KUBOTA, L. T. Determinação de parâmetros cinéticos do sistema 1,2-NQ/MWCNT imobilizada sobre ouro para oxidação eletrocatalítica de NADH. In: XVII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2009, Fortaleza-CE.

II.3.2 SANTHIAGO, M. ; LIMA, P. R. ; SANTOS, W. J. R. ; KUBOTA, L. T. Desenvolvimento de uma interface nanoestruturada para detecção eletrocatalítica de NADH. In: XVII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2009, Fortaleza-CE.

RESUMO

Título: “Construção de Plataformas Nanoestruturadas para Detecção de Cys e NADH”.

Autor: Murilo Santhiago

Orientador: Lauro Tatsuo Kubota

Palavras-chave: Sensor amperométrico, nanotubos de carbono, cisteína e NADH.

Neste trabalho descreve-se o desenvolvimento de dois sensores amperométricos empregando mediadores redox derivados do grupo nitro imobilizados sobre plataformas nanoestruturadas para a detecção da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e L-cisteína. Para a construção da base das plataformas foram empregados nanotubos de carbono funcionalizados com grupos amino. Uma vez funcionalizada, a plataforma possibilitou o ancoramento dos dois mediadores redox. Para a detecção de NADH foi utilizado o ácido 3,5-dinitrobenzoico como mediador redox. Este mediador foi imobilizado na superfície da plataforma utilizando os catalisadores 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodimida (EDC) e N-hidroxi succinimida (NHS). Já para o sensor destinado à detecção de L-cisteína, foi necessário a adsorção de nanopartículas de ouro para imobilizar o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) como mediador redox. Para os estudos eletroquímicos, as espécies hidroxilamina foram eletrogeradas *in situ* a partir do grupo nitro presente em ambos os mediadores. As plataformas nanoestruturadas foram caracterizadas através de voltametria cíclica, cronoamperometria, MEV e eletrodo de disco rotatório. Os valores das constantes heterogênea de transferência de elétrons (k_s) e da velocidade da reação mediador-analito foram $\sim 50 \text{ s}^{-1}$ e $10^3 - 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectivamente. As curvas analíticas para ambos os sensores foram obtidas aplicando baixos sobrepotenciais e resultaram em limites de detecção e quantificação na faixa de $1,2 - 9,1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. O sensor para L-cisteína foi aplicado em amostras reais e os resultados obtidos foram estatisticamente iguais quando confrontados com um método comparativo.

ABSTRACT

Title: “Construction of nanostructured platforms for Cys and NADH detection”.

Author: Murilo Santhiago

Adviser: Lauro Tatsuo Kubota

Keywords: Amperometric sensor, carbon nanotubes, cysteine and NADH.

This work describes the development of two amperometric sensors using redox mediators derived from the nitro group immobilized on nanostructured platforms for the detection of nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) and L-cysteine. Carbon nanotubes functionalized with amino groups were used for the construction of the platforms. Once functionalized, the platform allowed the anchoring of two redox mediators. 3,5-dinitrobenzoic acid was used as redox mediator for NADH detection. This mediator was immobilized on the surface of the platform using the catalysts 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodimide (EDC) and N-hydroxy-succinimide (NHS). For the construction of the sensor for L-cysteine detection, it was necessary the adsorption of gold nanoparticles to receive 5,5-dithio-2-nitrobenzoic acid as redox mediator. For the electrochemical studies, the hydroxylamine species were electrogenerated in situ from the nitro group present in both mediators. Nanostructured platforms were characterized by cyclic voltammetry, chronoamperometry, SEM and by rotating disk electrode experiments. Rate constant values for the heterogeneous electron transfer (k_s) and the kinetic constants for the mediator-analyte reaction were $\sim 50 \text{ s}^{-1}$ e $10^3 - 10^4 \text{ L mol}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectively. The analytical curves for both sensors were obtained applying low overpotentials and resulted in limits of detection and quantification around 1.2 up to $9.1 \mu\text{mol L}^{-1}$. The sensor for L-cysteine was used in pharmaceutical samples and the results were statistically the same to those obtained with a comparative method.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	xix
LISTA DE TABELAS	xxiii
LISTA DE FIGURAS	xxv
APRESENTAÇÃO	xxxi
CAP. I INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	1
I.1 L-cisteína (Cys)	3
I.2 NADH	4
I.3 Detecção de Cys e NADH	5
I.4 Mediadores redox	6
I.5 Nanoestruturas	10
I.6 Nanotubos de carbono	11
I.6.1 Carbono	11
I.6.2 Síntese, estrutura e propriedades eletrônicas	12
I.6.3 Propriedades químicas	14
I.6.4 Propriedades eletroquímicas	16
I.6.5 Funcionalização dos nanotubos	18
I.6.5.1 Modificação covalente	18
I.6.5.2 Modificação não-covalente	20
I.7 Nanopartículas de ouro	22
I.8 Motivação	24
I.9 Objetivos	24
I.9.1 Geral	24

I.9.2	Específicos	25
CAP. II	PARTE EXPERIMENTAL	27
II.1	Parte experimental	29
II.1.2	Reagentes e soluções	29
II.1.3	Equipamentos	29
II.1.4	Limpeza do eletrodo de trabalho	30
II.1.5	Sensor para Cys (Sen-Cys)	31
II.1.5.1	Planejamento fatorial	32
II.1.6	Sensor para NADH (Sen-NADH)	32
II.1.7	Micrografias	33
II.1.8	Preparo das amostras	33
II.1.9	Estudo de repetibilidade, estabilidade e tempo de vida do sensor	34
CAP. III	SENSOR PARA CISTEÍNA	35
III.1	Apresentação do capítulo	37
III.2	Resultados e discussão	39
III.2.1	Planejamento fatorial	39
III.2.2	Caracterização da plataforma por MEV	40
III.2.3	Ativação e caracterização do par redox	41
III.2.4	Atividade eletrocatalítica da plataforma nanoestruturada	47
III.2.5	Estudos cronoamperométricos	49
III.2.6	Caracterização analítica	54
III.2.7	Estabilidade do sensor	60

III.2.8	Aplicação do sensor	60
III.2.9	Conclusões	61
CAP. IV	SENSOR PARA NADH	63
IV.1	Apresentação do capítulo	65
IV.2	Resultados e discussão	67
IV.2.1	Caracterização por MEV e imobilização do mediador	67
IV.2.2	Ativação e caracterização do par redox	69
IV.2.3	Atividade eletrocatalítica da plataforma nanoestruturada	72
IV.2.4	Efeito da ativação dos grupos nitro do mediador	74
IV.2.5	Estudos cronoamperométricos	75
IV.2.6	Estudos com eletrodo de disco rotatório	77
IV.2.7	O grupo R-NO/R-NHOH como mediador redox	85
IV.2.8	Mecanismo da eletrooxidação de NADH na plataforma	86
IV.2.9	Caracterização analítica	87
IV.2.10	Estabilidade do sensor	95
IV.2.11	Conclusões	95
CAP. V	CONCLUSÕES GERAIS	97
V.1	Conclusões gerais	99
CAP. VI	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
VI.1	Referências bibliográficas	103
CAP. VII	PERSPECTIVAS	113
VII.1	Perspectivas	115

LISTA DE ABREVIATURAS

3,5-DNB	Ácido 3,5-dinitrobenzoico
3,5-DNBSE	(Ácido 3,5-dinitrobenzoico) succinimidil éster
A	Área do eletrodo
α	Coeficiente de transferência de elétrons
Ag/AgCl	Eletrodo de referência de prata/cloreto de prata
C	Concentração de Cys ou NADH (Eq. Cottrell e Eq.III.4)
C_h	Vetor de empacotamento
CNTs	Nanotubos de carbono
Coef. Ang.	Coeficiente angular
Cys	L-cisteína
D	Coeficiente de difusão
ΔE	$E_p - E^{o'}$
ΔE_p	Separação dos potenciais de pico
ΔI	Delta de corrente
ECS	Eletrodo de calomelano saturado
ECV	Eletrodo de carbono vítreo
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodimida
DMF	N'N dimetil formamida
D.P.R.	Desvio padrão relativo
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico
E_{apl.}	Potencial aplicado
EDR	Eletrodo de disco rotatório
E_p	Potencial de pico
E^{o'}	Potencial formal ($E_{pa} + E_{pc} / 2$)
F	Constante de Faraday

FIA	Análise por injeção em fluxo
HEPES	[N-(2-hidroxietil)piperazina-N-(ácido 2-etanosulfônico)]
HOPG	Grafite pirolítico altamente ordenado
I	Corrente
I_{cat}	Corrente catalítica na presença de Cys ou NADH
$I_{d(L)}$	Corrente limitada pelo transporte de massa
I_{kin}	Corrente limitada cineticamente
I_L	Corrente na ausência de Cys ou NADH
I_{pa}	Corrente de pico anódica
I_{pc}	Corrente de pico catódica
K_M	Constante de Michaelis-Menten
k_{obs}	Constante cinética da reação mediador-analito
k_s	Constante de velocidade heterogênea de transferência de elétrons
MEV	Microscópio eletrônico de varredura
M_{ox}	Mediador redox no estado oxidado
M_{red}	Mediador redox no estado reduzido
MWCNTs	Nanotubos de carbono de paredes múltiplas
n	Número de elétrons
n_p	Número de prótons
NADH	β -nicotinamida adenina dinucleotídeo
NHS	N-hidroxi succinimida
NPAus	Nanopartículas de ouro
PBS	Solução tampão fosfato
PEG	Polietilenoglicol
PEI	Polietilenoimina
PIPES	[Piperazina-N-N-bis[(ácido 2-etanosulfônico)]]

Q	Carga
R	Constante universal do gases
SAM	Monocamada auto-organizada
Sen-Cys	Sensor para cisteína
Sen-NADH	Sensor para NADH
SWCNTs	Nanotubos de carbono de paredes simples
Γ	Cobertura aparente de superfície
t	tempo
T	Temperatura
θ_p	Ângulo de piramidalização
TRIS	[Tris(hidroximetil) amino-metano]
TRITON-100	Polietilenoglicol p-(1, 1, 3, 3-tetrametilbutil)-fenil éter
VC	Voltametria cíclica
VPD	Voltametria de pulso diferencial
v	Velocidade de varredura
v_a	Velocidade de varredura do processo anódico
v_c	Velocidade de varredura do processo catódico
ω	Velocidade de rotação do eletrodo
ν	Viscosidade cinemática

LISTA DE TABELAS

CAP. III. Sensor para Cys

Tabela III.1	Parâmetros eletroquímicos e cinéticos de alguns eletrodos modificados com alguns mediadores redox.	45
Tabela III.2	Parâmetros e condições experimentais extraídos a partir de estudos cronoamperométricos para a eletrooxidação de Cys.	51
Tabela III.3	Caracterização analítica do sensor destinado a detecção de Cys.	54
Tabela III.4	Métodos eletroquímicos, condições experimentais e parâmetros analíticos para a determinação de Cys.	58
Tabela III.5	Determinação de Cys nas amostras.	61

CAP.IV. Sensor para NADH

Tabela IV.1	Comparação entre a corrente catalítica da NADH em função do procedimento de ativação do 3,5-DNB ancorado na plataforma.	74
Tabela IV.2	Parâmetros eletroquímicos e cinéticos de alguns eletrodos modificados para eletrooxidação de NADH.	84
Tabela IV.3	Caracterização analítica do sensor destinado a detecção de NADH.	88
Tabela IV.4	Métodos eletroquímicos, condições experimentais e parâmetros analíticos para a determinação de NADH.	91

LISTA DE FIGURAS

I. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Figura I.1	Estrutura da L-cisteína.	3
Figura I.2	Estrutura da NADH e NAD(P)H.	4
Figura I.3	Esquema de comparação entre processos de oxidação eletroquímicos: (I) direto e (II) indireto ou mediado. M_{ox} e M_{red} representam um par redox qualquer confinado na superfície do eletrodo. (A) e (B) representam o analito no seu estado reduzido e oxidado, respectivamente.	7
Figura I.4	Esquema da estratégia eletroquímica utilizada para formação do par redox nitroso/hidroxilamina a partir do grupo nitro.	9
Figura I.5	Nanotubo de carbono de paredes simples (SWCNT) e múltiplas (MWCNT).	12
Figura I.6	(A) Coordenada dos vetores que definem o empacotamento dos nanotubos e (B) tipo de estruturas normalmente encontradas.	13
Figura I.7	Estrutura e hibridização dos átomos de carbono para (a) diamante, (b) grafite, (c) fulereno e (d) nanotubo de carbono. Esquema mostrando os ângulos entre as ligações σ e π do átomo de carbono de geometria (e) trigonal planar e (f) tetraédrica.	15
Figura I.8	Representação esquemática das folhas do HOPG incluindo as indicações dos planos basal e edge.	17
Figura I.9	Esquema ilustrando os tipos mais comuns de reações covalentes nas extremidades/defeitos e nas paredes laterais dos CNTs.	19
Figura I.10	Representação esquemática das modificações não-covalentes nos CNTs. (A) Adsorção de polímeros, DNA ou proteínas e (B) exemplos de algumas modificações covalentes após imobilização de pirenos contendo grupos funcionais (GF).	21

Figura I.11 Desenho esquemático das rotas mais utilizadas para a 23
imobilização de NPAs por: (A) atração eletrostática, (B)
adsorção de tióis e (C) adsorção de polímeros.

II. PARTE EXPERIMENTAL

Figura II.1 Esquema ilustrando a célula eletroquímica com capacidade 30
para três eletrodos (ECV = eletrodo de carbono vítreo, ECS
= eletrodo de calomelano saturado e Pt = eletrodo auxiliar) e
um local para a entrada de N_2 .

III. SENSOR PARA CISTEÍNA

Figura III.1 Fórmula estrutural do ácido 5,5-ditio-2-nitrobenzoico 37
(DTNB).

Figura III.2 Diagrama de Pareto (A) e superfícies de resposta para PEI 39
– DTNB (B), MWCNTs – PEI (C) e MWCNTs – DTNB (D).

Figura III.3 Micrografias da superfície nas etapas de construção do 41
sensor: (A) MWCNTs, (B) +PEI, (C) +NPAu e (D) +DTNB.
Gráfico inserido: voltamograma cíclico em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$
e $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Figura III.4 Processo de ativação do mediador redox obtido em solução 42
tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 e $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Figura III.5 Voltamogramas cíclicos do eletrodo modificado com o 44
DTNB-ativado em várias velocidades de varredura ($10 - 600 \text{ mV s}^{-1}$). (A) Gráfico de I_p vs. v . (B) Gráfico de Laviron.

Figura III.6 Influência do pH da solução no potencial formal (A) e na 46
corrente de pico (B) do mediador redox a partir de
voltamogramas cíclicos registrados em solução tampão
fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Figura III.7 Gráfico de ΔE_p versus pH. 47

Figura III.8	Voltamogramas cíclicos obtidos em solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,0 na presença de Cys 1,0×10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ em 2 mV s ⁻¹ (—) para (A) ECV, (B) +MWCNTs, (C) +PEI, (D) +NPAu, (E) +DTNB-ativado e (----) na ausência de Cys, respectivamente.	48
Figura III.9	Cronoamperogramas obtidos em solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,0: branco (a), 50,0 (b) 75,0 (c), 100,0 (d) e 125,0 (e) μmol L ⁻¹ de Cys.	49
Figura III.10	(A) Gráfico de I_{cat} / I_L vs. $t^{1/2}$; (B) gráfico obtido a partir dos coeficientes angulares das retas obtidas em (A) vs. $[Cys]^{1/2}$.	51
Figura III.11	(A) gráfico I vs. $t^{-1/2}$ e (B) gráfico dos coeficientes angulares obtidos em (A) vs. $[Cys]$. As concentrações de Cys utilizadas são as mesmas dos cronoamperogramas mostrados na Figura III.8.	52
Figura III.12	Proposta para as reações que ocorrem na superfície da plataforma nanoestruturada.	53
Figura III.13	Estrutura, composição e ordem de resposta analítica dos tipos de eletrólitos de suporte estudados na caracterização analítica do sensor.	55
Figura III.14	Resposta cronoamperométrica observada após adições sucessivas de uma solução estoque de Cys em solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,0 para: (A) ECV, (B) +MWCNTs, (C) +PEI, (D) +NPAu e (E) +DTNB-ativado.	56
Figura III.15	Curva analítica.	57

IV. SENSOR PARA NADH

Figura IV.1	Fórmula estrutural do ácido 3,5-dinitrobenzoico (3,5-DNB).	65
Figura IV.2	Micrografias obtidas da plataforma nanoestruturada contendo MWCNTs/PEI para as magnificações: (A) 1,000× e (B) 10,000×.	67

- Figura IV.3** (A) Esquema de formação do intermediário 3,5-DNBSE a partir de uma solução contendo 3,5-DNB, EDC e NHS. (B) Mediador redox imobilizado na superfície da plataforma. 68
- Figura IV.4** Formação do par redox R-NO/R-NHOH em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 e $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$. 70
- Figura IV.5** Voltamogramas cíclicos do par R-NO/R-NHOH em várias velocidades de varredura (10 – 800 mV s⁻¹). (A) Gráfico de I_p vs. ν . (B) Gráfico de Laviron. 70
- Figura IV.6** Voltamogramas cíclicos obtidos em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ para o eletrodo modificado com o 3,5-DNB-ativado em diferentes pHs (5,0 – 8,0) e $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$ Inserido: Gráfico de E^0 vs pH. 72
- Figura IV.7** Voltamogramas cíclicos obtidos em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 e $\nu = 2 \text{ mV s}^{-1}$ na presença de NADH $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (—) para (A) ECV não modificado, (B) ECV modificado com MWCNTs/PEI, (C) ECV modificado com MWCNTs/PEI/3,5-DNB e (---) na ausência de NADH, respectivamente. 73
- Figura IV.8** Cronoamperogramas do eletrodo modificado com a plataforma contendo o 3,5-DNB-ativado em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 para: (a) branco, (b) 50, (c) 100, (d) 150 e (e) 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de NADH. Gráficos inserido: I_{cat} / i_L vs. $t^{1/2}$ para 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de NADH. 76
- Figura IV.9** (A) Gráfico de Q vs $t^{1/2}$ utilizando as mesmas condições experimentais dos cronoamperogramas ilustrados na Figura IV.8 e (B) Gráfico de $Qt^{1/2}$ versus [NADH]. 77
- Figura IV.10** Curvas de polarização obtidas em diferentes velocidades de rotação do eletrodo para a oxidação eletrocatalítica de 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de NADH na superfície da plataforma contendo o 3,5-DNB-ativado. Velocidades de rotação: (a) 5,20 ; (b) 7,67 ; (c) 10,89 ; (d) 16,40 ; (e) 23,72 ; (f) 34,00 e (g) 45,70 rad s⁻¹. Estudos feitos em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0, $\nu = 2 \text{ mV s}^{-1}$ e $\Gamma = 2,38 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^2$. 78

- Figura IV.11** Gráficos de Levich para a resposta eletrocatalítica da 79
plataforma nanoestruturada contendo o 3,5-DNB-ativado
em diferentes concentrações de NADH. Estudos feitos em
tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0, $\nu = 2$ mV s⁻¹ e $\Gamma = 2,38 \times 10^{-10}$ mol cm².
- Figura IV.12** Gráfico de Koutecky-Levich obtidos a partir da Figura IV.11. 81
Estudos feitos em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0, $\nu = 2$
mV s⁻¹ e $\Gamma = 2,38 \times 10^{-10}$ mol cm².
- Figura IV.13** (A) Variação de k_{obs} versus [NADH] para o eletrodo 82
modificado com a plataforma contendo o 3,5-DNB-ativado e
(B) variação de k_{obs}^{-1} versus [NADH]. Estudos feitos em
tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0, $\nu = 2$ mV s⁻¹ e $\Gamma = 2,38 \times 10^{-10}$ mol cm².
- Figura IV.14** Proposta para as reações que ocorrem na superfície da 87
plataforma na presença de NADH.
- Figura IV.15** Resposta cronoamperométrica observada após adições 89
sucessivas de uma solução estoque de NADH em solução
tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 para: (A) ECV, (B)
+MWCNTs/PEI, (C) +3,5-DNB-ativado.
- Figura IV.16** Curva analítica. 90

APRESENTAÇÃO

Materiais com propriedades exaustivamente estudadas durante anos podem apresentar ainda alguma melhora no seu desempenho? Esta pergunta só terá uma resposta negativa se não houver mais possibilidades de inovar e/ou estabelecer novas condições de trabalho para esses materiais. Certamente, do modo como a pesquisa científica avança não será inviável agregar novas propriedades para os materiais já bem estabelecidos. Um exemplo claro de tal contribuição poderá ser observado neste trabalho onde serão construídas plataformas nanoestruturadas sobre o eletrodo de carbono vítreo visando melhorar as propriedades interfaciais do eletrodo e, fornecer ainda, condições que possibilitem a imobilização de mediadores redox. Para apresentar essa contribuição o presente trabalho foi dividido em capítulos no sentido de abordar detalhadamente cada plataforma construída.

O primeiro capítulo abordará uma pequena introdução sobre os analitos selecionados, características gerais dos nanomateriais utilizados, estratégias adotadas, alguns princípios teóricos e por fim, a motivação e os objetivos deste trabalho.

No segundo capítulo serão apresentados os reagentes e equipamentos empregados, rotas de preparação das plataformas e condições experimentais adotadas nos experimentos.

No terceiro capítulo serão abordados os resultados referentes à construção, caracterização, estudo das propriedades eletrocatalíticas e aplicação de uma plataforma nanoestruturada como sensor amperométrico para a detecção de cisteína. Visando à construção de um biossensor, no quarto capítulo serão apresentados os resultados relacionados com a caracterização e estudo das propriedades eletrocatalíticas de uma plataforma nanoestruturada para a detecção eletrocatalítica de NADH.

Os últimos capítulos serão destinados às conclusões gerais, referências bibliográficas e perspectivas futuras.

CAPÍTULO I



INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

I.1 L-cisteína (Cys)

A cisteína (Cys), Figura I.1, é um dos aminoácidos mais importantes e também uma molécula bioativa de grande significância. A sua participação no sítio ativo de enzimas e em muitos outros peptídeos e proteínas também já foi reportada [1]. Além disso, este aminoácido participa em um grande número de processos bioquímicos, os quais dependem diretamente da reatividade relacionada com o grupo tiol (R-SH). A cisteína é também largamente empregada na indústria farmacêutica e alimentícia como antioxidante [2].

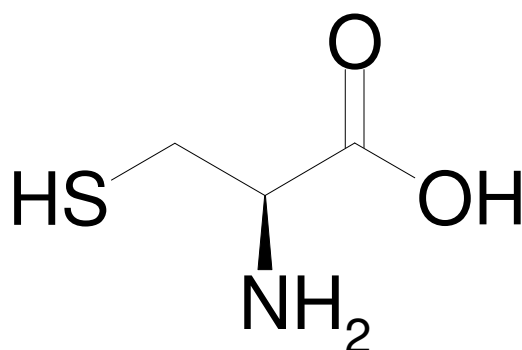
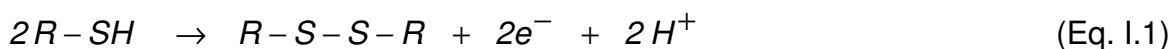


Figura I.1. Estrutura da L-cisteína.

A sua ação antioxidante está relacionada diretamente com o processo redox do grupo tiol [1]. Este grupo é encontrado também em outras moléculas bioativas de grande importância como a glutathione, N-acetil-cisteína e o ácido lipoico. A função R-SH é o grupo mais facilmente oxidável presente nas moléculas citadas e, portanto, o processo redox dessas moléculas pode ser descrito de maneira genérica pela Equação I.1 abaixo.



Além do processo descrito acima, a cisteína pode estar envolvida na modulação da atividade de proteínas através de eventos envolvendo reações de complexação do grupo tiol com metais de transição (Zn^{2+} , Mn^{2+} e Cu^{2+}) [3].

I.2 NADH

Os nucleotídeos NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo) e NAD(P)H (grupo fosfato substituindo o grupo hidroxila) ilustrados na Figura I.2 estão onipresentes em quase todos os sistemas vivos e são necessários para reações de mais de 400 óxido-redutases denominadas desidrogenases (250 dependentes do NADH e por volta de 150 do NAD(P)H). Este número representa 17 % de todas as enzimas classificadas e conseqüentemente, estes nucleotídeos são responsáveis por mais reações enzimáticas do que qualquer outro cofator [4].

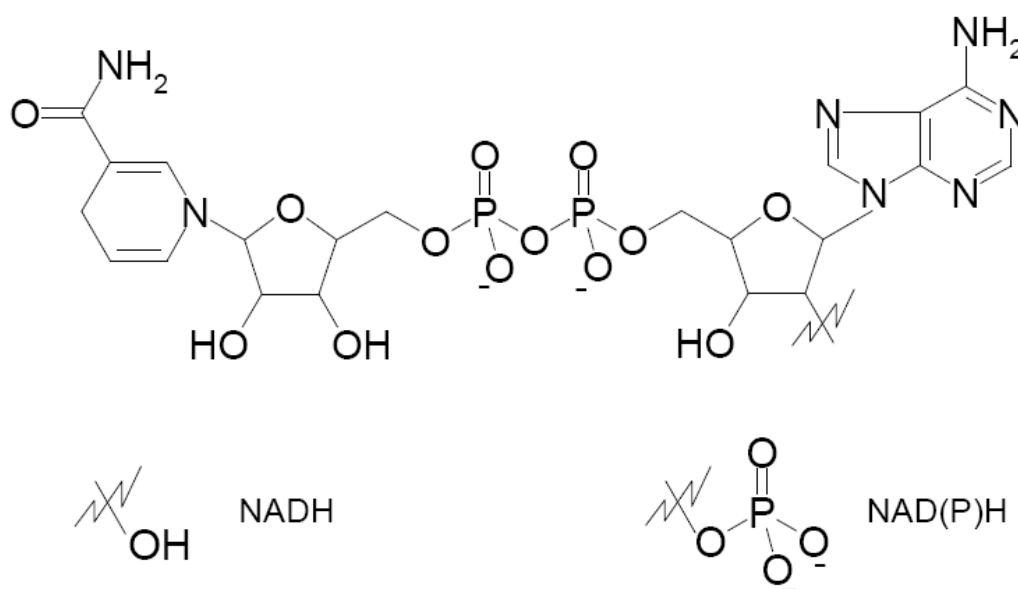


Figura I.2. Estrutura do NADH e NAD(P)H.

O papel desses cofatores não-proteicos em reações catalisadas por enzimas é servir como aceptor/doador de elétrons e com isso, acabam sendo cruciais no transporte de elétrons em sistemas biológicos [5]. A reação de oxidação do NADH é descrita pela Equação I.2 abaixo:



O processo de oxidação envolve 2 elétrons e 1 próton e ocorre no anel da nicotinamida. Quando uma enzima ou outras moléculas estão presentes no meio reacional o processo redox descrito pode ser mais complexo e apresentar uma

etapa limitante da velocidade. Sendo assim, visando à construção de biossensores amperométricos, os químicos empregam técnicas eletroquímicas para conhecer e/ou elucidar os sistemas dependentes do processo NADH/NAD⁺ [6].

I.3 Detecção de Cys e NADH

A detecção de cisteína e NADH é efetuada normalmente através de técnicas espectrofotométricas [7-9], cromatográficas [10-12] e eletroquímicas [13-15]. As técnicas espectrofotométricas usualmente necessitam de inúmeras soluções e reagentes para o desempenho do método. Zaia e col. desenvolveram um método espectrofotométrico para determinação de cisteína monitorando o produto da reação da cisteína com a p-benzoquinona em 500 nm [7]. Além de necessitar de uma elevada concentração de p-benzoquinona, o método precisa de uma etapa de aquecimento/resfriamento para promover a reação de Michael, o qual aumenta muito o tempo de análise. Já a detecção de NADH por métodos espectrofotométricos visando trabalhos analíticos não é muito frequente, no entanto, o monitoramento da absorção do NADH em 340 nm é normalmente utilizado para a avaliação da atividade de enzimas que são dependentes desse cofator [9].

Ao contrário da espectrofotometria, os métodos cromatográficos apresentam elevado destaque no que se diz respeito à determinação de inúmeros componentes em uma amostra. Os métodos cromatográficos superam a falta de seletividade dos métodos espectrofotométricos, que se deve ao fato de que grande parte dos reagentes utilizados nas análises reagem com qualquer grupo tiol presente na amostra. Desta forma, alguns trabalhos envolvendo cromatografia líquida de alta eficiência e gasosa já foram propostos para a determinação de cisteína e outros antioxidantes [10-11]. Para o caso do NADH, os métodos cromatográficos surgiram principalmente para contribuir com o aspecto mecanístico das reações envolvendo nucleotídeos em sistemas biológicos. Myiatake e col. desenvolveram um método cromatográfico que possibilitou a

determinação de 7 nucleotídeos derivados da adenina. O principal objetivo do trabalho foi fornecer uma ferramenta poderosa para químicos e biólogos estudarem os produtos enzimáticos gerados por enzimas dependentes do NADH [12]. No entanto, as técnicas cromatográficas necessitam para sua operação de solventes ou gases de elevada pureza tornando o custo da análise mais elevado quando comparado, por exemplo, com as técnicas eletroquímicas.

Por sua vez, as técnicas eletroquímicas apresentam limites de detecção mais apreciáveis que as técnicas espectrofotométricas e um custo operacional menor do que as cromatográficas. Entretanto, a cisteína e o NADH se oxidam em altos sobrepotenciais em eletrodos convencionais como de carbono, platina ou ouro. Em eletrodos de carbono, este elevado sobrepotencial pode ser diminuído por um pré-tratamento, mas, estes eletrodos são rapidamente desativados [13].

Além do sobrepotencial, outro problema relacionado com a eletrooxidação do NADH é que o produto da oxidação (NAD^+) pode adsorver na superfície do eletrodo, dificultando a transferência de carga e tornando o sensor inativo [14-15]. Recentemente, Damian e Omanovic publicaram um trabalho mostrando que o processo de adsorção do NAD^+ sobre eletrodos de ouro é altamente espontâneo e ocorre tanto para superfícies com cargas positivas quanto negativas [16].

Por outro lado, não há relatos relacionados à adsorção do produto de oxidação da Cys na superfície de eletrodos como o de carbono vítreo ou platina mas, a aplicação de elevados sobrepotenciais compromete a seletividade do método. Além dos problemas relacionados com a seletividade, a sensibilidade na detecção da Cys e NADH nesses eletrodos é muito baixa. Assim, para contornar os problemas frequentemente observados, muitos eletrodos convencionais têm sido modificados com mediadores redox para a detecção de NADH e Cys.

I.4 Mediadores redox

Os mediadores redox podem ser definidos como qualquer tipo de substância que facilite a transferência de elétrons entre a espécie de interesse e a superfície do eletrodo [17]. A Figura I.3 ilustra um esquema da superfície do

eletrodo que compara um processo de oxidação eletroquímico direto e um processo indireto ou mediado.

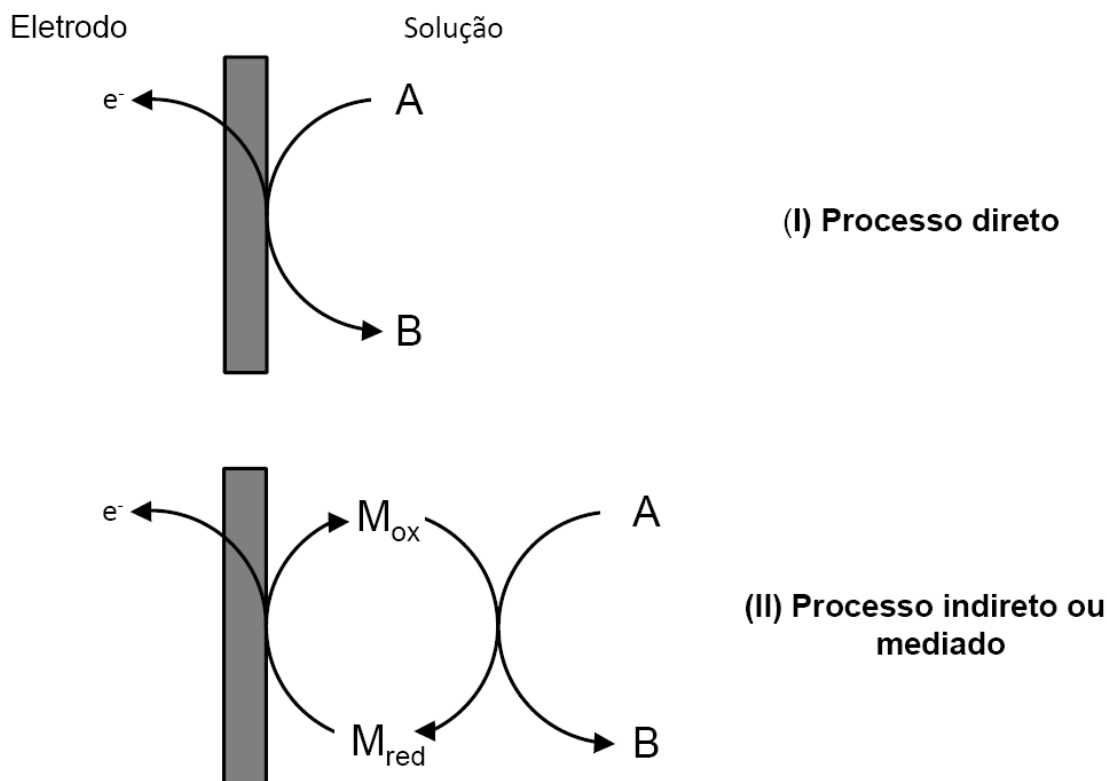


Figura I.3. Esquema de comparação entre processos de oxidação eletroquímicos: (I) direto e (II) indireto ou mediado. M_{ox} e M_{red} representam um par redox qualquer confinado na superfície do eletrodo. (A) e (B) representam o analito no seu estado reduzido e oxidado, respectivamente.

No processo direto, ilustrado na Figura I.3(I), o analito no seu estado reduzido se aproxima da superfície do eletrodo por difusão e sofre oxidação na interface eletrodo-solução. Desta forma, se (A) for cisteína ou NADH o processo só irá ocorrer em elevados sobrepotenciais. No entanto, quando um mediador redox está presente na superfície do eletrodo a conversão (A) \rightarrow (B) ocorre através do mediador e não diretamente na superfície do eletrodo (Figura I.3(II)) [17]. Neste caso, a forma oxidada do mediador (M_{ox}) atua como um receptor de elétrons e oxida o analito. Essa reação ocorre com uma certa velocidade e pode

ser monitorada por cronoamperometria [18] e através de experimentos utilizando o eletrodo de disco rotatório [19]. Após a reação, o produto oxidado (B) e a forma reduzida do mediador (M_{red}) são formados. Assim, o sobrepotencial necessário que deve ser aplicado para que a reação de oxidação de (A) \rightarrow (B) aconteça agora é modulado pelo potencial formal do par redox do mediador que está confinado na superfície do eletrodo [20].

Em alguns casos, mesmo na presença de um mediador redox, não ocorre nenhum deslocamento catódico do potencial de oxidação dos analitos, mas a corrente associada ao processo é maior e promove, portanto, um ganho de sensibilidade [21].

E qual propriedade do mediador redox deve ser empregada? A quem diminua o potencial de oxidação ou a quem aumente a sensibilidade? A resposta é simples. Ambas. As características desejáveis de um mediador redox são: (i) transferência eletrônica rápida entre mediador-analito e mediador-eletrodo, (ii) potencial formal em baixos sobrepotenciais para evitar a oxidação de possíveis espécies interferentes e (iii) estabilidade das formas oxidada e reduzida [22].

As características mencionadas já foram exploradas empregando vários tipos de mediadores redox destinados para detectar Cys ou NADH como: quinonas [23-24], complexos de metais de transição [25-26], nanopartículas metálicas [27-28], corantes [29-30] e etc. No entanto, moléculas que apresentam o grupo funcional nitro ($R-NO_2$) têm se destacado bastante nos últimos anos como estratégia para a formação de pares redox que se enquadram nas características desejáveis para um mediador.

O grupo nitro, no seu estado oxidado, não tem atividade eletrocatalítica para a oxidação de tióis ou NADH [31]. Por outro lado, quando reduzido eletroquimicamente *in situ*, o grupo nitro é transformado no grupo hidroxilamina. A hidroxilamina formada pode, assim, ser oxidada para nitroso (par $R-NO/R-NHOH$), através de um processo redox envolvendo $2e^-/2H^+$, resultando em um par redox estável confinado na superfície do eletrodo, Figura I.4.

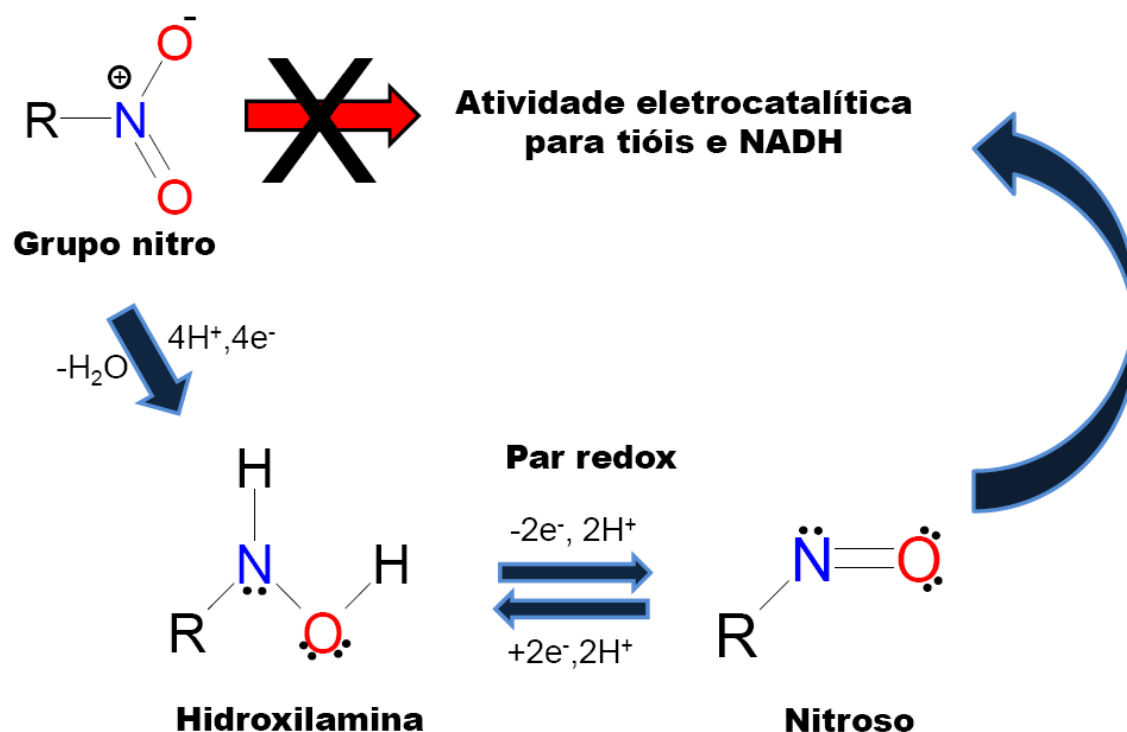


Figura I.4. Esquema da estratégia eletroquímica utilizada para formação do par redox nitroso/hidroxilamina a partir do grupo nitro.

Uma vez estabelecida a molécula com o seu o par redox, a questão que deve ser respondida é: como será feita a imobilização do mediador na superfície do eletrodo? Para efetuar o processo de imobilização a porção R ilustrada na Figura I.4, que representa o restante da molécula do mediador, é normalmente utilizada para tal processo [32]. No entanto, essa porção R precisa ser combinada com eletrodos convencionais (ouro, platina e carbono vítreo), que basicamente são materiais que apresentam poucos grupos funcionais. Enquanto que os eletrodos de ouro podem ser facilmente funcionalizados empregando monocamadas auto-organizadas de tióis, a criação de grupos funcionais nos eletrodos de carbono é muito mais difícil e exige condições drásticas para a funcionalização, incluindo: aquecimento sob atmosfera rica em oxigênio [33], aquecimento em meio ácido [34] e tratamento eletroquímico em meio ácido [35,36] ou alcalino [37]. Estes métodos proporcionam a formação de cetonas, ácidos carboxílicos, quinonas e de grupos hidroxila na superfície [38-39]. Por outro lado, a

quantidade e a natureza desses grupos são muito difíceis de serem controlados. Por esta razão, na modificação da superfície de carbono, tratamentos oxidativos são raramente empregados atualmente [40].

Assim, buscando contornar este tipo de problema, a combinação da porção R do mediador juntamente com materiais nanoestruturados imobilizados sobre eletrodos convencionais é uma abordagem relativamente recente e traz propriedades interfaciais interessantes [41-42]. Essas nanoestruturas podem funcionar como uma plataforma para receber os mais variados tipos de mediadores redox e enzimas [43].

I.5 Nanoestruturas

Nanoestruturas se referem a materiais que apresentam escala de tamanho na ordem nanométrica. Uma maneira de classificar as nanoestruturas é baseada nas regiões em que os elétrons podem se mover livremente, que dependem basicamente do formato da nanoestrutura (tubos, partículas, cristais e etc) [44]. De fato, o tamanho e a forma dessas nanoestruturas podem agregar novas propriedades e aplicações que impulsionam o campo da nanociência e nanotecnologia. Assim, o estudo de materiais nanoestruturados é uma área ativa de pesquisa da química, física, engenharia de materiais e engenharia biomédica [45].

Nesse sentido, várias propriedades foram consideradas dependentes do tamanho de partícula [44]. Materiais formados a partir de partículas nanométricas possuem características incomuns, levando a novos fenômenos que são realmente surpreendentes. Por exemplo, Gerberich e col. apresentaram em seu trabalho que nanopartículas individuais de silício (~40 nm), em temperatura ambiente, possuem dureza quatro vezes maior quando comparadas com agregados formados a partir do mesmo elemento [45]. Já em relação às propriedades de nanofios de ZnO, Chen e col. [46] observaram que a elasticidade destes nanofios aumenta à medida que o diâmetro do fio é reduzido. Outro enfoque, voltado à construção de cerâmicas mais resistentes, pode ter uma

contribuição de forma direta da nanotecnologia. Blocos de cerâmica construídos a partir de grãos nanométricos podem ser moldados em peças de motor ou de outras formas úteis sem quebra durante o processo [44]. Nanofibras formadas a partir de carbono apresentam uma energia resistente à quebra de 570 J/g. O valor apresentado por si só não é tão impactante, mas quando comparado com um material conhecido torna-se notável. Por exemplo, as nanofibras de carbono são 17 vezes mais duras que as fibras de Kevlar utilizadas em coletes à prova de balas [47]. As fibras têm também o dobro da rigidez e 20 vezes a dureza do mesmo peso de um fio de aço. Como músculos artificiais, fibras de nanotubos de carbono são cerca de 100 vezes mais fortes do que o músculo natural com o mesmo diâmetro [48].

Fica claro, a partir dos exemplos apresentados, que a nanotecnologia participa de forma significativa na descoberta de novas propriedades para os materiais. Dentre os materiais apresentados destacam-se as nanoestruturas de carbono como material base para a construção de plataformas.

I.6 Nanotubos de carbono

I.6.1 Carbono

O carbono tem se revelado um material muito prático e amplamente utilizado para a confecção de eletrodos devido às suas ótimas propriedades para aplicações eletroquímicas. Eletrodos de carbono fornecem, de maneira geral, boa condutividade elétrica, elevada estabilidade térmica e química, uma ampla janela de potencial e em muitos casos atividade eletrocatalítica. Além disso, eles são conhecidos como materiais versáteis e de fácil manuseio. Assim, o carbono na forma de carbono vítreo, fibra de carbono, grafite em pó, grafite pirolítico e grafite pirolítico altamente ordenado, tem desempenhado por muito tempo um importante papel no desenvolvimento de eletrodos sólidos [49-50]. No entanto, a descoberta de um novo alótropo do carbono sob formato de nanotubos [51] impulsionou de forma inédita aplicações na eletroquímica e eletroanalítica [52,53].

I.6.2 Síntese, estrutura e propriedades eletrônicas

Os nanotubos de carbono são longos cilindros de átomos de carbono ligados covalentemente. Esses nanomateriais são usualmente sintetizados por 3 diferentes métodos: descarga em arco elétrico, ablação por laser e deposição química de vapor [54]. Descarga em arco elétrico e ablação por laser baseiam-se na condensação de átomos de carbono gerados através da evaporação de amostras de carbono sólido. Esses métodos possuem a desvantagem de operar em elevadas temperaturas, próximo do ponto de fusão do grafite. No entanto, ambos os métodos produzem CNTs de alta qualidade e com poucos defeitos. O terceiro método, baseado na deposição química de vapor, pode ser operado em temperaturas consideravelmente menores, mas com a desvantagem de formar nanotubos com mais defeitos quando comparado com as metodologias anteriores. Neste caso, a formação dos CNTs ocorre como resultado da decomposição térmica de uma amostra de carbono líquida ou gasosa sobre a superfície de um catalisador (nanopartículas de Fe, Co ou Ni) [55]. A Figura I.5 ilustra os dois tipos de nanotubos de carbono mais sintetizados: nanotubos de carbono de paredes simples (do inglês SWCNTs) e nanotubos de carbono de paredes múltiplas (do inglês MWCNTs).



Figura I.5. Nanotubos de carbono de paredes simples (SWCNT) e múltiplas (MWCNT).

Nem sempre as extremidades dos tubos estão abertas assim como ilustrado na Figura I.5. De fato, o fechamento das extremidades nos CNTs pode ser facilmente racionalizada considerando a presença de ligações pendentes com

alta energia nos limites dos tubos. A energia total de um certo número de átomos de carbono na camada de grafite pode ser reduzida através da formação de uma estrutura fechada que elimina ligações pendentes, mesmo à custa do aumento da energia de deformação das ligações [56].

A maneira com que a folha de grafite é embrulhada para formar o tubo pode ser descrita pelo vetor $C_h = na_1 + ma_2$ (n, m) que conecta sítios cristalograficamente equivalentes de uma folha de grafite bidimensional, onde a_1 e a_2 são os vetores base da folha de grafite (Figura 1.6(A)).

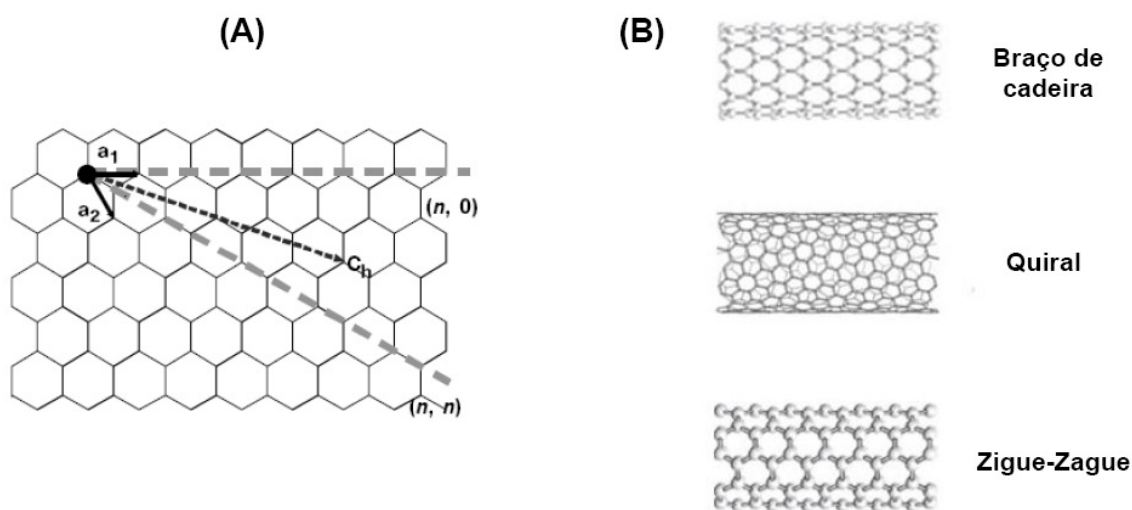


Figura 1.6. (A) Coordenada dos vetores que definem o empacotamento dos nanotubos e (B) tipo de estruturas normalmente encontradas.

A Figura 1.6(B) mostra os três diferentes tipos de estruturas dos nanotubos normalmente encontrados segundo as direções definidas pelo vetor de empacotamento C_h , braço de cadeira ($n = m$), quiral (n, m) e zigue-zague ($m = 0$). As diferentes estruturas são oriundas de uma mesma folha de grafite, no entanto, podem apresentar propriedades eletrônicas com comportamento metálico ou semicondutor [57]. Além do tipo de estrutura, o diâmetro dos nanotubos também afeta as propriedades eletrônicas. O bandgap de nanotubos semicondutores pode ser aproximado pela relação $E_g = 0,8 \text{ eV} / d$, onde d é o diâmetro do tubo [58,59]. Desta forma, quanto maior o diâmetro do CNT, maior a tendência para um comportamento metálico. Além do mais, os CNTs são capazes de conduzir

densidades de corrente muito grandes. Por exemplo, CNTs têm demonstrado suportar densidades de corrente maiores que 10^9 A / cm^2 , um valor que é 2 - 3 ordens de magnitude maior que alguns metais como Al ou Cu [60].

Assim, as propriedades eletrônicas mencionadas podem ser atribuídas principalmente devido ao formato desse material. Apesar dos CNTs estarem muito relacionados com as placas de grafite, a arquitetura do material sob formato de tubo agrega propriedades únicas que fazem com que os CNTs sejam diferentes do grafite. Além das propriedades eletrônicas, as propriedades químicas também são alteradas devido a forma do material [61].

I.6.3 Propriedades químicas

Um bom entendimento das propriedades químicas dos nanotubos de carbono é indispensável para aumentar a eficiência de dispositivos práticos e também para compreender processos fundamentais. A Figura I.7(a – d) mostra as estruturas e hibridizações dos átomos de carbono do diamante, grafite, fulereno e dos nanotubos de carbono. Embora esses materiais sejam feitos a partir do mesmo elemento básico, a reatividade química é substancialmente diferente entre eles. A reatividade química é maior para o CNT do que para uma folha de grafite, mas menor quando comparada com o fulereno [61]. Tal comportamento provavelmente está relacionado com a curvatura da superfície da estrutura de carbono. A reatividade dos fulerenos é devido principalmente à alta tensão nas ligações provocada pela geometria esférica do material. Essa tensão pode ser avaliada através da fórmula $\theta_p = \theta_{\sigma\pi} - 90^\circ$ onde $\theta_{\sigma\pi}$ é o ângulo compreendido entre um orbital σ e um orbital π em um mesmo átomo de carbono e θ_p é o ângulo de piramidalização. Para um átomo de carbono hibridizado sp^2 (trigonal planar), a planaridade é altamente preferida e isto implica em um ângulo de piramidalização de $\theta_p = 0^\circ$, ao passo que um átomo de carbono hibridizado sp^3 (tetraédrico) requer aproximadamente $\theta_p = 19,5^\circ$, assim como ilustrado na Figura I.7(e) e (f). Já os átomos de carbono no fulereno C_{60} apresentam $\theta_p = 11,6^\circ$. A conversão química de qualquer átomo trivalente no C_{60} para um átomo tetravalente alivia a tensão no

ponto em que foi efetuada a conversão [61]. Assim, reações que servem para saturar os átomos de carbono são aceleradas devido ao alívio da tensão e, com isso, modificações no fulereno são altamente favorecidas [62].

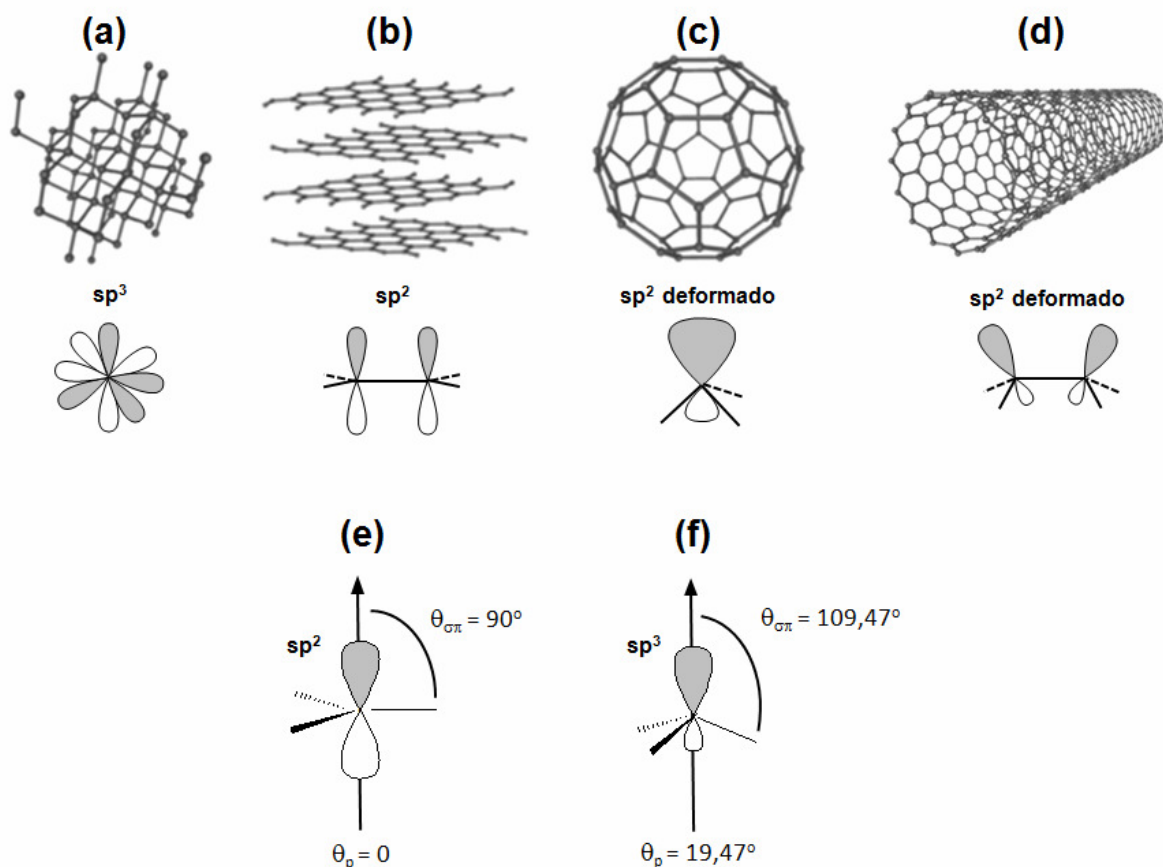


Figura I.7. Estrutura e hibridização dos átomos de carbono para (a) diamante, (b) grafite, (c) fulereno e (d) nanotubo de carbono. Esquema mostrando os ângulos entre as ligações σ e π do átomo de carbono de geometria (e) trigonal planar e (f) tetraédrica.

No caso dos CNTs, a curvatura dos tubos é muito menor do que para os fulerenos e, desta forma, o alívio da tensão nas paredes laterais não oferece a mesma força motriz para a reatividade química que é vivida pelos fulerenos. No caso do SWCNT, o ângulo de piramidalização é de $\theta_p = 3,01^\circ$, menor do que o ângulo obtido para o fulereno C_{60} . Consequentemente, a tensão local por átomo

de carbono devido à curvatura é menor para o SWCNT (0,5 kcal / mol) do que para o fulereno (8,1 kcal / mol) [63]. Ao contrário das paredes laterais, a reatividade no final dos tubos é muito maior, principalmente quando essas extremidades estiverem fechadas. Devido à presença de anéis de 5 ou 7 átomos de carbono [64], as extremidades fechadas apresentam uma reatividade similar ao do fulereno, assim como demonstrado anteriormente. Por exemplo, quando os nanotubos de carbono são submetidos a um tratamento com ácidos e oxidantes fortes são gerados principalmente grupos funcionais ácidos carboxílicos e cetonas nas extremidades [64]. Uma vez formados, esses grupos podem permitir a imobilização de biomoléculas e também influenciar nas propriedades eletroquímicas.

I.6.4 Propriedades eletroquímicas

De maneira geral, a performance eletroquímica de materiais de carbono é basicamente determinada pelas propriedades eletrônicas, pela sua estrutura e química superficial (grupos funcionais terminais ou processos de adsorção). Tais características poderão afetar a cinética do eletrodo, janela eletroquímica de potencial, corrente capacitiva e a interação com moléculas em solução [56].

Algumas das propriedades eletroquímicas dos nanotubos de carbono têm sido relacionadas com as propriedades do grafite pirolítico altamente ordenado (do inglês HOPG). Já é sabido que a condutividade eletrônica no plano paralelo das camadas de grafite (plano basal) é cerca de 4 ordens de magnitude maior do que no plano perpendicular (plano edge) [49]. O plano basal do HOPG, ilustrado na Figura I.8, é ordenado e quimicamente mais inerte do que o plano edge. Tal anisotropia também influencia o comportamento eletroquímico do material. Já foi demonstrado que o plano basal exibe uma cinética de transferência eletrônica lenta enquanto que os sítios localizados no plano edge favorecem o processo redox [65].

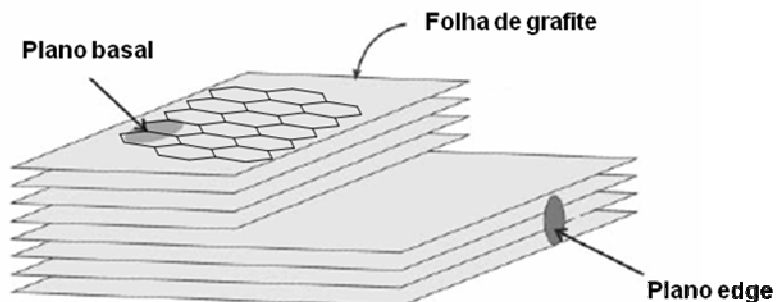


Figura 1.8. Representação esquemática das folhas do HOPG incluindo as indicações dos planos basal e edge.

As extremidades abertas dos CNTs têm sido relacionadas com o plano edge do HOPG, ao passo que as paredes do tubo devem apresentar propriedades eletroquímicas similares ao do plano basal do mesmo material [65-67]. Grupos funcionais presentes nas extremidades dos tubos podem desempenhar um papel importante nas propriedades eletrocatalíticas, aumentando a cinética de transferência de elétrons ou contribuindo em processos de adsorção.

A adsorção é outro fator relevante que afeta a performance eletroquímica dos CNTs. O processo de adsorção pode aumentar ou diminuir fortemente a cinética de transferência de elétrons e a atividade eletrocatalítica. Um dos aspectos negativos pode ser observado quando a adsorção de espécies (impurezas ou produtos de reações redox) diminui drasticamente a performance eletroquímica dos eletrodos. Já um dos aspectos positivos se refere à adsorção de metaloproteínas. Os CNTs facilitam a troca de elétrons entre o centro redox da proteína e a superfície do eletrodo, permitindo assim que a atividade eletrocatalítica seja monitorada [50].

Outra propriedade dos CNTs é que eles apresentam uma elevada área superficial que traz benefícios não só para aumentar as correntes eletroquímicas das espécies eletroativas, mas também permitir que enzimas, antígenos, anticorpos e mediadores redox sejam imobilizados em sua estrutura. Nesse sentido, inúmeras estratégias têm sido adotadas para permitir que tais processos ocorram [68].

I.6.5 Funcionalização dos nanotubos

A modificação dos CNTs surge como motivação de extremo interesse porque abre uma gama de possibilidades para desenvolver novos dispositivos que unem as propriedades dos CNTs juntamente com as versatilidades geradas pelo processo de funcionalização. Além disso, a modificação química também ajuda contornar um dos problemas encontrados na manipulação de CNTs que é a dificuldade de dispersar os nanotubos, principalmente em meio aquoso. No sentido de facilitar a dispersão em água e principalmente possibilitar a união de novas propriedades destacam-se as modificações covalentes e não-covalentes nos CNTs [68].

I.6.5.1 Modificação covalente

Assim como mencionado no tópico 1.6.3, as extremidades dos CNTs são quimicamente mais reativas do que as paredes laterais. Quando as extremidades dos tubos estão abertas, as ligações pendentes tornam-se muito reativas na presença de água ou oxigênio e normalmente esta região é rica em grupos funcionais derivados do átomo de oxigênio (quinonas, cetonas e ácidos carboxílicos). Adicionalmente, as extremidades fechadas e defeitos na estrutura dos CNTs podem ser funcionalizadas tratando os CNTs com ácidos e oxidantes fortes (HNO_3 , H_2SO_4 e H_2O_2) [69]. Após o tratamento, dentre os grupos funcionais obtidos, um de interesse especial é o grupo R-COOH . Os resíduos de R-COOH nas extremidades tornam-se sítios úteis para a intercalação de outras moléculas através da formação de ligações amida ou éster [69,70].

O esquema ilustrado na Figura I.9 mostra as reações de modificação covalente empregadas para modificar as extremidades e as paredes laterais dos nanotubos de carbono. Na Figura I.9(A) podem ser observadas as estratégias frequentemente utilizadas para a modificação das extremidades/defeitos dos CNTs explorando a versatilidade dos grupos R-COOH . A formação de uma ligação amida pode ser conduzida na presença de uma amina após ativação dos grupos

R-COOH com 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodimida (EDC) e N-hidroxi succinimida (NHS) ou com cloreto de tionila (SOCl_2). A ativação do grupo R-COOH com SOCl_2 permite ainda que moléculas contendo o grupo funcional álcool (R-OH) sejam também conectadas nos CNTs [68].

Modificação Covalente

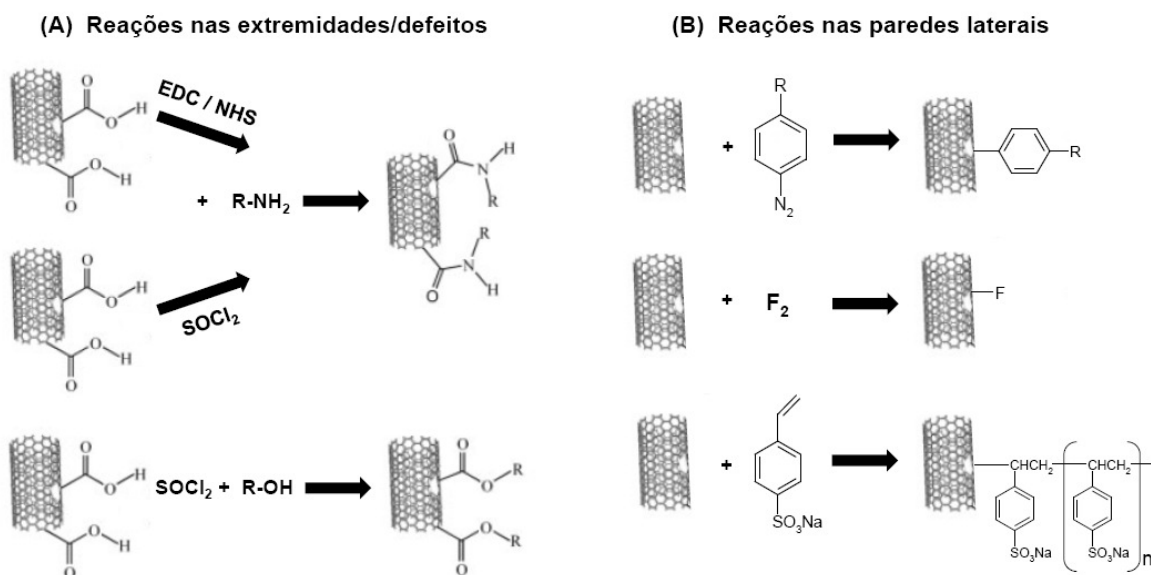


Figura I.9. Esquema ilustrando os tipos mais comuns de reações covalentes nas extremidades/defeitos e nas paredes laterais dos CNTs.

Por outro lado, a reatividade das paredes laterais dos CNTs aumenta com a curvatura do tubo devido principalmente ao aumento do ângulo de piramidalização [61]. A reatividade da superfície é, portanto, reforçada pela exposição acentuada dos orbitais híbridos que ficam na parte externa do tubo, favorecendo a sobreposição de orbitais com reagentes que se aproximam da superfície [71].

Desta forma, a Figura I.9(B) ilustra alguns exemplos de reações que podem ser utilizadas empregando as paredes laterais dos nanotubos de carbono. Moléculas derivadas do aminobenzênio podem ser convertidas em sais de diazônio e posteriormente ancoradas nos CNTs [72]. Já quando aquecidos na

presença de F_2 , são formadas ligações C – F nas paredes laterais dos CNTs. Esse tipo de intermediário é altamente interessante à síntese orgânica, possibilitando reações com reagentes de Grignard e também com íons alcóxido [73]. A ligação covalente dos CNTs com polímeros ganha destaque, principalmente, por causa da longa cadeia polimérica que ajuda a dispersar os nanotubos em uma gama de solventes orgânicos ou aquosos. Uma das rotas utiliza os monômeros juntamente com os CNTs na síntese, com isso, o polímero é conectado covalentemente e polimerizado sobre o nanomaterial. Dessa forma, já foram reportados trabalhos com polivinilpiridina, poliestirenosulfonato (Figura I.9(B)), poli(metilmetacrilato) e polianilina [74].

As modificações covalentes apresentadas resultam em conexões nanotubo-molécula alvo efetivas e muito estáveis. No entanto, alguns pontos negativos aparecem à tona nesse tipo de modificação. A grande densidade de sítios reativos ou pontos funcionalizados covalentemente podem trazer uma perda da rede de conjugação e uma degradação das propriedades mecânicas e eletrônicas dos CNTs [57]. Assim, as modificações não-covalentes ganham destaque na funcionalização de CNTs.

I.6.5.2 Modificação não-covalente

A grande área superficial constituída por um sistema de elétrons deslocalizados e com caráter hidrofóbico tornam os CNTs superfícies ideais para interações não-covalentes com moléculas via interações de Van de Waals, π - π ou hidrofóbicas [74].

Existem muitos exemplos na literatura de modificações não-covalentes nos CNTs com agentes capazes de promover o desprendimento dos CNTs e fazê-los mais solúveis e biocompatíveis. Exemplos de tais agentes são alguns surfactantes como dodecilsulfato de sódio [75] ou dodecilbenzeno sulfonato de sódio [76]. Outros exemplos estão ilustrados na Figura I.10 e incluem modificações com proteínas (Figura I.10(A)), polímeros (polivinilpirrolidona [77], poliestirenosulfonato de sódio [78], DNA [79], polissacarídeos [80] e etc.) e

compostos poliaromáticos como os pirenos modificados com grupos funcionais (Figura I.10(B)) que envolvem os CNTs servindo como uma espécie de casaco, de forma que as porções hidrofóbicas interagem com a parede do tubo enquanto que as porções hidrofílicas interagem com o meio aquoso [56].

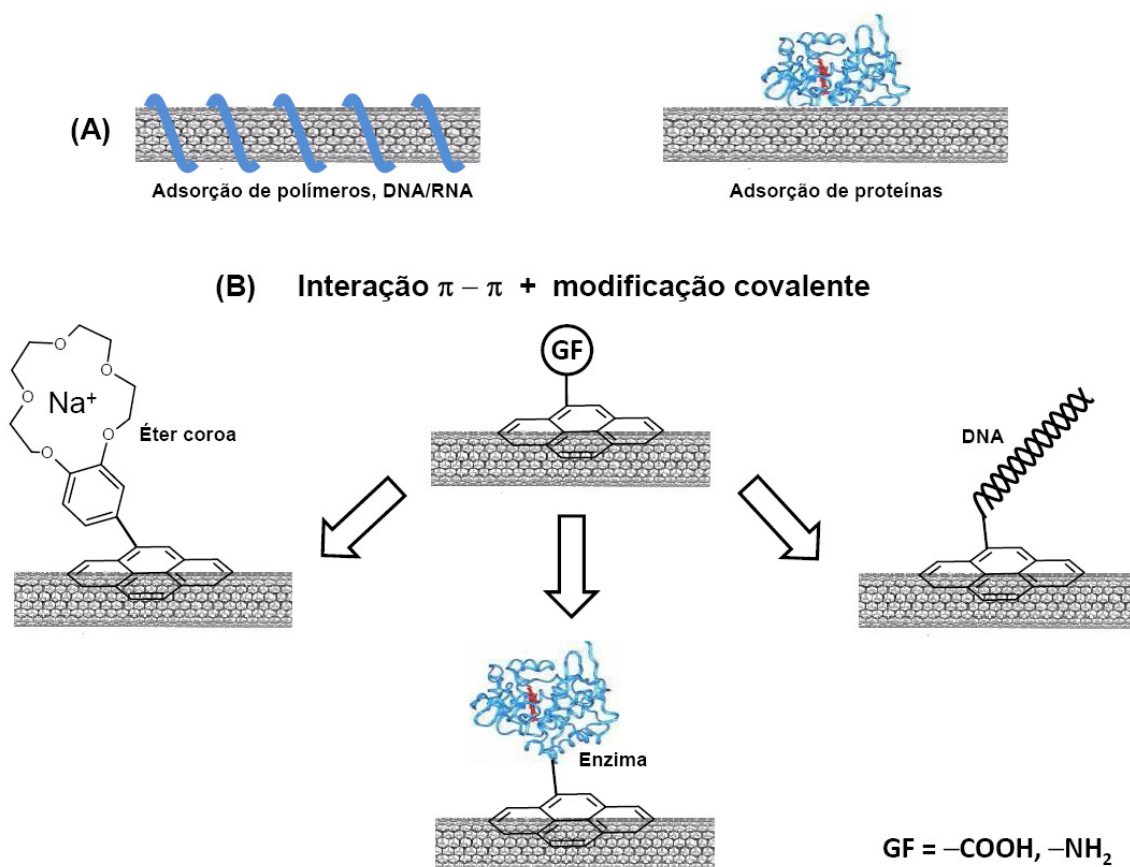


Figura I.10. Representação esquemática das modificações não-covalentes nos CNTs. (A) Adsorção de polímeros, DNA ou proteínas e (B) exemplos de algumas modificações covalentes após imobilização de pirenos contendo grupos funcionais (GF).

Em alguns casos, polímeros como o PEG e Triton-100 não são utilizados para criar pontos que possibilitam a imobilização de moléculas, pelo contrário, são utilizados para evitar ligações não-específicas de proteínas quando se visa o desenvolvimento de biossensores [81].

Em decorrência do processo de funcionalização, tanto covalente quanto não-covalente, existe ainda a possibilidade da combinação com outros

nanomaterias a fim de tentar trazer novas propriedades e/ou fornecer um ambiente favorável que possibilite a imobilização de outros tipos de mediadores redox ou biomoléculas.

I.7 Nanopartículas de ouro

Nanopartículas de ouro (NPAus) possuem propriedades ópticas e eletrônicas que estão relacionadas com seu tamanho e formato e são, portanto, de grande interesse em muitas aplicações nanotecnológicas [82]. Apesar do crescimento recente buscando novas aplicações das NPAus, esse nanomaterial já se encontra disponível por mais de 50 anos. A síntese de NPAus estabilizadas por íons citrato foi reportada em 1950 por Turkevich e col. [83] e em 1973 por Frens [84]. Os agentes estabilizantes, além de permitir o uso das NPAus por semanas [85], servem como ponto de partida quando se deseja imobilizar esse nanomaterial em uma determinada superfície.

A Figura I.11 mostra um desenho esquemático dos tipos de rotas mais utilizadas visando ampliar as aplicações das NPAus. Uma das maneiras mais simples de se modificar uma superfície utiliza as propriedades eletrostáticas como força motriz para que o processo ocorra. A Figura I.11(A) ilustra um exemplo de uma nanopartícula carregada negativamente atraída para uma superfície com carga oposta. Este tipo de procedimento permite que inúmeros materiais possam ser modificados com as NPAus, no entanto, algumas superfícies precisam de um pré-tratamento. O pré-tretamento pode incluir desde a aplicação de um elevado sobrepotencial positivo quando o material em questão é o eletrodo de carbono vítreo [86] ou ainda, em outros casos, utilizar a química de superfície para criar grupos funcionais que possam ser protonados [87].

Uma segunda abordagem, e talvez a mais elegante, utiliza o modelo de Pearson [88] como inspiração para a funcionalização de nanopartículas de ouro. A tabela construída por Pearson prevê que o grupo tiol (R-SH) deve interagir fortemente com ouro metálico e, desta forma, as NPAus podem ser

funcionalizadas e estabilizadas com inúmeras moléculas derivadas do átomo de enxofre.

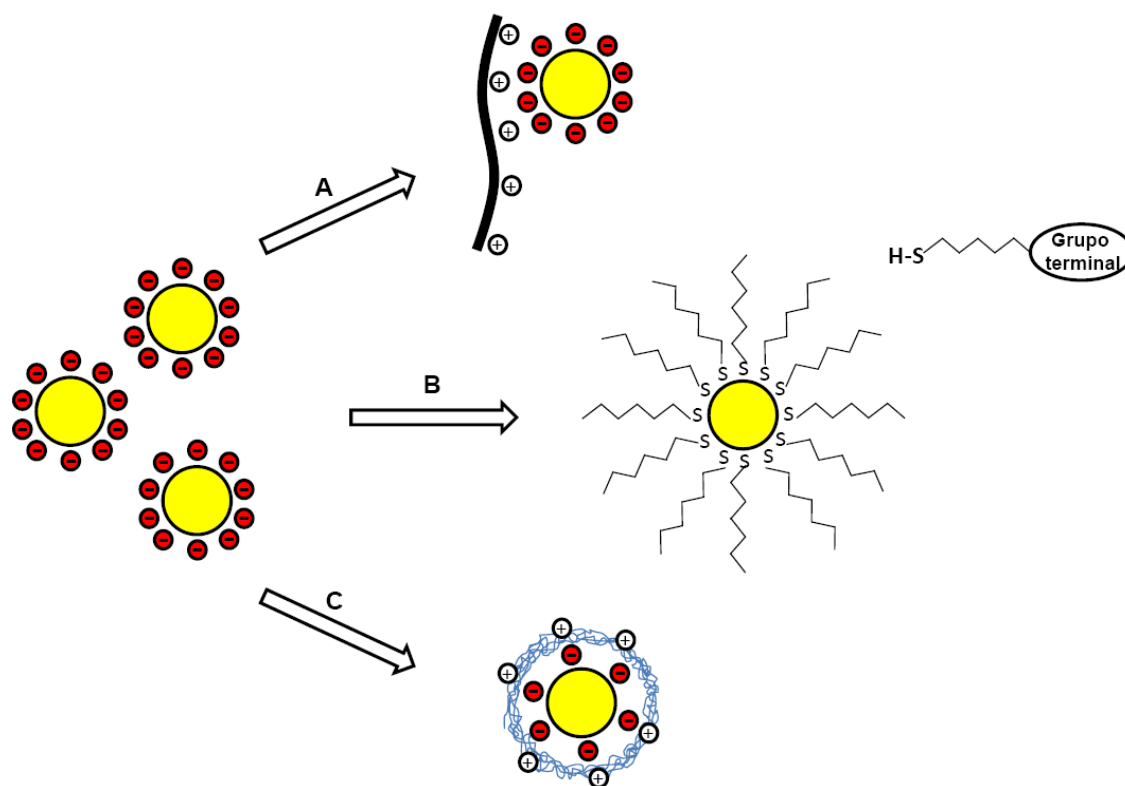


Figura I.11. Desenho esquemático das rotas mais utilizadas para a imobilização de NPAus por: (A) atração eletrostática, (B) adsorção de tióis e (C) adsorção de policátions.

A Figura I.11(B) ilustra de forma simplificada a substituição de íons citrato por alcanotióis, exemplo na qual foi desenvolvido primeiramente em 1993 por Giersig e Mulvaney [89]. Atualmente, a formação de monocamadas auto-organizadas (do inglês SAMs) utilizando tióis ou dissulfetos permite a criação dos mais variados tipos de funcionalidades alterando somente o grupo terminal da molécula [90,91].

Assim como na utilização de tióis, outro exemplo que permite a funcionalização e estabilização de nanopartículas de ouro se refere ao emprego de polímeros. Existem basicamente duas maneiras de se obter nanopartículas modificadas com polímeros. A primeira consiste na síntese das NPAus na

presença da rede polimérica [92] e a segunda, menos empregada, envolve a polimerização ao redor das nanopartículas [93].

I.8 Motivação

O presente trabalho teve como principal motivação unir as propriedades de mediadores redox derivados do grupo nitro juntamente com plataformas nanoestruturadas formadas à base de nanotubos de carbono. Nesse sentido busca-se o desenvolvimento de sensores amperométricos com elevada sensibilidade e atividade eletrocatalítica, e principalmente, aplicando sobrepotenciais baixos. Para possibilitar a união de propriedades, moléculas foram selecionadas cuidadosamente para apresentar três características marcantes:

- (I) presença de um grupo funcional que possibilite a imobilização na interface da plataforma;
- (II) grupo funcional retirador de elétrons ligado diretamente no anel aromático do mediador;
- (III) grupo nitro, que serve como precursor para a formação *in situ* do par nitroso-hidroxilamina.

I.9 Objetivos

I.9.1 Geral

Este trabalho de pesquisa visa o desenvolvimento de sensores amperométricos empregando mediadores redox derivados do grupo nitro imobilizados sobre plataformas nanoestruturadas.

I.9.2 Específicos

- * Construir dois sensores amperométricos, um destinado para a detecção de NADH e outro para a Cys.
- * Caracterizar as plataformas utilizando o MEV e ensaios eletroquímicos.
- * Obter as constantes cinéticas das reações interfaciais.
- * Fazer a caracterização analítica dos sensores.
- * Aplicar os sensores desenvolvidos.

CAPÍTULO II



PARTE EXPERIMENTAL

II.1 Parte experimental

II.1.2 Reagentes e soluções

A L-cisteína, NADH, MWCNTs (diâmetro interno 2-10 nm e comprimento 0,1 – 20 μm), ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), ácido cítrico, PIPES [piperazina-N-N-bis [(ácido 2-etanosulfônico)], HEPES [N-(2-hidroxietil)piperazina-N-(ácido 2-etanosulfônico)], TRIS [tris(hidroximetil) amino-metano], nanopartículas de ouro (10 nm, concentração ~0,05% em citrato como estabilizante), polietilenoimina (PEI), ácido 3,5-dinitrobenzoico (3,5-DNB), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodimida (EDC), catecol, dopamina, L-Dopa, epinefrina, ácido clorogênico, ácido cafêico, N-hidroxi succinimida (NHS), ferrocianeto e ferricianeto de potássio foram obtidos da Sigma, St. Louis, USA. N,N dimetil formamida (DMF), dihidrogenofosfato de sódio (NaH_2PO_4), hidrogeno fosfato de sódio (Na_2HPO_4), cloreto de potássio (KCl) e etanol foram obtidos da Synth, São Paulo, Brasil.

As soluções foram preparadas usando água purificada em um sistema Milli-Q Millipore e os valores de pH das soluções tampão foram ajustados com um pHmetro Corning, modelo 350.

II.1.3 Equipamentos

A detecção voltamétrica e cronoamperométrica foi obtida empregando um potenciostato modelo PGSTAT-30 da Autolab Eco Chemie (Utrecht, Holanda) conectado à um computador utilizando um programa computacional GPES 4.9. Uma célula eletroquímica com capacidade para três eletrodos foi utilizada com um eletrodo de calomelano saturado como referência, um fio de platina como eletrodo auxiliar e o eletrodo de trabalho de carbono vítreo (Figura II.1). Para homogeneizar a solução do eletrólito de suporte após a adição do analitos (Cys ou NADH) foi utilizado um agitador magnético da marca Corning com 6 modos de velocidades. A célula eletroquímica possui também um local para entrada de N_2 , que serve para

remover o oxigênio dissolvido.

Os experimentos utilizando o eletrodo de disco rotatório foram conduzidos por um equipamento de controle de rotação da Autolab com amperagem máxima de ± 500 mA acoplado ao ECV.

Para o preparo das dispersões e limpeza do ECV foi utilizado um banho de ultra-som da marca UNIQUE modelo USC-1400.

Uma balança analítica Sartorius BP 211D, de 5 casas decimais, foi utilizada para pesar os reagentes.

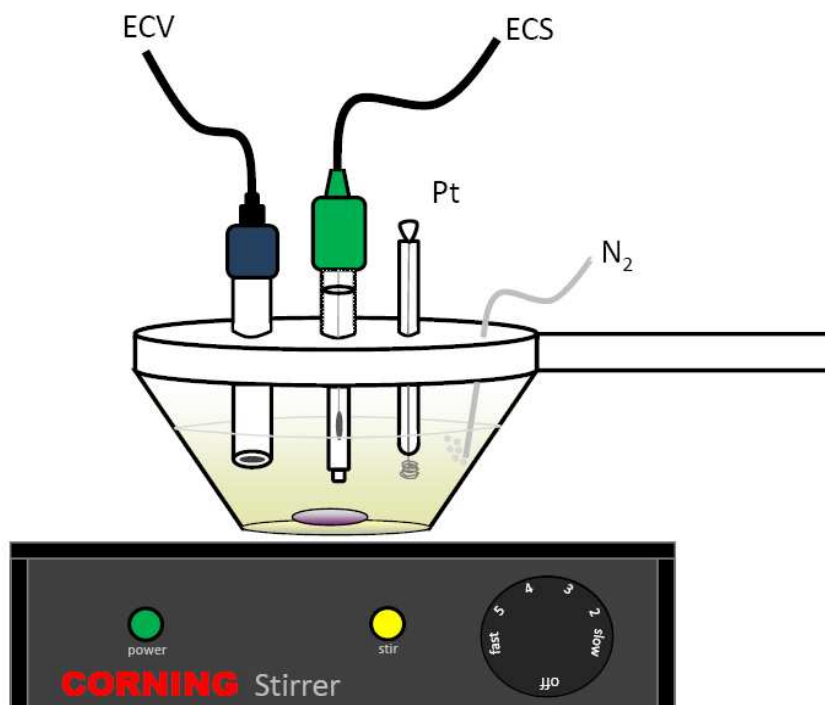


Figura II.1. Esquema ilustrando a célula eletroquímica com capacidade para três eletrodos (ECV = eletrodo de carbono vítreo (forma de disco), ECS = eletrodo de calomelano saturado e Pt = eletrodo auxiliar) e um local para a entrada de N₂.

II.1.4 Limpeza do eletrodo de trabalho

O procedimento geral do pré-tratamento do eletrodo de carbono vítreo (ECV) é descrito a seguir. Antes das modificações, o eletrodo de trabalho foi polido com uma pasta de alumina de 1,0, 0,5 e 0,3 μm para obter uma superfície

espelhada e então o eletrodo foi lavado com água destilada. O ECV foi levado ao ultra-som em uma solução 1:1 (v/v) etanol/água por 5 minutos para remover possíveis partículas de alumina adsorvidas na superfície do eletrodo.

II.1.5 Sensor para Cys (Sen-Cys)

Inicialmente, 1,0 mg de MWCNTs foram dispersos em 5 mL de DMF utilizando um banho de ultra-som. As soluções de PEI (0,1 – 4%) foram preparadas dissolvendo o polímero em água deionizada. A solução contendo as nanopartículas de ouro foram utilizadas assim como foram recebidas, sem nenhuma diluição.

No ECV limpo de 0,2 cm² foram adicionadas alíquotas da dispersão dos MWCNTs (5 – 30 µL) e em seguida a superfície foi seca sob atmosfera de nitrogênio. Após uma lavagem com água, o eletrodo foi imerso em uma solução de PEI (0,1 – 4%) por 1 h e então lavado com água novamente. Então, o eletrodo foi imerso na solução de nanopartículas de ouro por mais 1 h a 4°C e em seguida a superfície foi lavada novamente com água. Finalmente, a plataforma nanoestruturada foi imersa em uma solução etanólica (5 – 50 mmol L⁻¹) do ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) por 15 h e após este período a superfície foi lavada com etanol e depois água.

As espécies hidroxilamina foram eletrogeradas *in situ* a partir do DTNB após ciclar o potencial entre 0,1 e -0,7 V *versus* ECS. Dois ciclos em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 com velocidade de varredura de 0,1 V s⁻¹ foram suficientes para gerar o grupo hidroxilamina.

A área eletroativa do eletrodo modificado foi obtida utilizando 1 mmol L⁻¹ Fe[(CN)₆]^{3-/4-} em 0,1 mol L⁻¹ KCl empregando a equação de Randles Sevcik [19]. Assim, a área eletroativa foi de aproximadamente 0,640 cm².

II.1.5.1 Planejamento fatorial

Para otimizar a composição da interface do Sen-CyS um planejamento fatorial completo em duplicata e a matriz de Doehlert foram utilizados. A influência da quantidade dos MWCNTs (5 – 30 μL), PEI (0,1 – 4,0 %) e DTNB (5 – 50 mmol L^{-1}) foram examinadas utilizando um planejamento 2^3 completo. A matriz de Doehlert foi empregada para otimizar os efeitos mais importantes. Os experimentos foram feitos em duplicata, com exceção para o ponto central onde foram realizadas 3 replicatas. A partir destes resultados foi obtida a superfície de resposta gerada pelo programa computacional STATISTICA. Todos os experimentos foram realizados em ordem aleatória monitorando a corrente de pico anódica dos voltamogramas cíclicos em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 e $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

II.1.6 Sensor para NADH (Sen-NADH)

A dispersão dos MWCNTs com o PEI foi obtida da seguinte forma: 1,0 mg de MWCNT foi misturado com 1,0 mL de uma solução de PEI 1,0 mg mL^{-1} e em seguida a mistura foi colocada no ultra-som por 15 min assim como reportado por Rubíanes e Rivas [94].

No ECV limpo com área geométrica de 0,07 cm^2 foi adicionado 5 μL da dispersão MWCNT/PEI e então a superfície foi seca sob atmosfera de nitrogênio. Após a montagem da plataforma, o eletrodo foi imerso em 5 mL de etanol contendo 4,6 mg de NHS, 4,8 mg de EDC e 10,0 mg do mediador redox (ácido 3,5-DNB) por 1,5 h. O tempo reacional de imobilização do mediador redox foi determinado fazendo medidas da corrente de pico anódica (I_{pa}) do par redox R-NO/R-NHOH a cada 30 minutos em um período total de 3,0 h.

As espécies hidroxilamina foram eletrogeradas *in situ* a partir do ácido 3,5-DNB após ciclar o potencial entre 0,15 e -0,55 V *versus* ECS. Dois ciclos em solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 com velocidade de varredura de 0,05 V s^{-1} foram suficientes para gerar o grupo hidroxilamina.

A área eletroativa do eletrodo modificado foi estimada assim como reportado anteriormente [95] utilizando $1 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Fe}[(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl empregando a teoria de Randles Sevcik [19]. Assim, a área eletroativa foi de aproximadamente $0,250 \text{ cm}^2$.

II.1.7 Micrografias

As micrografias foram obtidas utilizando um microscópio eletrônico de varredura (MEV) JEOL JSM-5610LV. As amostras foram preparadas sobre suportes (porta amostras) utilizando as mesmas condições empregadas nos itens II.1.5 e II.1.6. As micrografias foram obtidas empregando as condições otimizadas na construção dos sensores.

II.1.8 Preparo das amostras

Para a análise cronoamperométrica, as amostras de suplemento alimentar foram preparadas dissolvendo 3 cápsulas de 500 mg em 1000 mL de água deionizada e então a solução foi filtrada com o auxílio de um papel de filtro quantitativo. Após esta etapa, uma alíquota de 1 mL da solução filtrada foi diluída para 10 mL. Finalmente, 500 μL desta solução foram adicionados em uma cela eletroquímica contendo 5 mL de uma solução tampão fosfato (PBS) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0.

Para as medidas espectrofotométricas, 500 μL da solução da amostra foram misturadas com 2 mL de DTNB. Outras etapas, foram realizadas de acordo com o procedimento já reportado [96], que é baseada na reação da Cys com o DTNB, sendo o produto desta reação monitorado espectrofotometricamente em 412 nm.

II.1.9 Estudo de repetibilidade, estabilidade e tempo de vida do sensor

A estabilidade dos sensores foi avaliada fazendo 15 medidas sucessivas, sem renovar a superfície, e as respostas ao final dos experimentos foram então comparadas. O tempo de vida dos sensores foi avaliado fazendo medidas a cada 1-2 dias, totalizando 100 determinações.

Para avaliar a repetibilidade das medidas, foram realizadas 8 determinações sucessivas dos analitos selecionados. A interface foi construída 8 vezes seguindo o mesmo procedimento descrito na parte experimental e, através de medidas cronoamperométricas, foi obtido o desvio padrão de construção do sensor.

CAPÍTULO III



SENSOR PARA CISTEÍNA

III.1 Apresentação do capítulo

Neste capítulo serão apresentados os resultados referentes à construção, caracterização, estudo das propriedades eletrocatalíticas e aplicação do sensor destinado a detecção de cisteína em amostras de interesse farmacológico. Inicialmente, a otimização do processo de construção da plataforma será abordada visando obter a maior resposta na construção do sensor. Em seguida, serão discutidos ensaios de caracterização por microscopia eletrônica de varredura e também caracterizações eletroquímicas do par redox nitroso/hidroxilamina formado a partir do mediador redox DTNB (Figura III.1). A fim de ressaltar a atividade eletrocatalítica do mediador redox utilizado aqui serão apresentados voltamogramas cíclicos que mostram o efeito de cada etapa da construção do sensor na eletrooxidação de cisteína. Serão apresentados também resultados obtidos por cronoamperometria que, além de fornecerem indícios de uma reação química acoplada, permitem a obtenção da constante cinética (k_{obs}) da reação química entre o mediador e o analito. Por fim, serão discutidos os resultados referentes à aplicação do sensor em amostras reais.

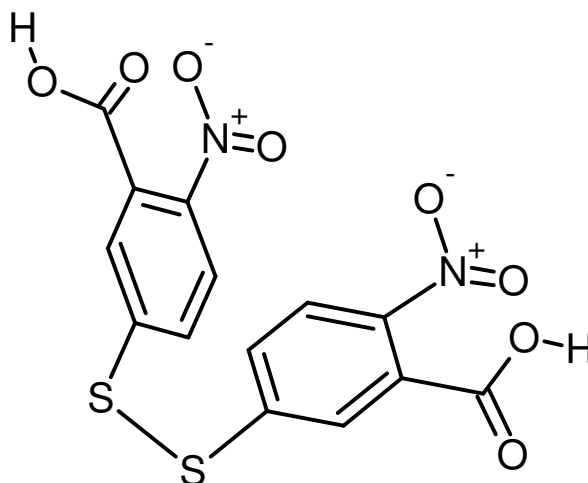


Figura III.1. Fórmula estrutural do ácido 5,5-ditio-2-nitrobenzoico (DTNB).

III.2 Resultados e discussão

III.2.1 Planejamento fatorial

A fim de otimizar a preparação da plataforma do Sen-Cys, fatores considerados importantes do sistema foram analisados por meio de planejamento fatorial completo 2^3 , o que significa 8 experimentos em duplicata. Estes fatores foram: concentração dos MWCNTs (5 – 30 μL), PEI (0,1 – 4,0%) e do DTNB (5 – 50 mmol L^{-1}). Os valores entre parênteses representam os níveis mínimo e máximo para cada variável estudada. A significância dos fatores bem como as interações entre os mesmos foi avaliada e representada pelo diagrama de Pareto (Figura III.2(A)) com intervalo de confiança igual a 95%.

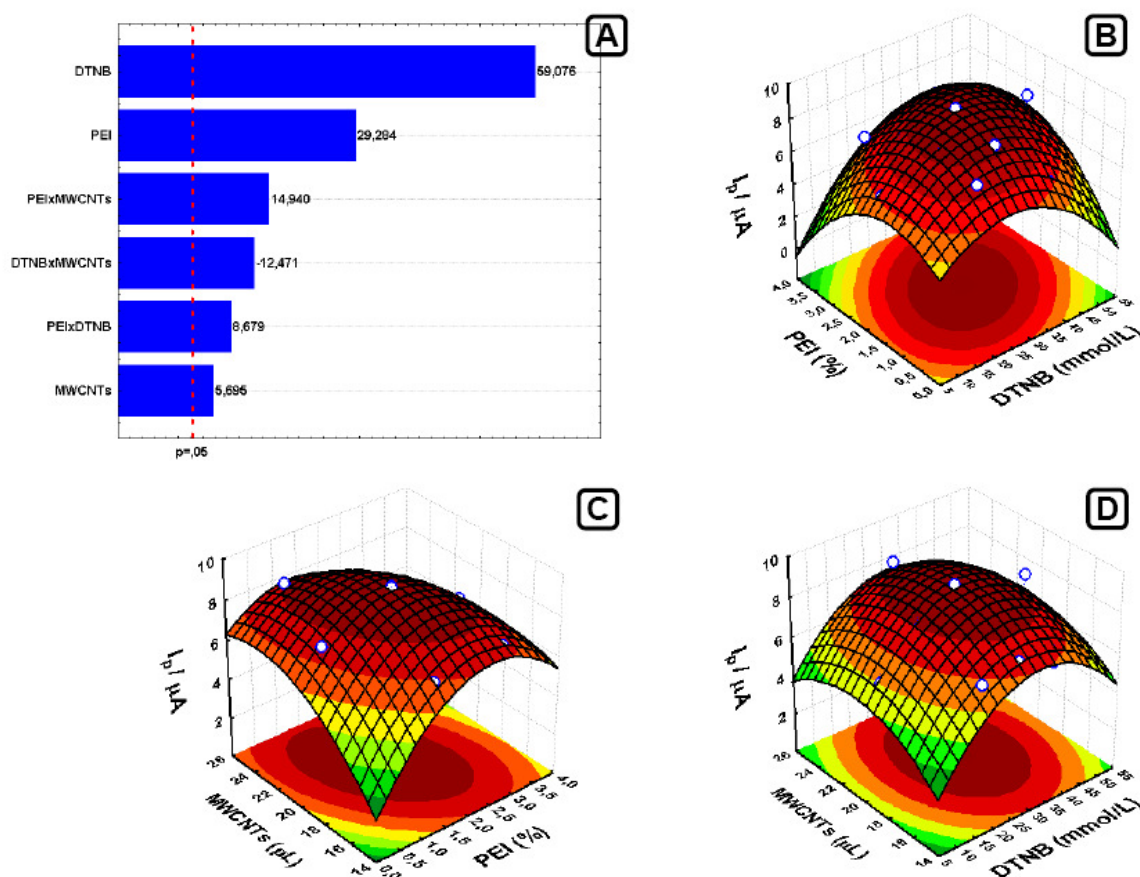


Figura III.2. Diagrama de Pareto (A) e superfícies de resposta para PEI – DTNB (B), MWCNTs – PEI (C) e MWCNTs – DTNB (D).

É possível observar na Figura III.2(A) que os efeitos principais da concentração do DTNB e PEI assim como o efeito de interação MWCNTs-PEI foram os efeitos mais significativos e que os mesmos deveriam ser estudados em maiores níveis, já que os valores dos efeitos foram positivos. Sendo assim, uma matriz de Doehlert para 3 variáveis experimentais já bem estabelecida [97] foi empregada e gerou as superfícies de resposta mostradas na Figura. III.2(B - D).

Analisando as superfícies de resposta ilustradas na Figura III.2(B - D), as condições ótimas dentro do domínio experimental que geraram a maior corrente de pico foram determinadas. Estas condições são: 20 μL de MWCNTs, 2,2 % de PEI e 30 mmol L^{-1} da solução do mediador redox DTNB.

III.2.2 Caracterização da plataforma por MEV

As micrografias do MEV da superfície modificada nas condições otimizadas com MWCNTs (A), MWCNTs+PEI (B), MWCNTs+PEI+NPAu (C) e MWCNTs+PEI+NPAu+DTNB (D) podem ser observados na Figura III.3.

A micrografia da Figura III.3(A) mostra um comportamento típico de distribuição de MWCNTs sem qualquer tipo de modificação. No entanto, após a adição do polímero, pode ser observado claramente na Figura III.3(B) que os nanotubos foram funcionalizados pelo polímero em torno de sua extensão. Em algumas regiões pode se observar também um excesso de polímero mesmo após várias etapas de lavagem. Na micrografia da Figura III.3(C) não se observa uma mudança significativa na morfologia do material após a modificação com as NPAu. No entanto, a caracterização de uma superfície de ouro pode ser obtida através da obtenção de uma resposta eletroquímica em meio ácido. Assim, após a modificação com as NPAu, foi registrado um voltamograma cíclico em uma solução 0,5 mol L^{-1} de ácido sulfúrico na faixa de potencial de 0,1 até 1,4 V. Como pode ser visto no gráfico inserido na Figura III.3(C), o pico que aparece em torno de 0,9 V na varredura reversa é característico de uma redução do óxido de ouro [98]. Assim, a plataforma nanoestruturada possui um perfil eletroquímico característico que permite a formação de uma SAM com o DTNB.

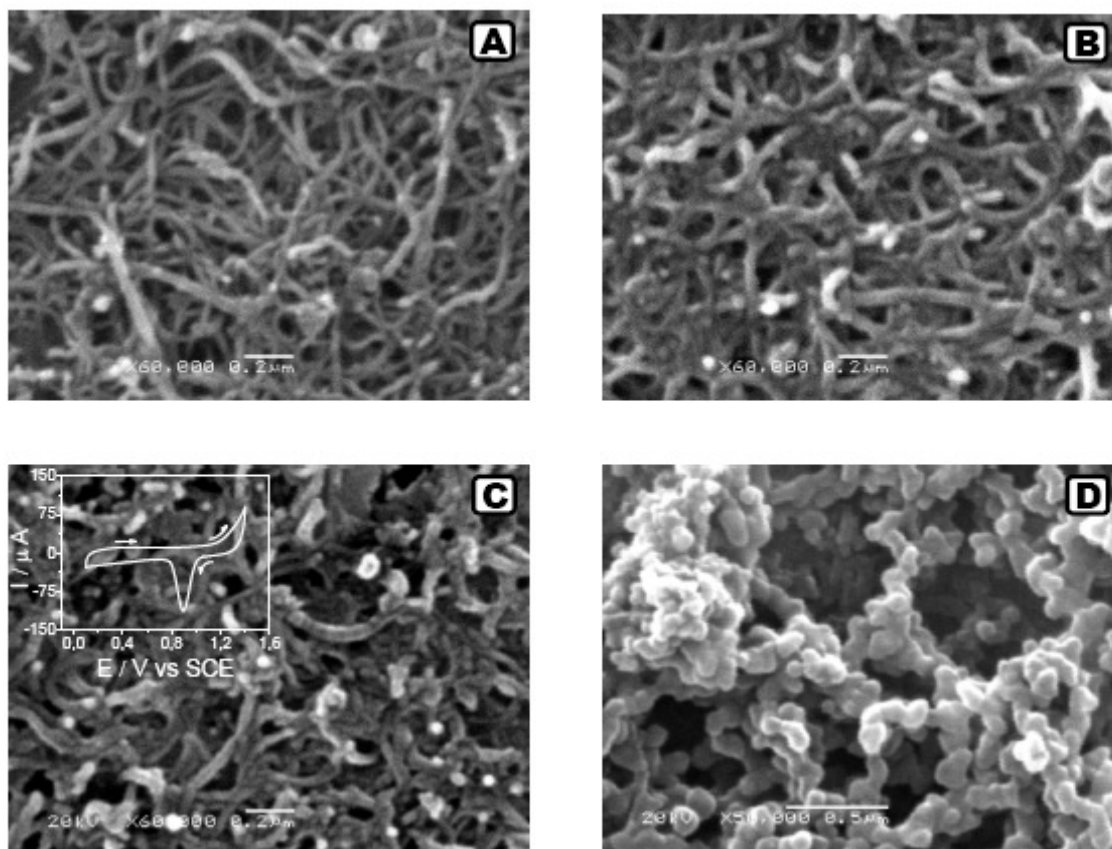


Figura III.3. Micrografias da superfície nas etapas de construção do sensor: (A) MWCNTs, (B) A+PEI, (C) B+NPAu e (D) C+DTNB. Gráfico inserido: voltamograma cíclico em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Na micrografia da Figura III.3(D) pode ser observado que após a formação SAM houve uma alteração na morfologia do material, indicando que o mediador redox foi imobilizado na superfície da plataforma. Pode-se observar no canto superior esquerdo da mesma Figura um excesso de mediador mesmo após a lavagem da superfície com etanol e água.

III.2.3 Ativação e caracterização do par redox

Após a formação da SAM, o par redox R-NO/R-NHOH foi eletrogerado *in situ* a partir do DTNB ancorado na superfície da plataforma nanoestruturada através de uma ciclagem do potencial entre 0,1 e -0,7 V em uma solução tampão

fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0. A Figura III.4 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos no processo de ativação nas condições otimizadas. Como pode ser observado na Figura III.4, no primeiro ciclo o grupo nitro é reduzido irreversivelmente para R-NHOH e oxidado para R-NO na varredura reversa. No segundo ciclo é possível observar um pico de redução em torno de $-0,07 \text{ V}$ versus ECS referente a redução de R-NO para R-NHOH.

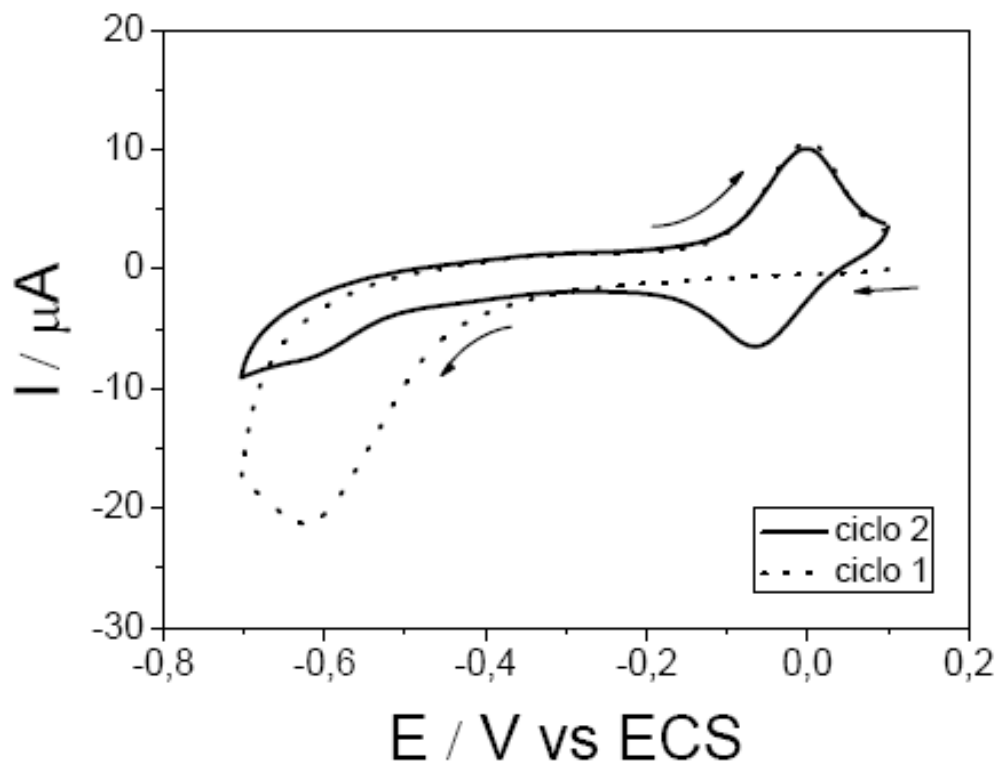


Figura III.4. Processo de ativação do mediador redox obtido em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 e $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Após o processo de ativação, a faixa de potencial ao redor do par redox foi selecionada e foram obtidos voltamogramas cíclicos em várias velocidades de varredura ($10 - 600 \text{ mV s}^{-1}$) mostrados na Figura III.5. Nesta mesma Figura podem ser observados voltamogramas cíclicos bem definidos e persistentes indicando que o DTNB foi ligado com sucesso na superfície da plataforma. A Figura III.5(A) mostra um gráfico da corrente de pico em função da velocidade de varredura obtidos a partir dos voltamogramas cíclicos. O gráfico da corrente de pico anódica

e catódica apresentou comportamento linear em função da velocidade de varredura indicando assim que o DTNB-ativado mostra um comportamento eletroquímico característico de espécies redox que estão confinadas na superfície do eletrodo [19].

Laviron formulou expressões para a voltametria de varredura linear para o caso de espécies eletroativas confinadas na superfície do eletrodo [99]. O gráfico de Laviron pode ser obtido medindo-se ΔE (definido como $E_p - E^{\circ'}$; E_p é o potencial de pico do processo anódico e catódico, e $E^{\circ'}$ é o potencial formal) em função do log da velocidade de varredura (v). Seguindo a Teoria, o coeficiente de transferência de elétrons (α) e a constante de velocidade heterogênea de transferência de elétrons (k_s) podem ser calculados empregando as Equações III.1 e III.2 quando $\Delta E_p > 200/n$ mV:

$$\alpha/(1 - \alpha) = v_a/v_c \quad (\text{Eq. III.1})$$

$$k_s = nF\alpha v_c/RT = (1 - \alpha)nFv_a/RT \quad (\text{Eq. III.2})$$

onde F é a constant de Faraday, n é o número de elétrons, RT apresentam seus valores usuais, e v_a e v_c representam as velocidades de varredura no intercepto das linhas retas do processo anódico e catódico, respectivamente. Como pode ser visto na Figura III.5(B) quando ($v \rightarrow 0$) o ΔE é praticamente independente do log da velocidade de varredura sugerindo uma cinética de transferência eletrônica rápida. No entanto, quando ($v \rightarrow \infty$) a separação dos picos começa a aumentar, indicando que uma limitação em decorrência da cinética de transferência de carga está ocorrendo. Assim como previsto por Laviron [99] e podendo ser observado na Figura III.5(B), para elevadas velocidades de varredura, os valores de ΔE foram proporcionais ao log da velocidade de varredura.

A partir da extrapolação das retas para $\Delta E = 0$ o valor de $\alpha = 0,5$ foi obtido empregando a Equação III.1. Utilizando o coeficiente angular das retas para ambos os processos anódico $2,3RT/(1-\alpha)nF$ e catódico $-2,3RT/\alpha nF$ o valor de $n =$

1,94 foi encontrado. O valor obtido está próximo do valor esperado de 2 elétrons para o processo redox nitroso/hidroxilamina [100].

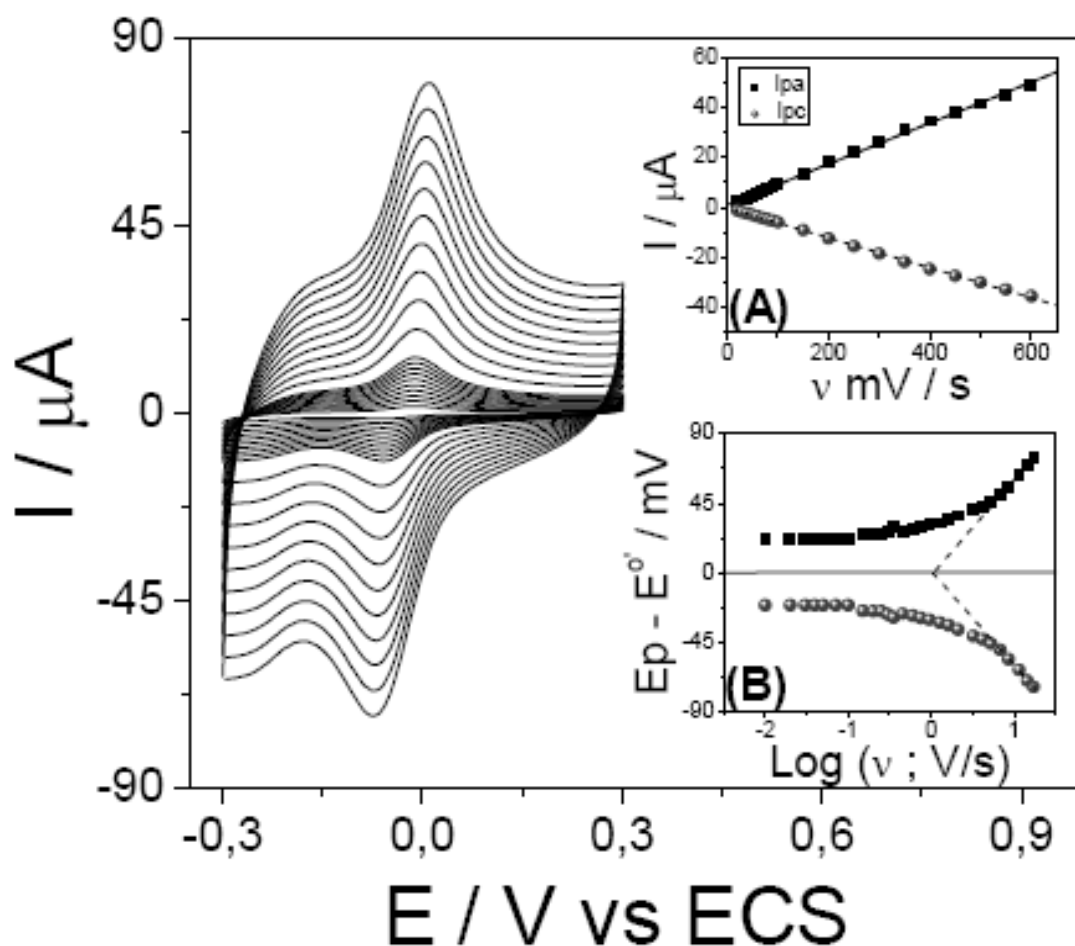


Figura III.5. Voltamogramas cíclicos do eletrodo modificado com o DTNB-ativado em várias velocidades de varredura ($10 - 600 \text{ mV s}^{-1}$). (A) Gráfico de I_p vs. v . (B) Gráfico de Laviron.

Além disso, utilizando a Equação III.2, a k_s foi calculada empregando as velocidades de varredura onde $\Delta E = 0$ (linha horizontal na Figura III.5(B)) apresentando um valor de 43 s^{-1} . O valor obtido para a constante é maior do que muitos trabalhos já reportados, com excessão para o eletrodo modificado contendo riboflavina [101] (Tabela III.1). Uma das justificadas para a rápida

comunicação eletrônica DTNB-eletrodo deve estar relacionada com a presença dos nanotubos de carbono, que através do seu sistema π , funcionam como uma espécie de ponte na transferência de elétrons. Sendo assim, a comunicação eletrônica entre os sítios redox ativos do mediador redox e a superfície do ECV é rápida, garantido que a etapa mediada não está limitando o processo que ocorre na interface da plataforma.

Tabela III.1. Parâmetros eletroquímicos e cinéticos de alguns eletrodos modificados com alguns mediadores redox.

Mediadores redox	α	n	k_s (s ⁻¹)
Riboflavina [101]	0,58	1,9	45,9
4-Nitroftalonitrila [102]	0,5	2,3	9,7
Nitrofluorenona [103]	–	–	4,5
Violeta de pirocatecol [104]	0,49	–	5,3
1,4-dihidroxiantraquinona [24]	0,66	–	4,5
Ácido clorogênico [105]	0,44	2,0	8,6
Ftalocianina Fe(II) + porfirina Fe(III) [106]	0,50	–	3,8
Tetrabromo-p-benzoquinona [107]	0,55	2,0	3,8
Azul de meldola [108]	0,51	–	5,3
Catalisador de Doyle [109]	0,22	–	17,0
Este trabalho	0,5	1,9	43,0

Após as caracterizações em função da velocidade de varredura foram feitos experimentos modificando o pH da solução. Como os sítios redox são derivados do grupo R-NO/R-NHOH, a reação redox que ocorre na superfície da plataforma pode ser antecipada como sendo dependente do pH. O perfil voltamétrico do eletrodo modificado com o DTNB-ativado foi caracterizado em vários pHs (5,0 a 8,0) por voltametria cíclica. A Figura III.6 mostra os gráficos da corrente de pico anódica e do potencial formal em função do pH em solução

tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. O coeficiente angular da reta ilustrada na Figura III.6(A) foi de $57,5 \text{ mV/pH}$ na faixa de pH estudada. Este coeficiente angular é muito próximo para reações onde a razão e^-/H^+ é igual a um ($59,2 (n_p/n)$) mV / pH , onde $n_p = n$ a 25°C [110]. Assim, o número de prótons deve ser também 2 porque o mesmo valor foi encontrado através do método de Laviron para o número de elétrons. Adicionalmente, em pH 7,0 a corrente de pico anódica apresentou o maior valor (Figura III.6(B)).

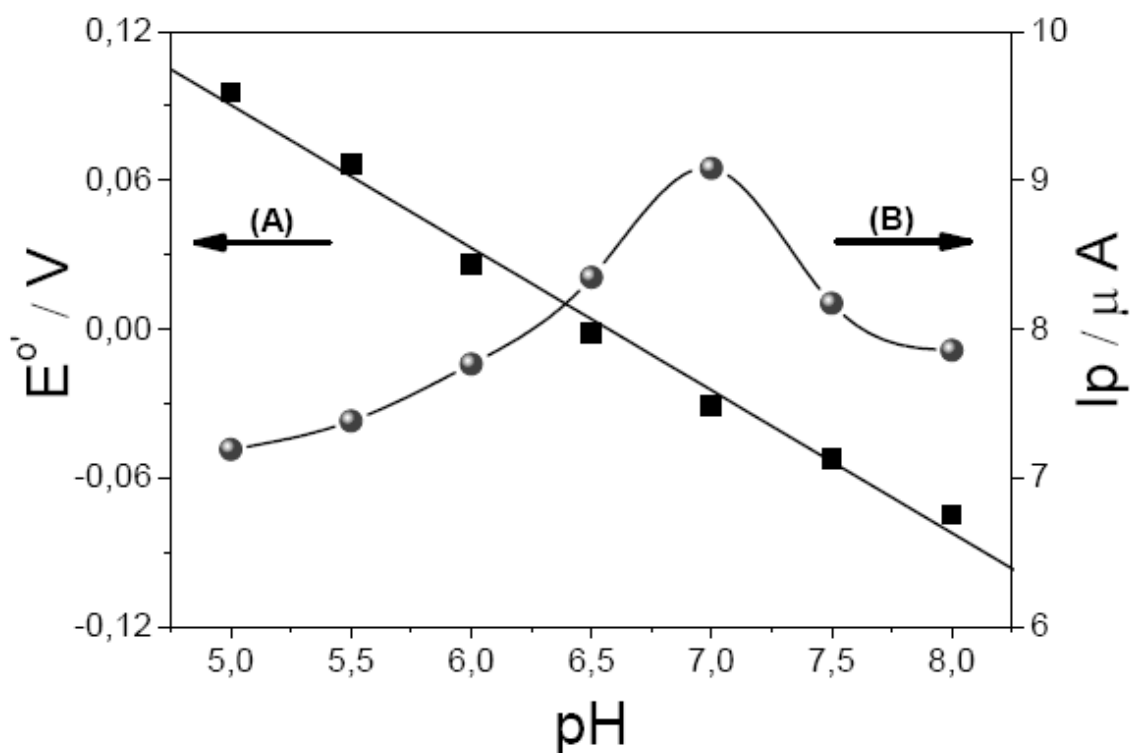


Figura III.6. Influência do pH da solução no potencial formal (A) e na corrente de pico (B) do mediador redox a partir de voltamogramas cíclicos registrados em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Os valores de ΔE_p ($E_{pa} - E_{pc}$) em função do pH da solução também foram avaliados (Figura III.7) empregando os resultados obtidos por voltametria cíclica. Este parâmetro permaneceu praticamente constante até pH 7,0 e então começou a aumentar, trazendo indícios de que uma limitação do processo redox está ocorrendo quando o meio fica alcalino.

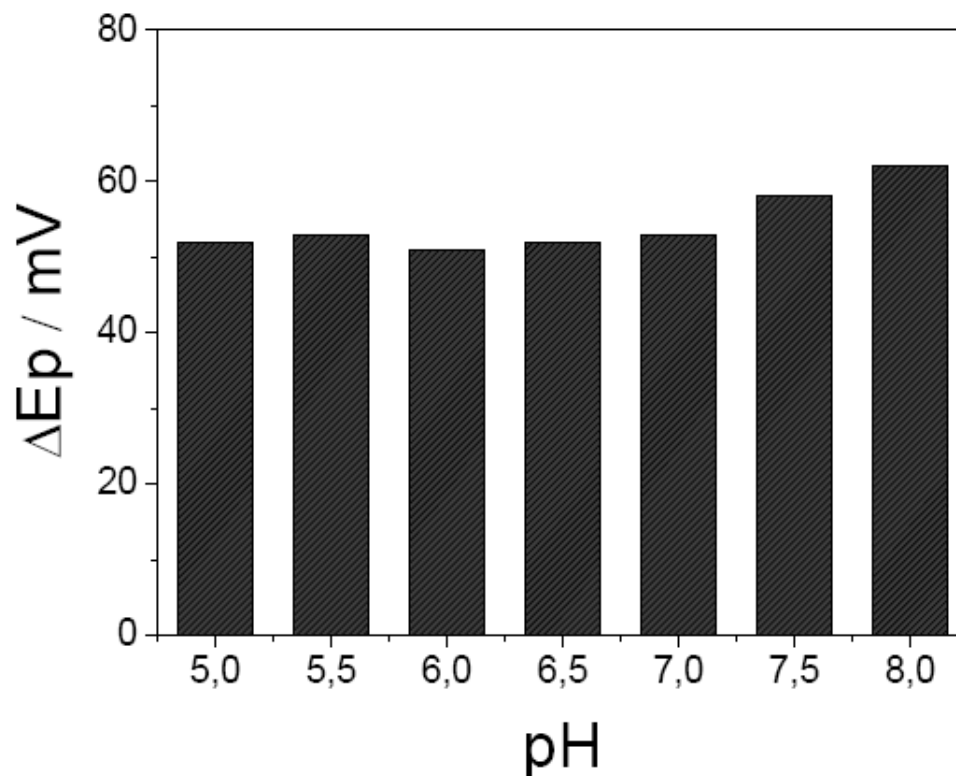


Figura III.7. Gráfico de ΔE_p versus pH.

III.2.4 Atividade eletrocatalítica da plataforma nanoestruturada

A construção de plataformas nanoestruturadas visando à melhoria dos processos interfaciais pode trazer inúmeras vantagens ao sensor. Desta forma, alguns nanomateriais são tão bem arquitetados que por si só já apresentam propriedades eletrocatalíticas. Os nanotubos de carbono, por exemplo, possuem propriedades eletrocatalíticas para a oxidação do NADH e Cys ilustradas em alguns trabalhos da literatura [111,112]. Assim, para ilustrar a eficiência do mediador redox na superfície da plataforma, foram obtidos voltamogramas cíclicos na presença de Cys após cada etapa envolvida no procedimento de construção do sensor. O processo associado com a oxidação eletroquímica do analito pode ser observado nos voltamogramas cíclicos da Figura III.8.

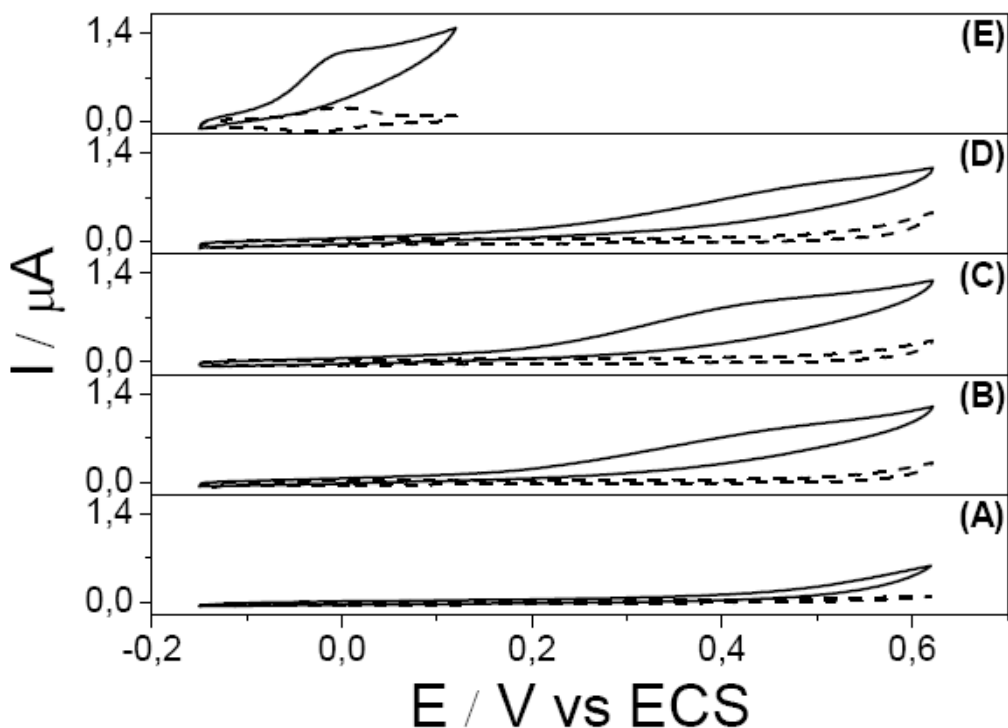


Figura III.8. Voltamogramas cíclicos obtidos em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 na presença de Cys 1,0×10⁻⁴ mol L⁻¹ em 2 mV s⁻¹ (—) para (A) ECV, (B) +MWCNTs, (C) +PEI, (D) +NPAu, (E) +DTNB-ativado e (----) na ausência de Cys, respectivamente.

Como pode ser observado na Figura III.8(A), utilizando o ECV sem nenhuma modificação a oxidação da Cys ocorre em um potencial muito positivo (~550 mV) e com um incremento de corrente baixo. Por outro lado, quando o ECV foi modificado com os MWCNTs (Figura III.8(B)) foi observado uma diminuição de aproximadamente 130 mV no potencial de oxidação da Cys. Após a modificação com o polímero e as NPAs (Figuras III.8(C) e (D) respectivamente), a plataforma não apresentou nenhuma mudança significativa no potencial de oxidação da Cys. No entanto, quando a plataforma nanoestruturada foi modificada com o DTNB-ativado, uma diminuição drástica do potencial de oxidação pode ser observada na Figura III.8(E), cerca de 550 e 420 mV em relação ao ECV e ECV+MWCNTs respectivamente, evidenciando dessa forma a eficiência eletrocatalítica do mediador redox empregado.

III.2.5 Estudos cronoamperométricos

A cronoamperometria foi empregada na investigação do processo eletroquímico na presença e ausência da Cys. A Figura III.9 mostra as curvas corrente-tempo do eletrodo modificado resultantes após aplicação de duas etapas de potenciais, uma de 50 mV (1^a. etapa) e outra de -130 mV (2^a. etapa).

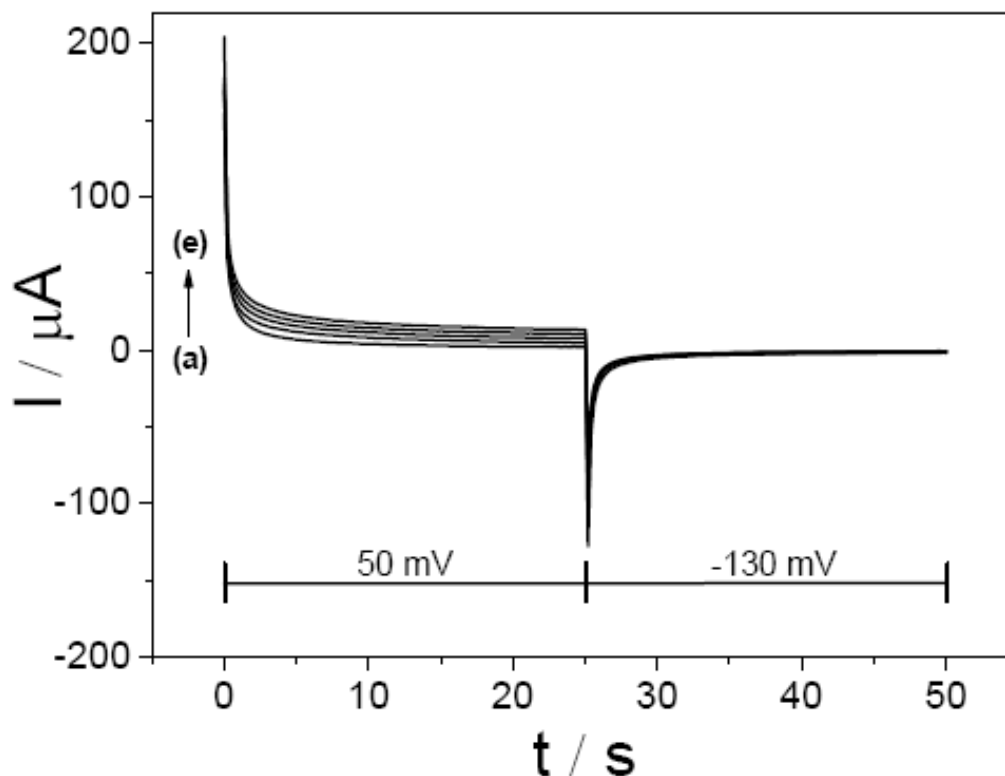
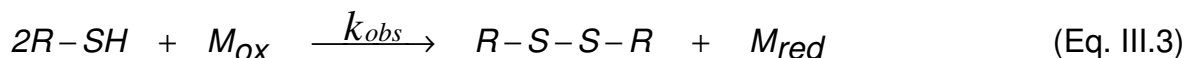


Figura III.9. Cronoamperogramas obtidos em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0: branco (a), 50,0 (b) 75,0 (c), 100,0 (d) e 125,0 (e) $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Cys.

Como pode ser visto na Figura III.9, quando a concentração de Cys aumenta, a corrente anódica associada com o potencial aplicado na primeira etapa também aumenta. No entanto, na segunda etapa a corrente catódica não aumenta, indicando que a espécie oxidada do mediador (M_{ox}) está reagindo na superfície da plataforma. A reação química que ocorre na superfície do eletrodo pode ser explicada pela Equação III.3:



Uma transferência de íons hidreto é esperada quando esse tipo de mediador redox reage com o NADH [113]. Entretanto, o mecanismo descrito em artigos para a reação entre grupos tióis e o grupo nitroso é diferente. Já foi reportado por dois artigos distintos [103-114] que a reação entre os grupos R-SH e R-NO ocorre através da formação de um aduto e não por uma simples transferência direta de elétrons. O ataque nucleofílico do grupo tiol da Cys no nitrogênio do grupo nitroso leva à formação deste aduto, que pode reagir com outra molécula de Cys formando a cistina e a espécie reduzida do mediador redox [115].

Sendo assim, uma reação química ocorre na superfície da plataforma nanoestruturada na presença de Cys e a constante cinética (k_{obs}) desta reação pode ser obtida por cronoamperometria de acordo com o método descrito na literatura [18]:

$$\frac{I_{cat}}{I_L} = \gamma^{1/2} \pi^{1/2} = \pi^{1/2} (k_{obs} Ct)^{1/2} \quad (\text{Eq. III.4})$$

onde I_{cat} é a corrente catalítica do eletrodo modificado na presença de Cys, I_L é a corrente na ausência de Cys e $\gamma = k_{obs} Ct$ (C é a concentração de Cys e t é o tempo (s)). A partir do coeficiente angular de um gráfico I_{cat} / I_L versus $t^{1/2}$ o valor de k_{obs} pode ser obtido para uma concentração conhecida do analito. Assim, como pode ser observado na Figura III.10(A), inicialmente foi obtido um gráfico de I_{cat} / I_L em função de $t^{1/2}$. Em seguida, os coeficientes angulares dessas retas foram plotados em função da $[Cys]^{1/2}$, Figura III.10(B). O coeficiente angular obtido foi de $164,4 \text{ s}^{-1/2} \text{ L}^{1/2} \text{ mol}^{-1/2}$, resultando em um valor de constante de $8,60 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para a constante cinética. Como pode ser observado na Tabela III.2 a constante cinética obtida está entre as maiores já publicadas, com exceção para o trabalho reportado por Ardakani e col. [24]. No entanto, o presente trabalho apresenta o menor potencial aplicado para a eletrooxidação de Cys sob condições de meio neutro.

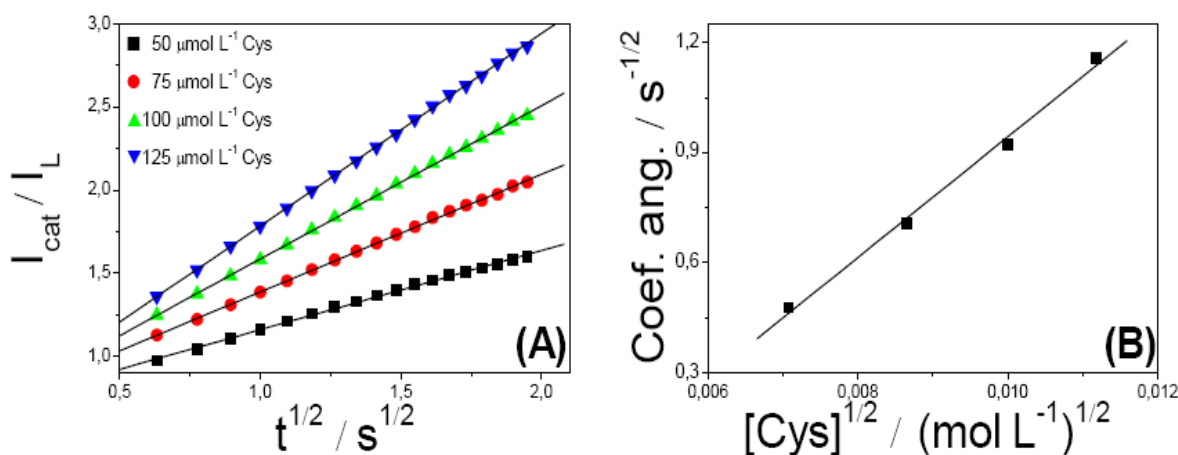


Figura III.10. (A) Gráfico de I_{cat} / I_L vs. $t^{1/2}$; (B) gráfico obtido a partir dos coeficientes angulares das retas obtidas em (A) vs. $[Cys]^{1/2}$.

Tabela III.2. Parâmetros e condições experimentais extraídos a partir de estudos cronoamperométricos para a eletrooxidação de Cys.

Referências	$E_{apl.}^*$ (mV)	Eletrólito de suporte	k_{obs} ($L mol^{-1} s^{-1}$)
Raof e col. [116]	800 vs Ag/AgCl	0,1 mol L^{-1} PBS + 0,1 mol L^{-1} LiClO ₄ pH 8,0	8,29
Ardakani e col. [24]	800 vs Ag/AgCl	0,1 mol L^{-1} PBS pH 2,0	$3,43 \times 10^4$
Raof e col [117]	350 vs Ag/AgCl	0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,0	$4,48 \times 10^3$
Tong e col. [118]	800 vs Ag/AgCl	0,1 mol L^{-1} NaClO ₄ pH 6,8	$1,59 \times 10^3$
Este trabalho	50 vs ECS	0,1 mol L^{-1} PBS pH 7,0	$8,60 \times 10^3$

*Potencial aplicado na 1ª Etapa (Ag/AgCl = ECS - 45 mV).

Com o intuito de extrair mais informações dos cronoamperogramas mostrados na Figura III.9 o coeficiente de difusão da Cys também foi calculado. Para uma espécie eletroativa com um coeficiente de difusão (D), a corrente correspondente da reação eletroquímica (sob controle difusional) é descrita pela Equação de Cottrell [19]:

$$I = \frac{nFAD^{1/2}C}{\pi^{1/2}t^{1/2}} \quad (\text{Eq. III.5})$$

onde D e C são o coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$) e a concentração (mol cm^{-3}) da espécie eletroativa, respectivamente. Um gráfico de I versus $t^{1/2}$ deve ser linear, e a partir do seu coeficiente angular, o coeficiente de difusão pode ser obtido. Os cronoamperogramas na presença de Cys ilustrados na Figura III.9 mostram um perfil típico de uma curva $I - t$, indicando que os valores de corrente obtidos devem ser controlados pela difusão da Cys na solução. O gráfico de I versus $t^{1/2}$ para as concentrações de Cys empregadas resultaram em linhas retas (Figura III.11(A)) e os coeficientes angulares dessas retas foram plotados em função da concentração de Cys, como mostrado na Figura III.11(B). Assim, o coeficiente de difusão da Cys foi estimado como sendo $1,51 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{s}^{-1}$, próximo do valor reportado na literatura [119].

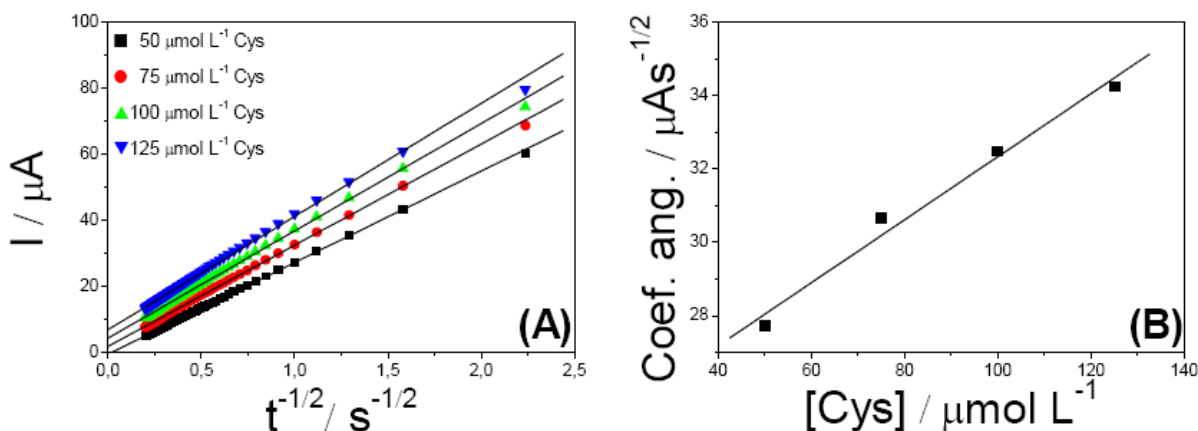


Figura III.11. (A) gráfico I vs. $t^{-1/2}$ e (B) gráfico dos coeficientes angulares obtidos em (A) vs. $[\text{Cys}]$. As concentrações de Cys utilizadas são as mesmas dos cronoamperogramas mostrados na Figura III.9.

Utilizando as constantes obtidas, a Figura III.12 mostra uma proposta esquemática para as reações que devem estar ocorrendo na superfície da plataforma nanoestruturada.

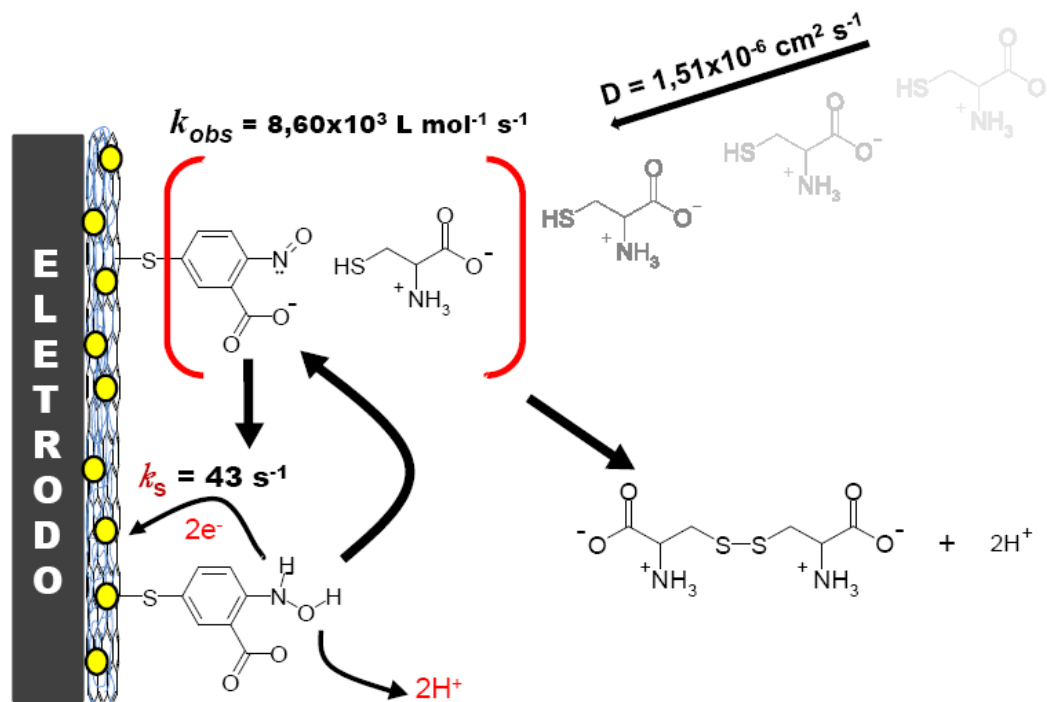


Figura III.12. Proposta para as reações que ocorrem na superfície da plataforma nanoestruturada.

A reação começa com a cisteína ($\text{pK}_a \text{ R-COOH} = 2,0$, $\text{R-SH} = 8,2$ e $\text{R-NH}_3 = 10,3$ [120]) se aproximando da superfície da plataforma por difusão ($D = 1,51 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) em pH 7,0. Na superfície da plataforma, o grupo tiol da Cys reage com o grupo nitroso do mediador redox e essa reação apresenta uma constante cinética de $8,60 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Após a reação, o produto oxidado é liberado e a espécie reduzida do mediador redox é formada. O produto de oxidação deve ser provavelmente a cistina, assim como reportado em outros trabalhos [114,121], no entanto não foram realizados ensaios de caracterização mais específicos. Após a formação da espécie reduzida do mediador, a hidroxilamina é oxidada na superfície do eletrodo (+50 mV vs. ECS). A comunicação eletrônica é bastante rápida (43 s^{-1}) quando comparada com outros

mediadores redox (Tabela III.1). A oxidação da hidroxilamina na superfície da plataforma envolve $2e^-$ e $2H^+$ e forma o grupo nitroso, permitindo que o ciclo catalítico continue.

III.2.6 Caracterização analítica

Para efetuar a caracterização analítica foram realizados experimentos amperométricos monitorando a corrente catalítica após adições sucessivas de Cys. Sendo assim, a influência de alguns parâmetros foi estudada, como: potencial aplicado, pH da solução, tipo e concentração do eletrólito. A Tabela III.3 mostra as melhores condições obtidas para os parâmetros estudados.

Tabela III.3. Caracterização analítica do sensor destinado a detecção de Cys.

Parâmetros estudados	Faixa / tipo de estudo	Melhor resposta*
Potencial aplicado	-100 até +100 mV	0 mV
pH	5,0 até 8,0	7,0
Tipo de eletrólito	PIPES, HEPES, TRIS, Mcllvaine e PBS	PBS
[Eletrólito] mol L ⁻¹	0,01 até 0,2	0,1

*Obtida pela sensibilidade das curvas após adições sucessivas de Cys.

Inicialmente foi realizado um estudo do potencial aplicado no eletrodo de trabalho para as análises de Cys. As respostas do sensor aumentaram até 0 mV e então permaneceram praticamente constantes devido às limitações que surgem do processo de transferência de massa. Assim, o potencial de 0 mV vs. ECS foi selecionado para os estudos posteriores.

O efeito do pH sobre a resposta do sensor também foi avaliado na faixa de 5,0 até 8,0. Em pH 7,0 a corrente atingiu o valor máximo e diminuiu para pHs

maiores. A corrente catalítica diminui para valores de pH maiores que 7,0 possivelmente devido à desestabilização do intermediário formado Cys-nitroso, assim como reportado por Adam e col. através de estudos cinéticos realizados em solução [122].

No estudo do tipo de eletrólito suporte a maior resposta foi obtida utilizando solução tampão fosfato, seguida por TRIS, Mcllvaine, HEPES e PIPES (Figura III.13).

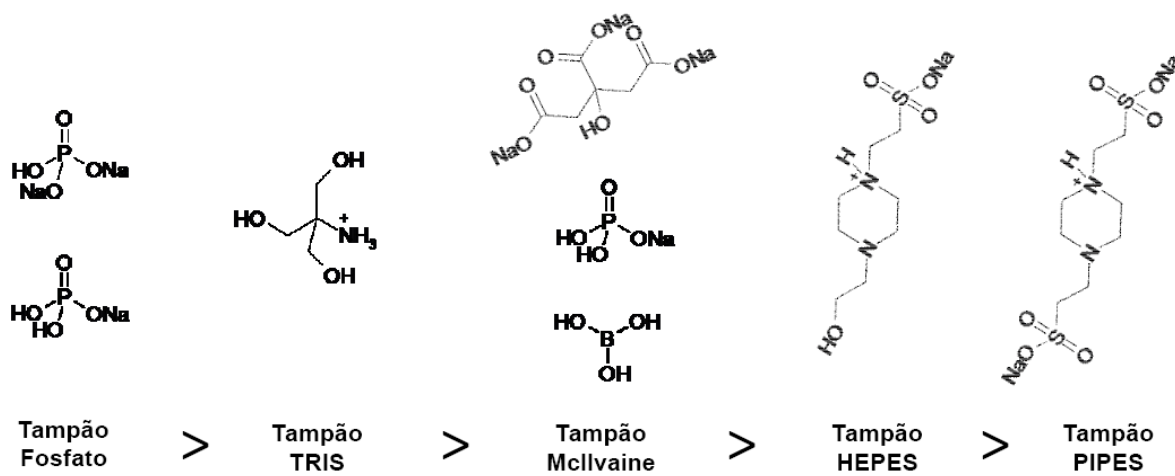


Figura III.13. Estrutura, composição e ordem de resposta analítica dos tipos de eletrólitos de suporte estudados na caracterização analítica do sensor.

Como pode ser observado na Figura III.13, a resposta do sensor foi maior para os eletrólitos que apresentam uma estrutura menor, facilitando possivelmente a difusão desses íons pela plataforma. Assim, a solução tampão fosfato foi selecionada para os estudos subsequentes.

Finalmente, as respostas obtidas nas medidas cronoamperométricas em diferentes concentrações da solução tampão fosfato aumentaram até $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Para valores superiores a resposta permaneceu praticamente constante indicando que existe uma quantidade de carga suficiente para manter a eletroneutralidade do eletrodo. Nesse sentido, a concentração de eletrólito de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foi selecionada e a curva analítica foi construída empregando os resultados mostrados na Tabela III.3.

A Figura III.14 ilustra a resposta cronoamperométrica do sensor em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0, após sucessivas adições de Cys, em função de cada etapa (A – E) da construção do sensor.

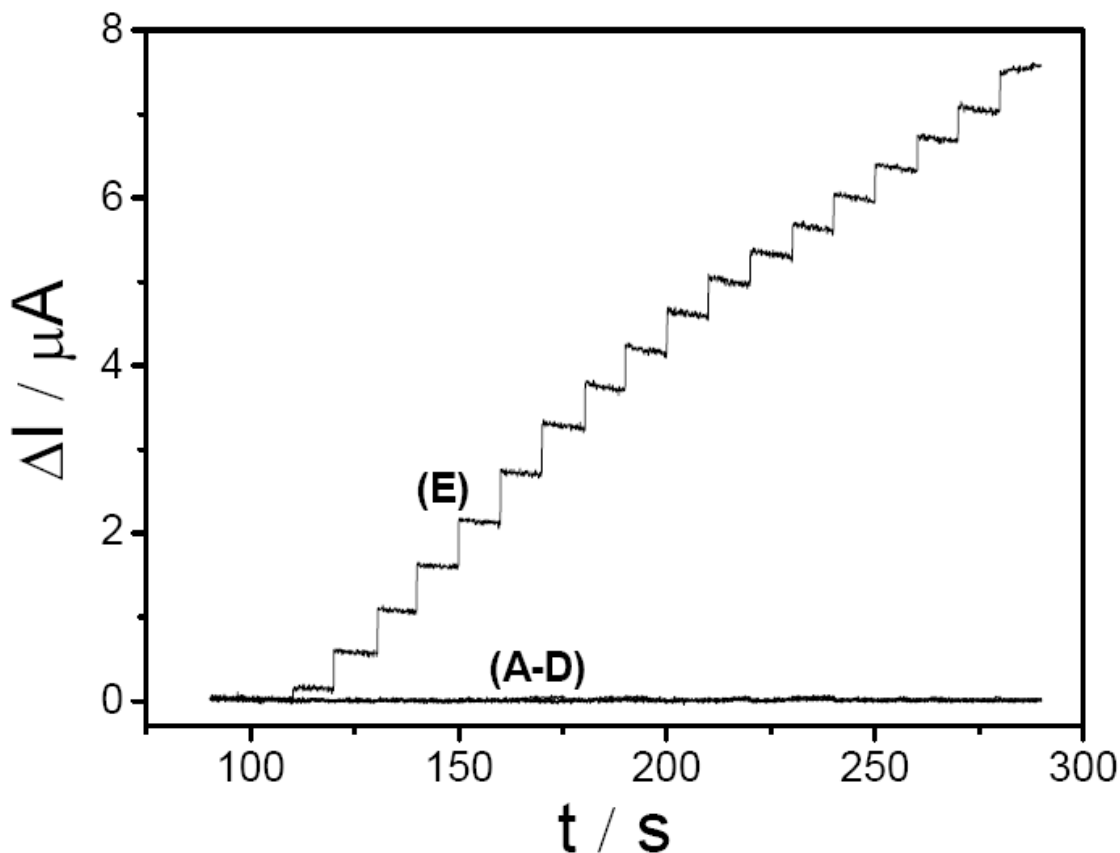


Figura III.14. Resposta cronoamperométrica observada após adições sucessivas de uma solução estoque de Cys em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 para: (A) ECV, (B) +MWCNTs, (C) +PEI, (D) +NPAu e (E) +DTNB-ativado.

Como pode ser observado na Figura III.14(E), somente quando a plataforma está modificada com o mediador redox é possível observar uma resposta cronoamperométrica com o potencial aplicado de 0 mV vs. ECS. Os resultados obtidos aqui estão em concordância com os voltamogramas cíclicos mostrados na Figura III.8, mostrando que o efeito eletrocatalítico em baixos sobrepotenciais é atribuído devido à presença do mediador redox ativado na superfície da plataforma.

Na Figura III.15, pode ser observado uma faixa linear de resposta de 9,0 até 250,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, podendo ser expressa com a seguinte equação:

$$\Delta I(\mu\text{A}) = 0,023(\pm 0,03) + 0,021(\pm 0,005)[\text{Cys}] (\mu\text{mol L}^{-1}) \quad (\text{Eq. III.6})$$

com um coeficiente de correlação de 0,999 ($n = 3$). O sensor apresentou limite de detecção e quantificação de 2,7 e 9,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ respectivamente, seguindo as recomendações da IUPAC [123]. Além disso, o tempo de resposta do sensor foi de 0,16 s.

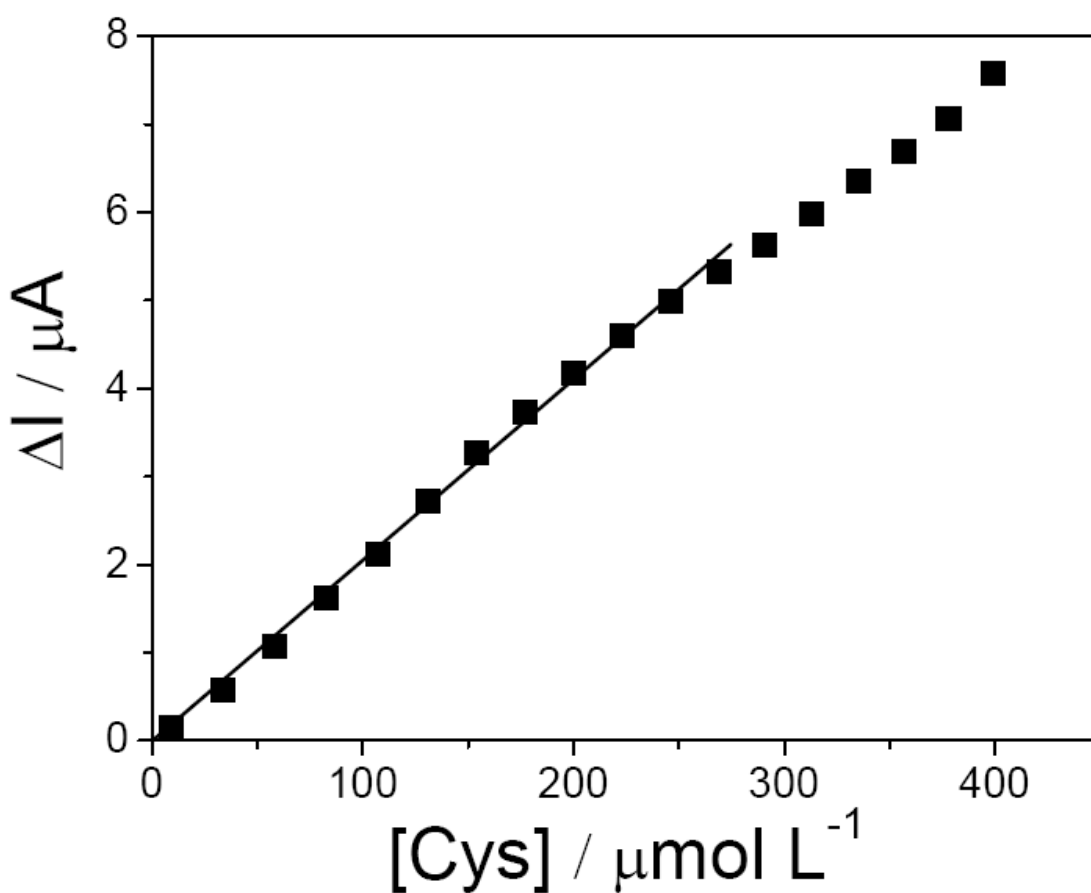


Figura III.15. Curva analítica.

A Tabela III.4 mostra uma série de trabalhos envolvendo mediadores redox para a determinação de Cys. Para um efeito de comparação, inúmeros artigos científicos com condições experimentais semelhantes foram selecionados.

Tabela III.4 Métodos eletroquímicos, condições experimentais e parâmetros analíticos para a determinação de Cys.

Referências	Método	$E_{\text{apl.}}$ (V)	Eletrólito de suporte	L.D. ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Sensibilidade ($\text{nA L } \mu\text{mol}^{-1}$)
Amini e col. [124]	VPD Cronoamperometria	0,600 vs. Ag/AgCl	PBS (pH 6 - 8)	0,5	~ 22
Inoue e Kirchhoff [125]	Cronoamperometria	0,500 vs. Ag/AgCl	Tampão borato (pH 8,2)	0,0006	4,71
Shahrokhian e Karimi [126]	VC, VPD	0,500 vs. Ag/AgCl	Tampão acetato (pH 5,0)	0,2	0,036
Tan e col. [21]	VC	0,580 vs. Ag/AgCl	PBS (pH 7,0)	–	15,5
Teixeira e col. [127]	Cronoamperometria	0,650 vs. ECS	KCl (pH 5,0)	170	4,7
Salimi e Pourbeyram [128]	VC	~0,800 vs. Ag/AgCl	PBS (pH 2,0)	1	5
Ozoemena e col. [129]	VC	~0,400 vs. Ag/AgCl	Solução tampão (pH 4,0)	0,31	–

Ozoemena e col. [130]	VC	0,540 e 0,330 vs. Ag/AgCl	Solução tampão (pH 4,0)	0,52	–
Filanovsky [131]	VC e Cronoamperometria	0,400 vs. Ag/AgCl	Tampão acetato (pH 5,0)	0,2	8,89
Li e col. [132]	Amperometria - FIA	0,800 vs. Ag/AgCl	PBS (pH 7,0)	1,7	9,28
Shahrokhian [133]	Potenciometria	–	PBS (pH 8,5)	~ 1	–
Spătaru e col. [134]	Voltametria - FIA	0,570 vs. ECS	KHCO ₃ (pH 9,0)	0,9	12 - 20 12
Lima e col. [114]	Cronoamperometria	0,33 vs. Ag/AgCl	PBS (pH 7,0)	0,25	37
Deng e col. [111]	Cronoamperometria	0,470 vs ECS	PBS (pH 7,4)	0,26	0,025
Este trabalho	Cronoamperometria	0 vs. ECS	PBS (pH 7,0)	2,7	21

VC: voltametria cíclica; VPD: voltametria de pulso diferencial; FIA: análise por injeção em fluxo. (Ag/AgCl = ECS - 45 mV).

Como pode ser observado na Tabela III.4, as sensibilidades das curvas analíticas são menores quando comparadas com o presente trabalho, exceto para os trabalhos reportados por Lima [114] e Amini [124], no entanto o potencial de oxidação apresentado por estes autores foi mais positivo. Um dos aspectos que merece destaque se refere ao potencial de oxidação da Cys. De acordo com a Tabela III.4, o presente trabalho apresenta o menor potencial de oxidação para a eletrooxidação da Cys, resultando assim em uma análise que pode minimizar possíveis interferentes.

III.2.7 Estabilidade do sensor

A estabilidade do eletrodo modificado foi avaliada em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 fazendo adições sucessiva de Cys e monitorando a corrente (ΔI) por cronoamperometria. Os eletrodos modificados, armazenados em temperatura ambiente, apresentaram estabilidade de aproximadamente 3 semanas.

A repetibilidade das medidas e da construção das interfaces também foram avaliadas. Depois de 10 medidas sucessivas, a resposta cronoamperométrica do sensor para 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Cys apresentou um desvio padrão relativo (D.P.R.) menor que 5%. Além disso, quando a plataforma foi preparada 7 vezes da mesma forma e avaliada em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 o D.P.R. obtido foi de 4,5 %, indicando uma boa repetibilidade.

III.2.8 Aplicação do sensor

O sensor proposto foi empregado na determinação de amostras de Cys em triplicata. As concentrações de Cys foram obtidas utilizando o método da adição de padrão e o resultados foram confrontados com o método espectrofotométrico [8] utilizando o teste-t pareado (Tabela III.5). Os resultados obtidos foram estatisticamente iguais ao do método comparativo.

Tabela III.5. Determinação de Cys nas amostras.

Amostras	Sensor amperométrico*	Método comparativo*
1	498 (± 2)	496 (± 8)
2	506 (± 4)	503 (± 5)
3	503 (± 3)	501 (± 6)

* massa (mg) obtida por cápsula.

O efeito das seguintes substâncias na determinação de Cys foi investigado: ácido cítrico, EDTA, glicose, polietilenoglicol e cloreto de sódio. Monitorando a corrente (ΔI) de $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Cys por cronoamperometria, foi verificado que nenhuma destas substâncias interferiram no desempenho do sensor. No entanto, moléculas contendo o grupo tiol são interferentes para os sensores desenvolvidos por razões descritas anteriormente. O ácido ascórbico, um possível doador de íons hidreto [135], também interfere nas medidas e o seu efeito como interferente será abordado no próximo capítulo.

Ensaio de recuperação das amostras comerciais de Cys foram obtidos utilizando o sensor proposto. Neste estudo, alíquotas de $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Cys foram adicionadas e a corrente (ΔI) foi obtida por cronoamperometria. A porcentagem de recuperação das amostras variou de 97 – 103 % sugerindo que não há efeito de matriz nas determinações.

III.2.9 Conclusões

O mediador redox DTNB (ácido 5,5-ditio-2-nitrobenzoico) foi ancorado com sucesso sobre uma plataforma nanoestruturada contendo MWCNTs, PEI e NPAus. O ancoramento foi possível devido à boa interação entre os átomos de enxofre do mediador com a superfície de ouro das nanopartículas. As etapas de montagem do sensor foram caracterizadas por MEV e também através de ensaios eletroquímicos. Obtendo-se voltamogramas cíclicos em função de cada etapa da

construção do sensor foi possível verificar a contribuição de cada material na resposta eletrocatalítica frente à eletrooxidação da Cys. Já os estudos cronoamperométricos forneceram uma rota experimental rápida para se extrair a constante cinética (k_{obs}) da reação química e o coeficiente de difusão da Cys em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0. Por fim, o sensor foi aplicado em amostras reais e apresentou resultados estatisticamente iguais ao do método comparativo.

CAPÍTULO IV



SENSOR PARA NADH

IV.1 Apresentação do capítulo

Neste capítulo serão apresentados os resultados referentes à construção, caracterização e estudo das propriedades eletrocatalíticas do sensor destinado à detecção do NADH, visando à construção de um biossensor. A molécula selecionada para mediar o processo eletroquímico da eletrooxidação do NADH foi o ácido 3,5-dinitrobenzoico (3,5-DNB), Figura IV.1. Para exercer tal papel, a molécula será ancorada em uma plataforma nanoestruturada baseada em MWCNTs funcionalizados com PEI. Em seguida, serão discutidos ensaios de caracterização por microscopia eletrônica de varredura e também caracterizações eletroquímicas do par redox nitroso/hidroxilamina formado a partir do mediador redox utilizado. Para centralizar o efeito eletrocatalítico do mediador redox, serão apresentados voltamogramas cíclicos obtidos após cada etapa da construção do sensor. A cronoamperometria e experimentos empregando o eletrodo de disco rotatório (EDR) serão abordados a fim de estudar o mecanismo de eletrooxidação do NADH. Ao final, serão apresentados os resultados da caracterização analítica do sensor proposto.

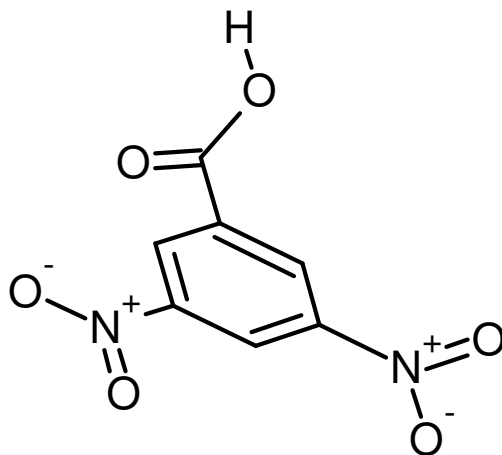


Figura IV.1 Fórmula estrutural do ácido 3,5-dinitrobenzoico (3,5-DNB).

IV.2 Resultados e discussão

IV.2.1 Caracterização por MEV e imobilização do mediador

A Figura IV.2 mostra as micrografias do MEV da plataforma nanoestruturada baseada em MWCNTs/PEI em diferentes magnificações: (A) 1,000× e (B) 10,000×. A micrografia ilustrada na Figura IV.2(A) mostra que os MWCNTs estão bem distribuídos na superfície. A partir da Figura IV.2(B), que representa uma magnificação da porção central da Figura anterior, pode ser observado que os MWCNTs estão densamente empacotados e eficientemente entrelaçados na rede polimérica fornecendo uma matriz ideal para receber mediadores redox ou enzimas. A excelente distribuição do material é devido à presença de grupos amino protonados repelindo os tubos, evitando agregação causada pelas interações hidrofóbicas e forças atrativas de van der Waals entre os tubos [136].

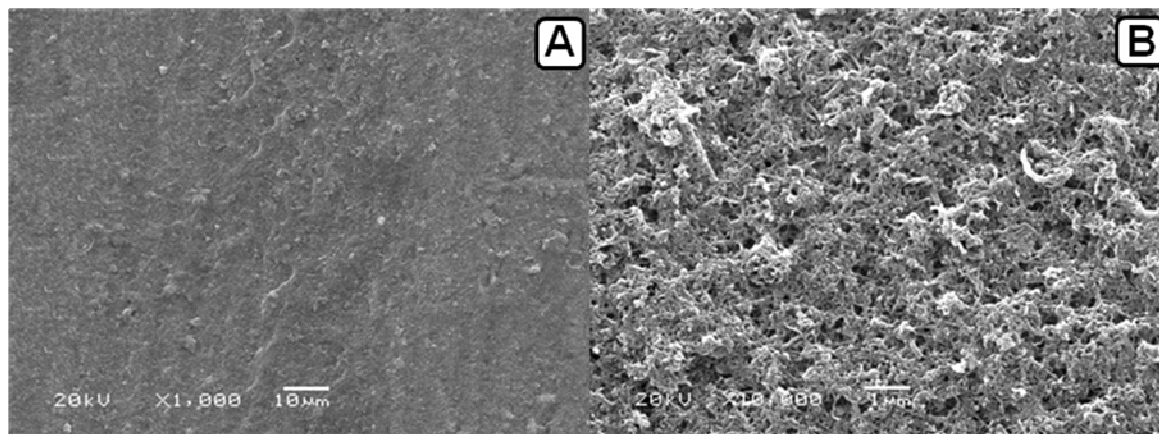


Figura IV.2. Micrografias obtidas da plataforma nanoestruturada contendo MWCNTs/PEI para as magnificações: (A) 1,000× e (B) 10,000×.

A rede polimérica que envolve os MWCNTs fornece uma grande quantidade de grupos amino que permitem a imobilização do mediador redox na superfície da plataforma. Sendo assim, para imobilizar o mediador redox, a

plataforma nanoestruturada foi deixada em contato com uma solução etanólica contendo EDC, NHS e o 3,5-DNB. O sistema EDC/NHS é amplamente utilizado na literatura para conectar um grupo R-COOH com uma função R-NH₂ através da formação de uma ligação amida [137, 138]. A partir desse sistema reacional, os grupos R-COOH são convertidos em um intermediário mais reativo derivado do grupo succinimidil-éster [137]. Assim, a Figura IV.3(A) mostra a formação do intermediário (3,5-DNBSE) a partir do grupo R-COOH do 3,5-DNB.

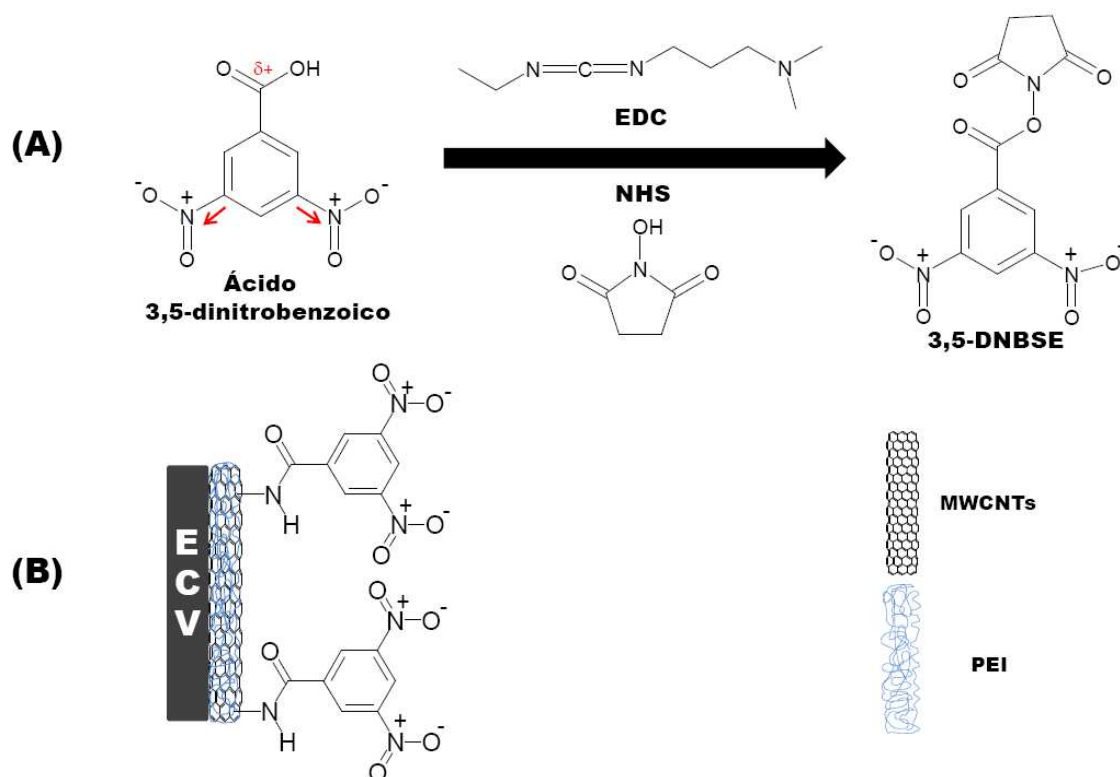


Figura IV.3. (A) Esquema de formação do intermediário 3,5-DNBSE a partir de uma solução contendo 3,5-DNB, EDC e NHS. (B) Mediador redox imobilizado na superfície da plataforma.

A imobilização do 3,5-DNB na plataforma (Figura IV.3(B)) foi acompanhada monitorando a corrente de pico anódica do par redox R-NO/R-NHOH em função do tempo. A resposta aumentou até 1,5 h e então permaneceu constante. Portanto, o tempo reacional de 1,5 h foi selecionado para a construção do sensor. O tempo reacional obtido foi relativamente curto e pode estar

relacionado com a presença dos grupos nitro elétron-retiradores presentes na molécula do mediador, tornando o carbono da carbonila mais eletrofílico e facilitando a etapa de imobilização.

Um ponto interessante que merece ser destacado se refere à estratégia utilizada para imobilizar o mediador redox na superfície da plataforma. Se a redução dos grupos nitro tivesse sido feita antes da imobilização utilizando uma enzima [139] ou um complexo de estanho (II) [140], as moléculas do 3,5-DNB poderiam reagir entre si, pois a hidroxilamina é uma base de Lewis e reage com eletrófilos [141]. Assim, a estratégia empregada de ativação *in situ* do mediador desempenha um papel importante no processo de imobilização minimizando possíveis reações indesejáveis.

IV.2.2 Ativação e caracterização do par redox

Após o 3,5-DNB estar quimicamente ligado nos grupos amino do PEI, o par redox R-NO/R-NHOH foi eletrogerado *in situ* através de uma ciclagem do potencial entre 0,15 e -0,55 V *versus* ECS em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0. Como pode ser observado na Figura IV.4, no primeiro ciclo o grupo nitro é reduzido irreversivelmente para R-NHOH e oxidado para R-NO na varredura reversa. No segundo ciclo é possível observar um pico de redução que pode ser atribuído ao par redox R-NO/R-NHOH.

Os voltamogramas cíclicos obtidos após o processo de ativação do eletrodo modificado com o 3,5-DNB são mostrados na Figura IV.5 em várias velocidades de varredura (10 - 800 mV s⁻¹). Nesta mesma Figura podem ser observados voltamogramas cíclicos bem definidos e persistentes indicando que o ácido 3,5-DNB foi ligado com sucesso na superfície da plataforma. A Figura IV.5(A) mostra um gráfico de corrente de pico em função da velocidade de varredura. Os gráficos da corrente de pico anódica e catódica apresentaram comportamento linear em função da velocidade de varredura indicando assim que o 3,5-DNB-ativado mostra um comportamento eletroquímico característico de espécies redox que estão confinadas na superfície do eletrodo [19].

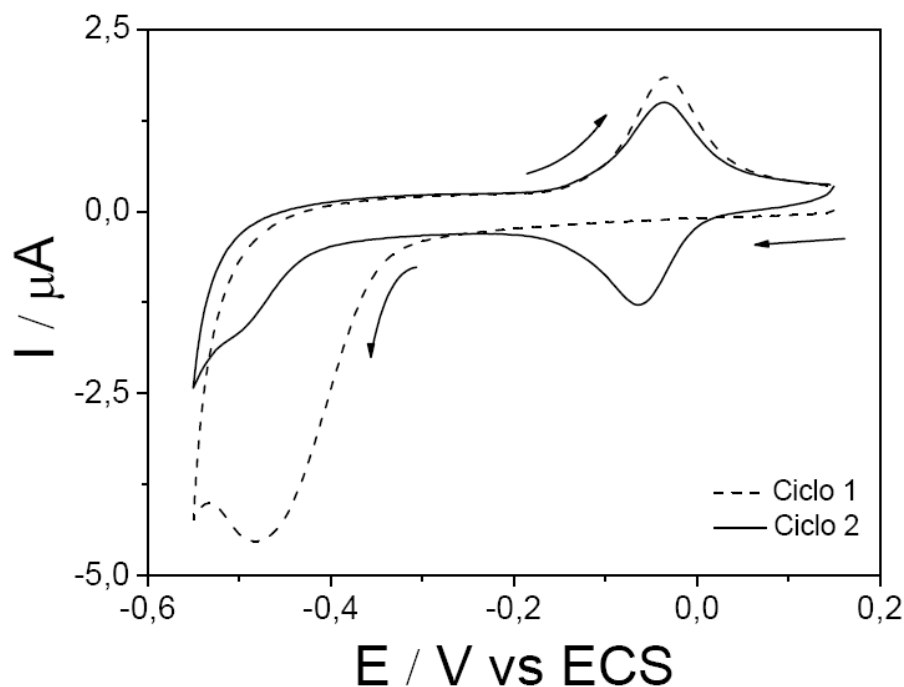


Figura IV.4. Formação do par redox R-NO/R-NHOH em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 e $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

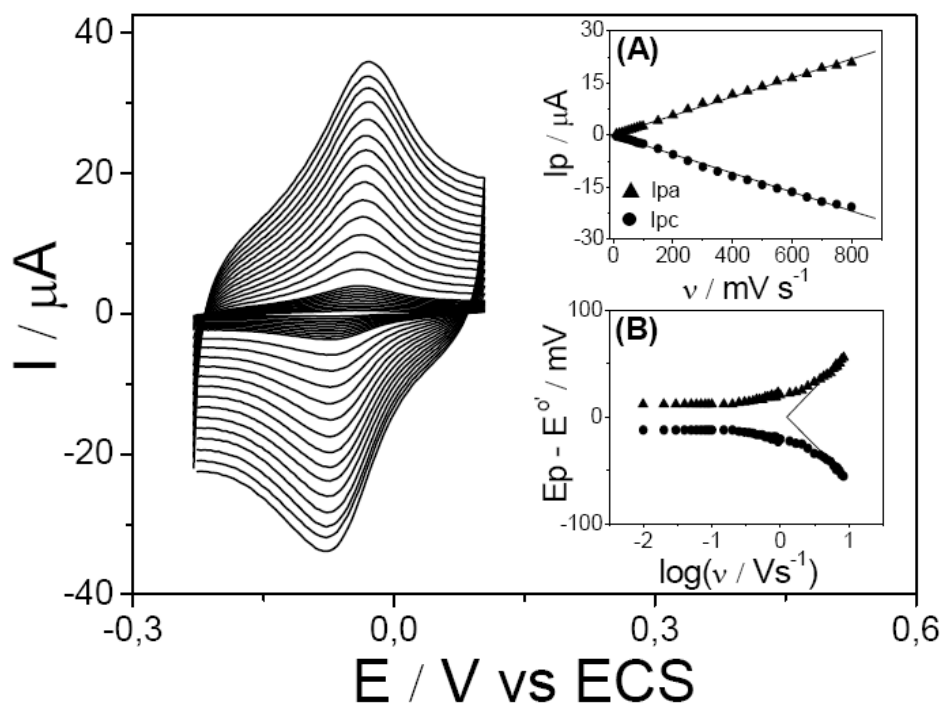


Figura IV.5. Voltamogramas cíclicos do par R-NO/R-NHOH em várias velocidades de varredura (10 – 800 mV s^{-1}). (A) Gráfico de I_p vs. v . (B) Gráfico de Laviron.

A partir dos valores de ΔE obtidos na Figura IV.5 foi construído o gráfico de Laviron (Figura IV.5(B)), assim como demonstrado no capítulo III (Item III.2.3). O gráfico apresentou um comportamento característico esperado pelo modelo descrito por Laviron [99] e, utilizando as Equações III.1 e 2, foi possível extrair da Figura IV.5(B) alguns parâmetros importantes como o α , n e k_s . O coeficiente de transferência de elétrons (α) obtido foi 0,5 e o número de elétrons (n) envolvidos no processo redox apresentou um valor de 1,87. Este último, está próximo do valor esperado de 2 elétrons para o processo redox nitroso/hidroxilamina [100]. Além disso, a constante de velocidade heterogênea de transferência de elétrons (k_s) apresentou um valor de 50 s^{-1} , maior do que muitos outros mediadores já reportados (Tabela III.1), sugerindo um processo de transferência de elétrons rápido do mediador com a superfície do eletrodo.

Após as caracterizações do par redox em função da velocidade de varredura foram obtidos voltamogramas cíclicos variando o pH da solução (5,0 – 8,0). Como pode ser observado na Figura IV.6, o potencial formal ($E^{\circ'}$) sofre um deslocamento em função do pH e, esse deslocamento, pode ser analisado de maneira mais criteriosa obtendo-se um gráfico de $E^{\circ'}$ vs pH. Como pode ser visto no gráfico inserido na Figura IV.6, o coeficiente angular ($E^{\circ'} / \text{pH}$) é $60,6 \text{ mV} / \text{pH}$ na faixa de pH estudada. Este coeficiente angular é muito próximo para reações onde a razão e^-/H^+ é igual a um ($59,2 (n_p/n) \text{ mV} / \text{pH}$, onde $n_p = n$ a 25°C [48]. Assim, o número de prótons deve ser também 2 porque o mesmo número foi encontrado através do método de Laviron para o número de elétrons.

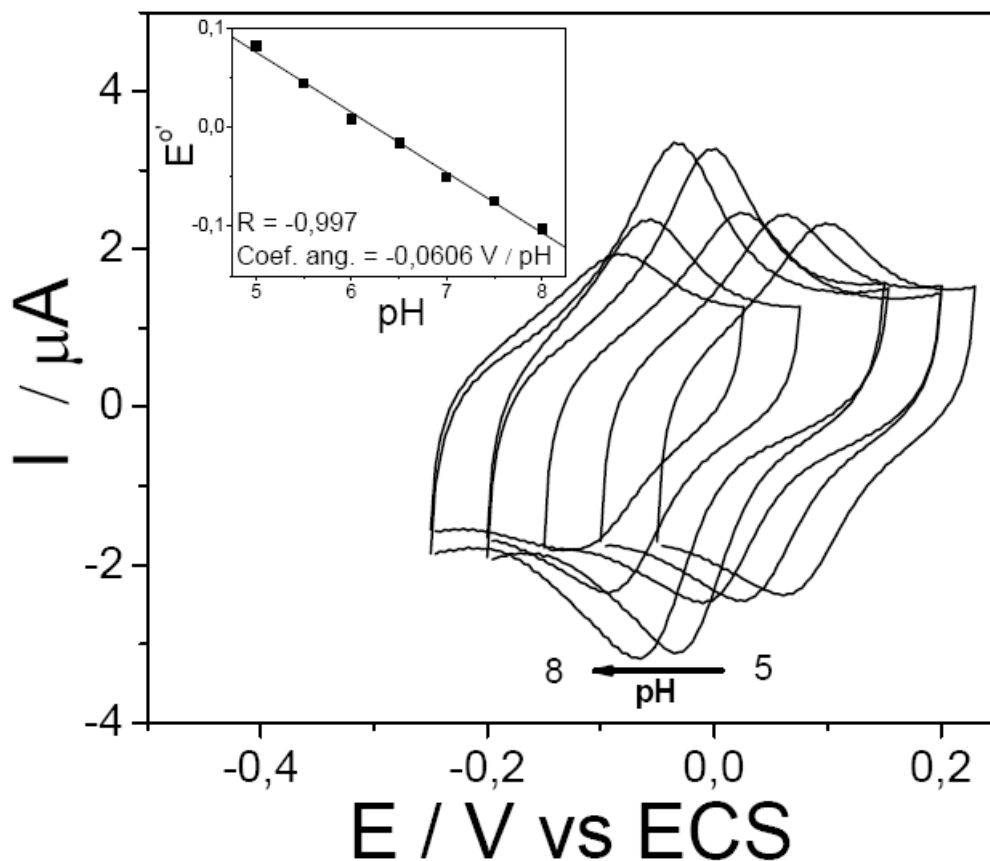


Figura IV.6. Voltamogramas cíclicos obtidos em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ para o eletrodo modificado com o 3,5-DNB-ativado em diferentes pHs (5,0 – 8,0) e $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$. Inserido: Gráfico de $E^{\circ'}$ vs pH.

IV.2.3 Atividade eletrocatalítica da plataforma nanoestruturada

Experimentos preliminares para a elucidação da atividade eletrocatalítica da plataforma nanoestruturada contendo o 3,5-DNB-ativado para a detecção do NADH foram realizados utilizando voltametria cíclica. Os voltamogramas cíclicos foram obtidos após cada etapa de montagem da plataforma nanoestruturada. A Figura IV.7 destaca os processos relacionados com a oxidação eletroquímica do NADH. Como pode ser observado na Figura IV.7(A), com o ECV não modificado, a oxidação do NADH ocorre em sobrepotenciais elevados, com um potencial de pico em 650 mV.

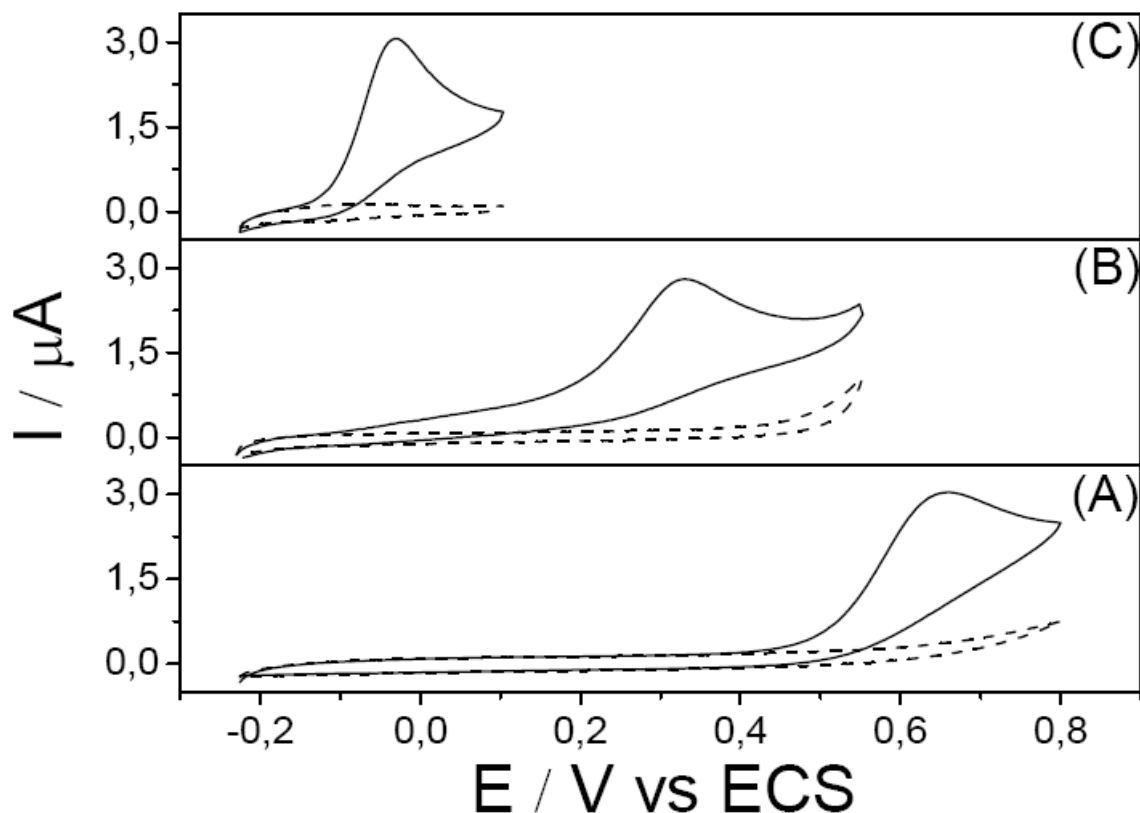


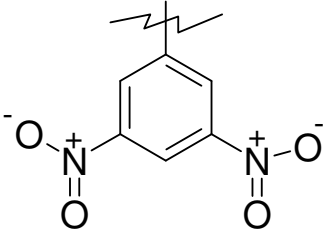
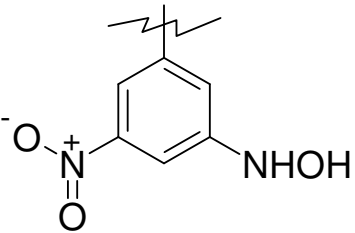
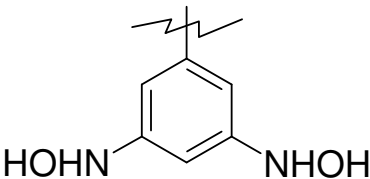
Figura IV.7. Voltamogramas cíclicos obtidos em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 e $\nu = 2 \text{ mV s}^{-1}$ na presença de NADH $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (—) para (A) ECV não modificado, (B) ECV modificado com MWCNTs/PEI, (C) ECV modificado com MWCNTs/PEI/3,5-DNB e (---) na ausência de NADH, respectivamente.

Já o eletrodo modificado com a dispersão de MWCNTs/PEI (Figura IV.7(B)) mostra um deslocamento catódico substancial do potencial de pico anódico, aproximadamente 330 mV. Estes resultados confirmam que mesmo na presença do polímero, os MWCNTs mantiveram sua reatividade eletroquímica justificado pelo efeito sinérgico reportado recentemente entre MWCNTs-PEI [142]. Além disso, quando o 3,5-DNB-ativado está ancorado na plataforma, um decréscimo drástico do potencial de oxidação (cerca de 680 e 350 mV em relação ao ECV e ao ECV+MWCNTs/PEI respectivamente) e um perfil bem definido podem ser observados na Figura IV.7(C) mostrando, desta forma, a eficiência eletrocatalítica do mediador redox empregado.

IV.2.4 Efeito da ativação dos grupos nitro do mediador

Voltamogramas cíclicos na presença e ausência de NADH foram obtidos no sentido de avaliar as propriedades redox que ocorrem quando mais de um grupo nitro é ativado *in situ*. A Tabela IV.1 mostra a corrente catalítica obtida na presença de $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de NADH após diferentes processos de ativação.

Tabela IV.1. Comparação entre a corrente catalítica da NADH em função do procedimento de ativação do 3,5-DNB ancorado na plataforma.

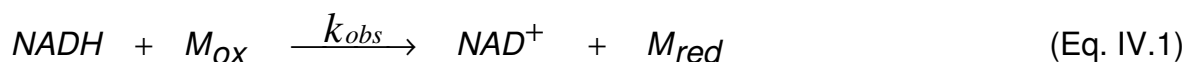
Estrutura química do mediador redox	Processo de ativação ^a	Grupos (R-NO ₂) reduzidos	ΔI (μA) ^b
	—	—	—
	0,15 até -0,55 V	1	1,35
	0,15 até -0,80 V	2	1,17

^aEstudo em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0. ^bVoltamogramas cíclicos obtidos na faixa de potencial de -0,23 a 0,1 V vs. ECS ($v = 2$ mV s⁻¹) e 1×10^{-4} mol L⁻¹ NADH.

Como pode ser observado na Tabela IV.1, quando nenhum processo de ativação é realizado, ambos os grupo nitro permanecem na sua forma oxidada e eles não são capazes de catalisar a electrooxidação do NADH. No entanto, um processo de ativação entre 0,15 e -0,55 V *versus* ECS converte somente um dos grupos nitro para hidroxilamina. O par redox formado é agora capaz de catalisar a eletrooxidação do NADH em baixos sobrepotenciais. Quando o potencial de ativação é estendido até -0,80 V *versus* ECS os dois grupos nitro presentes na molécula do mediador são reduzidos para hidroxilamina. O processo redox apresenta agora dois pares redox muito próximos também capazes de catalisar a eletrooxidação do NADH, mas a corrente catalítica é menor quando comparada com o caso anterior. Estes resultados estão em concordância com estudos prévios reportados sobre a influência da quantidade de grupos nitro reduzidos e a atividade eletrocatalítica [143]. Mano e Kuhn reportaram em seu trabalho que a presença de um segundo grupo elétron retirador torna o nitrogênio do grupo nitroso mais eletrofílico, facilitando a reação [143].

IV.2.5 Estudos cronoamperométricos

A cronoamperometria foi empregada para a investigação do processo eletroquímico na presença e ausência de NADH. A Figura IV.8 mostra o gráfico de corrente-tempo para o eletrodo modificado com a plataforma contendo o 3,5-DNB-ativado fixando o potencial em 20 mV e em seguida -130 mV *versus* ECS para várias concentrações de NADH. Como pode ser observado na Figura IV.5, quando a concentração de NADH aumenta, a corrente relacionada ao processo anódico também aumenta. No entanto, quando o potencial é fixado em -130 mV, não ocorre nenhum aumento relacionado ao processo catódico evidenciando que o grupo nitroso (M_{ox}) está sendo consumido em uma etapa química que pode ser explicada pela Equação IV.1:



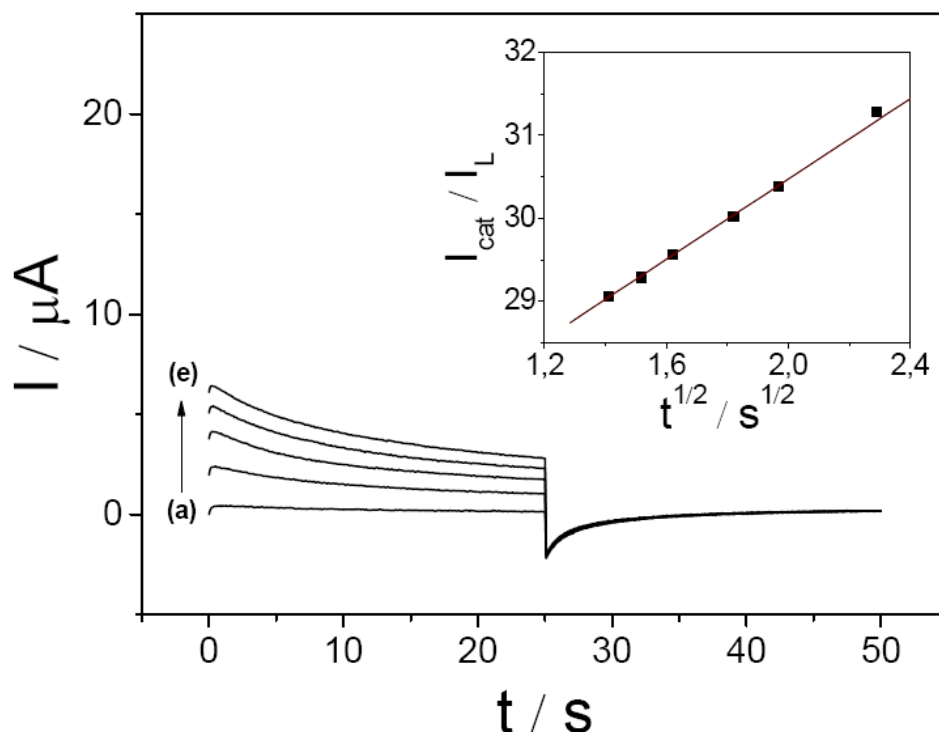


Figura IV.8. Cronoamperogramas do eletrodo modificado com a plataforma contendo o 3,5-DNB em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 para: (a) branco, (b) 50, (c) 100, (d) 150 e (e) 200 μmol L⁻¹ de NADH. Gráficos inserido: I_{cat} / i_L vs. $t^{1/2}$ para 50 μmol L⁻¹ de NADH.

Além disso, a constante cinética (k_{obs}) para a reação química entre o NADH e o sítios redox confinados na superfície da plataforma pode ser obtida por cronoamperometria de acordo com o método descrito na literatura [18] e mostrado na Equação III.4. A partir do gráfico inserido na Figura IV.8, o coeficiente angular foi encontrado como sendo 2,42 s^{-1/2} para 50 μmol L⁻¹ de NADH resultando em um valor de k_{obs} de 3,73 x 10⁴ L mol⁻¹ s⁻¹.

No sentido de extrair mais informações a partir dos cronoamperogramas mostrados na Figura IV.8, gráficos da carga (Q) em função de $t^{1/2}$ foram obtidos (Figura IV.9(A)). Para uma espécie eletroativa com coeficiente de difusão D (4,45 x 10⁻⁶ cm² s⁻¹ obtido empregando experimentos com EDR, item IV.2.6), a carga (Q) está relacionada com a reação eletroquímica descrita a partir da integração da

equação de Cottrell [19]:

$$Q = \frac{2nFAD^{1/2}Ct^{1/2}}{\pi^{1/2}} \quad (\text{Eq. IV.2})$$

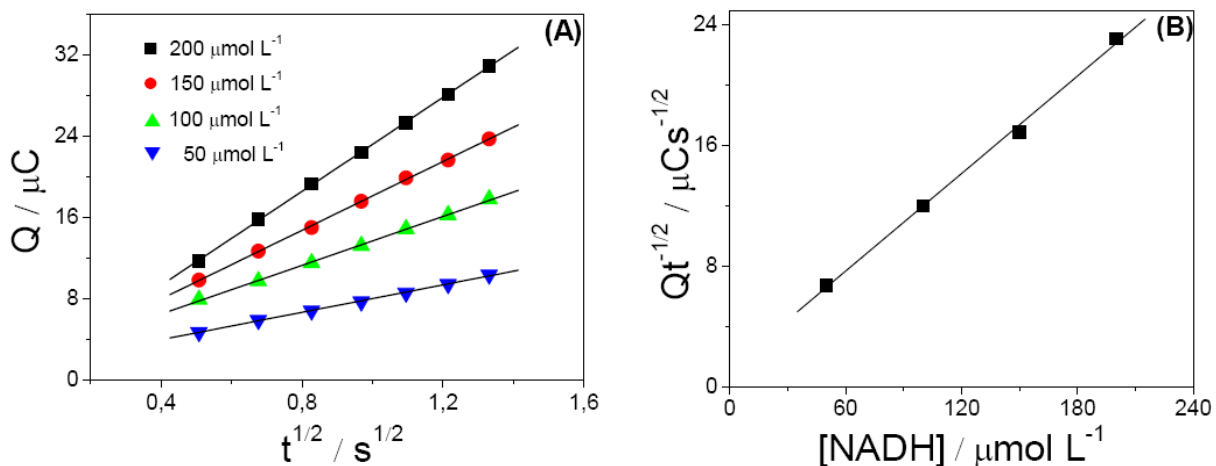


Figura IV.9. (A) Gráfico de Q vs $t^{1/2}$ utilizando as mesmas condições experimentais dos cronoamperogramas ilustrados na Figura IV.8 e (B) Gráfico de $Qt^{1/2}$ versus [NADH].

A partir dos coeficientes angulares das retas obtidas na Figura IV.9(A), foi construído um gráfico de $Qt^{1/2}$ em função da concentração do NADH (Figura IV.9(B)). Assim, empregando a Equação IV.2, foi obtido o valor n (número de elétrons) como sendo 1,88. O valor obtido sugere a participação de 2 elétrons envolvidos na eletrooxidação do NADH, de acordo com outros trabalhos já reportados [143,144].

IV.2.6 Estudos com eletrodo de disco rotatório

No sentido de estudar o mecanismo da reação e obter as constantes cinéticas que ocorrem na superfície da plataforma nanoestruturada, experimentos com o eletrodo de disco rotatório (EDR) foram realizados. A Figura IV.10 mostra as curvas de polarização para a oxidação do NADH empregando diferentes velocidades de rotação do eletrodo ω (rad s^{-1}). Como pode ser observado na

Figura IV.10, as correntes limites aumentam em função da velocidade de rotação do eletrodo.

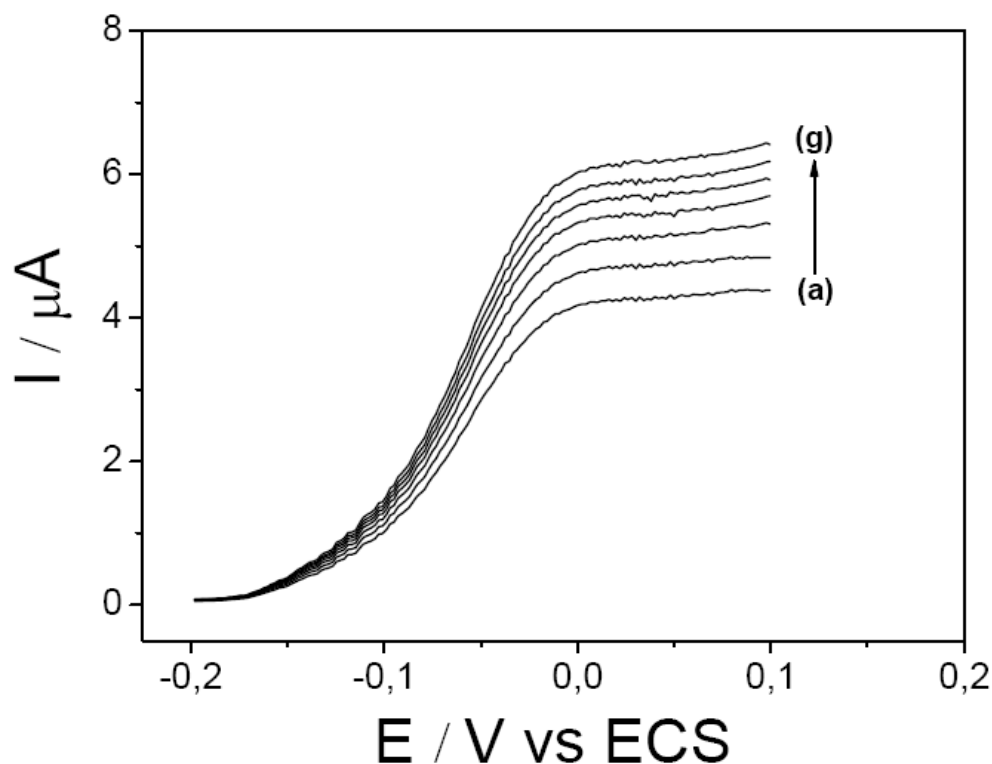


Figura IV.10. Curvas de polarização obtidas em diferentes velocidades de rotação do eletrodo para a oxidação eletrocatalítica de $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NADH na superfície da plataforma contendo o 3,5-DNB-ativado. Velocidades de rotação: (a) 5,20 ; (b) 7,67 ; (c) 10,89 ; (d) 16,40 ; (e) 23,72 ; (f) 34,00 e (g) 45,70 rad s^{-1} . Estudos feitos em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0, $v = 2 \text{ mV s}^{-1}$ e $\Gamma = 2,38 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^2$.

Após a obtenção das curvas de polarização foram obtidos gráficos de Levich (I versus $\omega^{1/2}$), ilustrado na Figura IV.11, para quatro diferentes concentrações de NADH, 100, 200, 300 e $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0. Na Figura IV.11 pode ser observada uma limitação cinética do processo, onde os valores de corrente possuem uma tendência direcionada à formação de um patamar praticamente constante com o aumento de $\omega^{1/2}$.

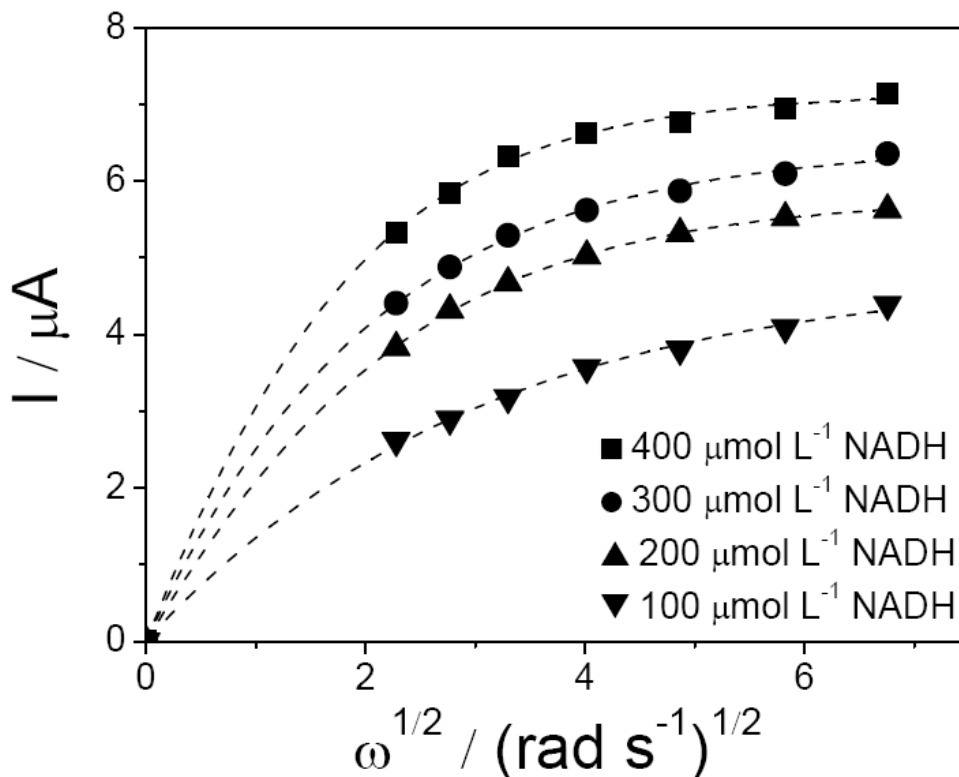


Figura IV.11. Gráficos de Levich para a resposta eletrocatalítica da plataforma nanoestruturada contendo o 3,5-DNB-ativado em diferentes concentrações de NADH. Estudos feitos em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0, $v = 2 \text{ mV s}^{-1}$ e $\Gamma = 2,38 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^2$.

Para possibilitar que os parâmetros cinéticos sejam extraídos dos gráficos de Levich, equações foram estabelecidas em trabalhos da literatura considerando as correntes limitadas pelo transporte de massa e pela cinética do processo [19]. A corrente limitada pelo transporte de massa ($I_{d(L)}$) depende da velocidade de rotação do eletrodo (ω) e da concentração de NADH no seio da solução $[\text{NADH}]^*$, de acordo com a equação de Levich representada abaixo:

$$I_{d(L)} = 0,620nFA[\text{NADH}]^*D^{2/3}\nu^{-1/6}\omega^{1/2} \quad (\text{Eq. IV.3})$$

sendo n o número de elétrons, F a constante de Faraday, ν a viscosidade cinemática e D o coeficiente de difusão. Os valores de n e ν foram empregados

como sendo 2 e 0,01 cm² s⁻¹ [19].

Para uma reação catalisada, a corrente limitada cineticamente (I_{kin}) é dada geralmente pela expressão abaixo:

$$I_{kin} = nFAk_{obs}\Gamma^*[NADH]^* \quad (\text{Eq. IV.4})$$

sendo Γ^* a cobertura total do par redox R-NO/R-NHOH presente na plataforma nanoestruturada. Assim, a corrente global (I) pode ser descrita pela contribuição da corrente limitada pelo transporte de massa e pela cinética do processo, conforme a equação abaixo:

$$I = I_{kin} + I_{d(L)} \quad (\text{Eq. IV.5})$$

Fazendo a inversão da Equação IV.5 e substituindo os valores correspondentes para I_{kin} e $I_{d(L)}$ obtém-se a equação de Koutecky-Levich (Equação IV.6):

$$\frac{1}{I} = \frac{1}{nFAk_{obs}\Gamma^*[NADH]^*} + \frac{1}{0,62nFAD^{2/3}\nu^{-1/6}[NADH]^*\omega^{1/2}} \quad (\text{Eq. IV.6})$$

A Figura IV.12 mostra o gráfico de Koutecky-Levich obtido a partir da Figura IV.11. Assim como previsto pela Equação IV.6, o gráfico I^{-1} versus $\omega^{-1/2}$ apresentou um comportamento linear nas condições experimentais apresentadas. Pelo coeficiente angular da curva, é possível calcular o número de elétrons envolvidos na reação (n) ou o coeficiente de difusão do NADH (D). Como o valor de n já foi obtido anteriormente (Item IV.2.5) o coeficiente angular foi empregado para se estimar o coeficiente de difusão do NADH. Dessa forma, foi encontrado um valor de 4,45×10⁻⁶ cm² s⁻¹ para o coeficiente de difusão do NADH em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ e pH 7,0. O valor obtido está de acordo com os resultados de Zare e Golabi [145], que encontram um valor de 3,24×10⁻⁶ cm² s⁻¹, utilizando as mesmas condições experimentais.

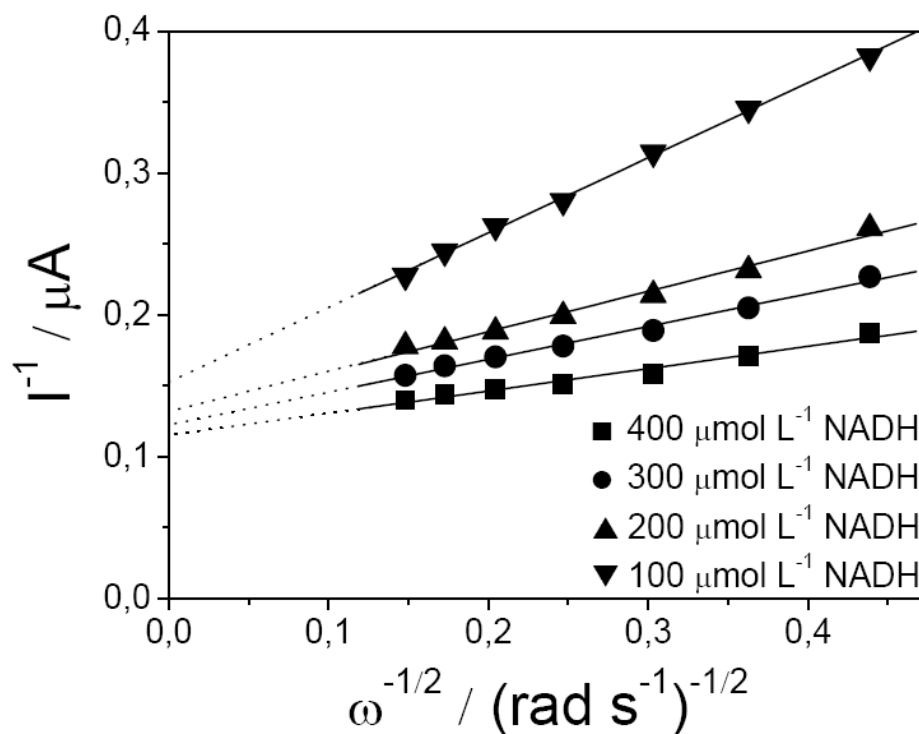


Figura IV.12. Gráfico de Koutecky-Levich obtidos a partir da Figura IV.11. Estudos feitos em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0, $\nu = 2 \text{ mV s}^{-1}$ e $\Gamma = 2,38 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^2$.

O coeficiente linear do gráfico de Koutecky-Levich permite a obtenção de um parâmetro extremamente importante no estudo de mecanismos de reações eletroquímicas, a constante cinética (k_{obs}). Assim, foram obtidas as constantes cinéticas para cada concentração de NADH estudada mas, ao invés de calcular uma média das constantes, os valores encontrados foram plotados em função da concentração do NADH (Figura IV.13(A)). Na mesma Figura pode ser observado que as constantes cinéticas diminuem com o aumento da concentração de NADH no seio da solução. Este tipo de comportamento já foi reportado em alguns trabalhos na literatura para a oxidação eletrocatalítica empregando eletrodos modificados com mediadores redox [31,146].

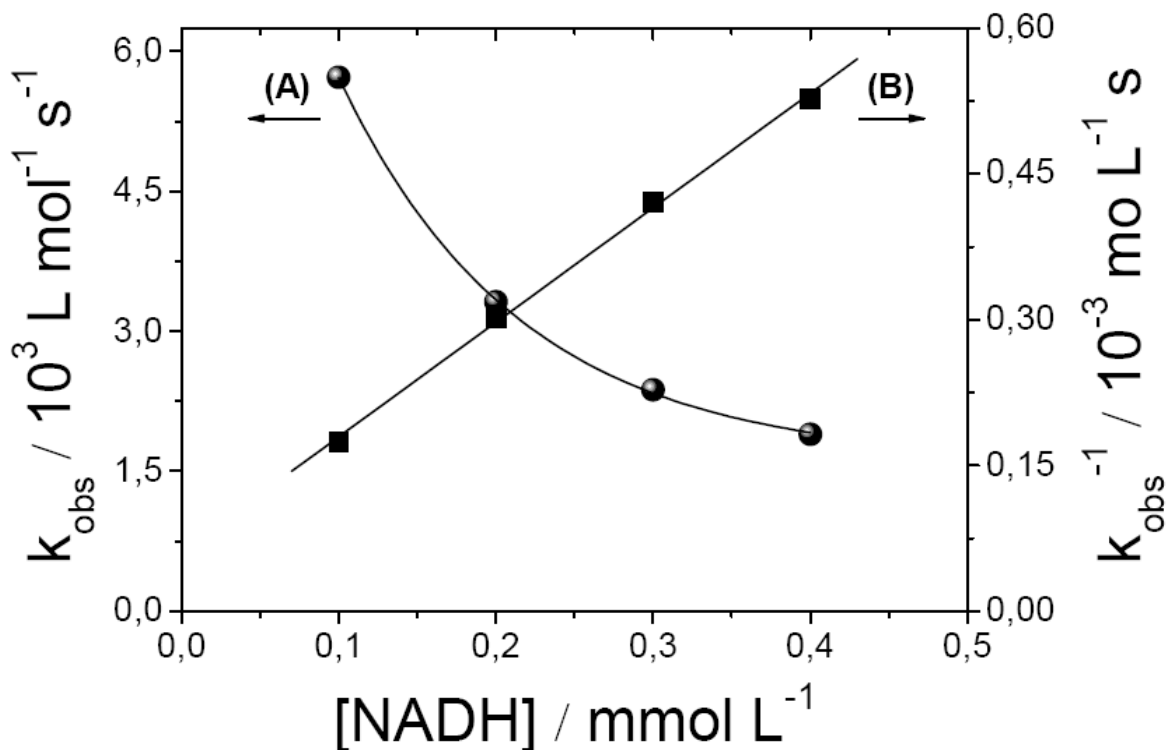
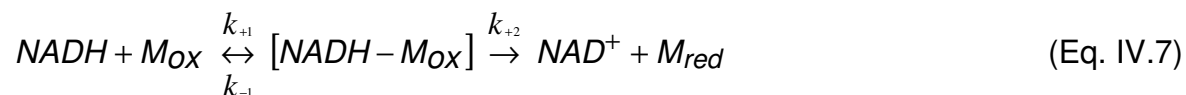


Figura IV.13. (A) Variação de k_{obs} versus [NADH] para o eletrodo modificado com a plataforma contendo o 3,5-DNB-ativado e (B) variação de k_{obs}^{-1} versus [NADH]. Estudos feitos em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0, $v = 2$ mV s⁻¹ e $\Gamma = 2,38 \times 10^{-10}$ mol cm².

De acordo com o trabalho de Gorton e col., o mecanismo da reação do NADH com alguns mediadores redox confinados na superfície de eletrodos ocorre através da formação de um complexo de transferência de carga [147]. Para uma reação catalítica que ocorre através da formação de um complexo de transferência de carga e seguindo o modelo proposto [147], temos:



Esta reação é similar ao modelo cinético enzimático de Michaelis-Menten, e através de uma combinação das constantes é possível relacionar a constante

cinética (k_{obs}) com o K_M [147]:

$$k_{obs} = \frac{k_{+2}}{K_M + [NADH]} \quad (\text{Eq. IV.8})$$

A inversão da Equação IV.8 resulta em:

$$\frac{1}{k_{obs}} = \frac{K_M}{k_{+2}} + \frac{[NADH]}{k_{+2}} \quad (\text{Eq. IV.9})$$

A Equação IV.9 mostra que um gráfico de $1/k_{obs}$ versus $[NADH]$ resulta em uma reta se um complexo de transferência de carga estiver envolvido na reação do NADH com o mediador redox. A Figura IV.13(B) mostra uma dependência linear do inverso da constante cinética em função da $[NADH]$ como previsto pela Equação IV.9, com uma equação $k_{obs}^{-1} = 6,17(\pm 0,6) \times 10^{-5} + 1,18(\pm 0,5)$ e com um coeficiente de correlação 0,9992 para $n = 3$, evidenciando fortemente que um complexo de transferência de carga está envolvido na reação entre o mediador redox e o NADH. A partir dos coeficientes angulares deste gráfico o valor de k_{+2} pode ser obtido e, através de uma extrapolação para uma concentração de NADH igual a zero o valor de K_M pode ser encontrado. Empregando a Equação IV.9, k_{obs} , k_{+2} e o K_M foram obtidos como sendo $1,62 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $0,85 \text{ s}^{-1}$ e $5,24 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ respectivamente. O valor obtido para a constante cinética está próximo do valor obtido nos estudos cronoamperométricos. A Tabela IV.2 mostra uma lista de parâmetros eletroquímicos e cinéticos usualmente obtidos empregando eletrodos modificados com mediadores redox para a eletrooxidação de NADH. Como pode ser observado na Tabela IV.2, a constante cinética obtida está entre uma das maiores já reportadas ($10^4 - 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Além disso, o valor da constante de Michaelis-Menten obtido está na faixa de valores usualmente encontrados e, o número de elétrons, também está de acordo com o esperado para a eletrooxidação do NADH (Equação I.2).

Tabela IV.2 Parâmetros eletroquímicos e cinéticos de alguns eletrodos modificados para eletrooxidação de NADH.

Referência	E°' (mV)	pH	Γ (mol cm ²)	k_{obs} (L mol ⁻¹ s ⁻¹)	K_M (mol L ⁻¹)	n
Lima e col. [31]	+100 vs. Ag/AgCl	7,0	$6,5 \times 10^{-10}$	$1,0 \times 10^4$	$2,7 \times 10^{-5}$	1,9
Vasanthan e Chen [148]	+200 vs. Ag/AgCl	7,0	$2,6 \times 10^{-10}$	$9,8 \times 10^3$	—	—
Antiochia e col. [149]	—	7,0	$9,7 \times 10^{-11}$	$2,0 \times 10^3$	—	—
Munteanu e col. [150]	+156 vs. Ag/AgCl	6,0	$2,7 \times 10^{-10}$	$3,0 \times 10^3$	$3,4 \times 10^{-4}$	2,0
Santos e col. [151]	-60 vs. ECS	7,0	$4,4 \times 10^{-9}$	$1,8 \times 10^3$	$2,7 \times 10^{-4}$	1,9
Mano e Kuhn [143]	-50 vs. Ag/AgCl	8,0	$1,2 \times 10^{-10}$	$5,0 \times 10^4$	—	1,9
Kubota e Gorton [152]	-220 vs. ECS	7,0	$6,8 \times 10^{-10}$	$8,2 \times 10^2$	$1,8 \times 10^{-3}$	2,0
Santos e col. [153]	-230 vs. ECS	7,0	$5,2 \times 10^{-9}$	$1,4 \times 10^3$	$2,1 \times 10^{-4}$	1,9
Nassef e col. [154]	+200 vs. Ag/AgCl	7,0	$4,2 \times 10^{-10}$	$1,1 \times 10^5$	$2,2 \times 10^{-5}$	2,0
Pereira e col. [144]	-140 vs. ECS	7,0	$5,7 \times 10^{-9}$	$5,5 \times 10^3$	$1,0 \times 10^{-4}$	1,9
Este trabalho	-50 vs. ECS	7,0	$2,4 \times 10^{-10}$	$1,6 \times 10^4$	$5,2 \times 10^{-5}$	1,9

Assim, as constantes cinéticas e parâmetros eletroquímicos que ocorrem na superfície da plataforma nanoestruturada foram obtidos. No entanto, antes de propor o mecanismo das reações que ocorrem na plataforma, foram levados em consideração resultados apresentados por Leskovac e Trivić [155] e alguns ensaios na presença de compostos fenólicos.

IV.2.7 O grupo R-NO/R-NHOH como mediador redox

O grupo nitroso têm sido amplamente estudado em reações de óxido-redução devido a sua reatividade ser semelhante à de aldeídos. Leskovac e Trivić [155] reportaram em seu trabalho que o nitrosobenzeno é rapidamente reduzido pelo NADH na ausência de oxigênio, em soluções tampão pH 7,0 ou fracamente alcalinas e ainda em metanol anidro. Os autores do trabalho propuseram, avaliando o efeito isotópico cinético, que ocorre uma transferência de hidreto direta do carbono 4 do anel da nicotinamida para o grupo nitroso. Esses resultados explicam em parte, porque ambos os sensores construídos neste trabalho não apresentaram eletrocatalise para a oxidação de catecol, dopamina, L-Dopa, epinefrina, ácido clorogênico e ácido caféico. Um aspecto interessante é que esses compostos fenólicos citados apresentam um mecanismo redox similar ao do par R-NO/R-NHOH envolvendo 2 elétrons e 2 prótons, no entanto, não foi encontrado nenhum trabalho científico mostrando que esses compostos possam atuar como doadores de íons hidreto. Sendo assim, o mecanismo de transferência de íons hidreto do analito para o mediador é plausível e provavelmente deve estar ocorrendo na superfície do eletrodo. Adicionalmente, além dos estudos realizados em solução [155], já foi reportado na literatura a atividade eletrocatalítica do par R-NO/R-NHOH na detecção de NADH [31]. Além do NADH, outra molécula que pode atuar como um doador de íons hidreto é o ácido ascórbico [156]. Lima e col, reportaram recentemente que o par redox R-NO/R-NHOH possui uma elevada atividade eletrocatalítica para a oxidação de ácido ascórbico, com uma constante cinética na ordem de $10^6 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [157]. Dessa forma, o ácido ascórbico é um interferente para as análises empregando o par R-NO/R-NHOH como mediador de

elétrons. No entanto, se necessário, o efeito do ácido ascórbico como interferente pode ser minimizado tratando a amostra com a enzima ascorbato oxidase, a qual apresenta uma alta seletividade para a oxidação de ácido ascórbico [158,159].

Levando em consideração os resultados apresentados, o par redox R-NO/R-NHOH apresenta uma certa seletividade para o NADH, tornando esse tipo de mediador um forte candidato para a configuração e aplicação de biossensores em matrizes que possam apresentar os compostos fenólicos citados como possíveis interferentes. Visando a construção de biossensor é necessário conhecer as etapas e/ou processos que ocorrem na superfície da plataforma antes da imobilização de alguma enzima, seja ela uma desidrogenase ou não. Sendo assim, empregando as constantes obtidas e as discussões apresentadas neste tópico foi possível estabelecer uma proposta para o mecanismo que ocorre na superfície da plataforma.

IV.2.8. Mecanismo da eletrooxidação de NADH na plataforma

A Figura IV.14 mostra uma proposta para as reações que ocorrem na superfície da plataforma. A reação inicia com a molécula do NADH se aproximando da superfície da plataforma por difusão com uma velocidade de $4,45 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0. Na interface da plataforma, a molécula de NADH forma um complexo de transferência de carga com o mediador redox. Após a formação desse complexo, a molécula de NADH transfere um íon hidreto a partir do carbono 4 do anel da nicotinamida para o nitrogênio do grupo nitroso do mediador. Essa reação, estudada com o EDR, apresentou uma constante cinética de $1,62 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e n aproximadamente 2 para o número de elétrons. Após a transferência de hidreto, o complexo se dissocia formando a espécie reduzida do mediador (R-NHOH) e NAD^+ , onde esta última, é liberada para a solução com uma velocidade de $0,85 \text{ s}^{-1}$. Aplicando-se 20 mV *versus* ECS (Item IV.2.5) a hidroxilamina é oxidada na superfície da plataforma formando o grupo nitroso. A comunicação eletrônica mediador-eletrodo foi determinada como sendo 50 s^{-1} e o processo redox do mediador envolvendo

$2e^-/2H^+$ foi confirmado utilizando a voltametria cíclica. Com a formação do grupo nitroso na plataforma o ciclo catalítico é regenerado permitindo que uma nova molécula de NADH se aproxime e reaja novamente, conforme ilustrado na Figura IV.14.

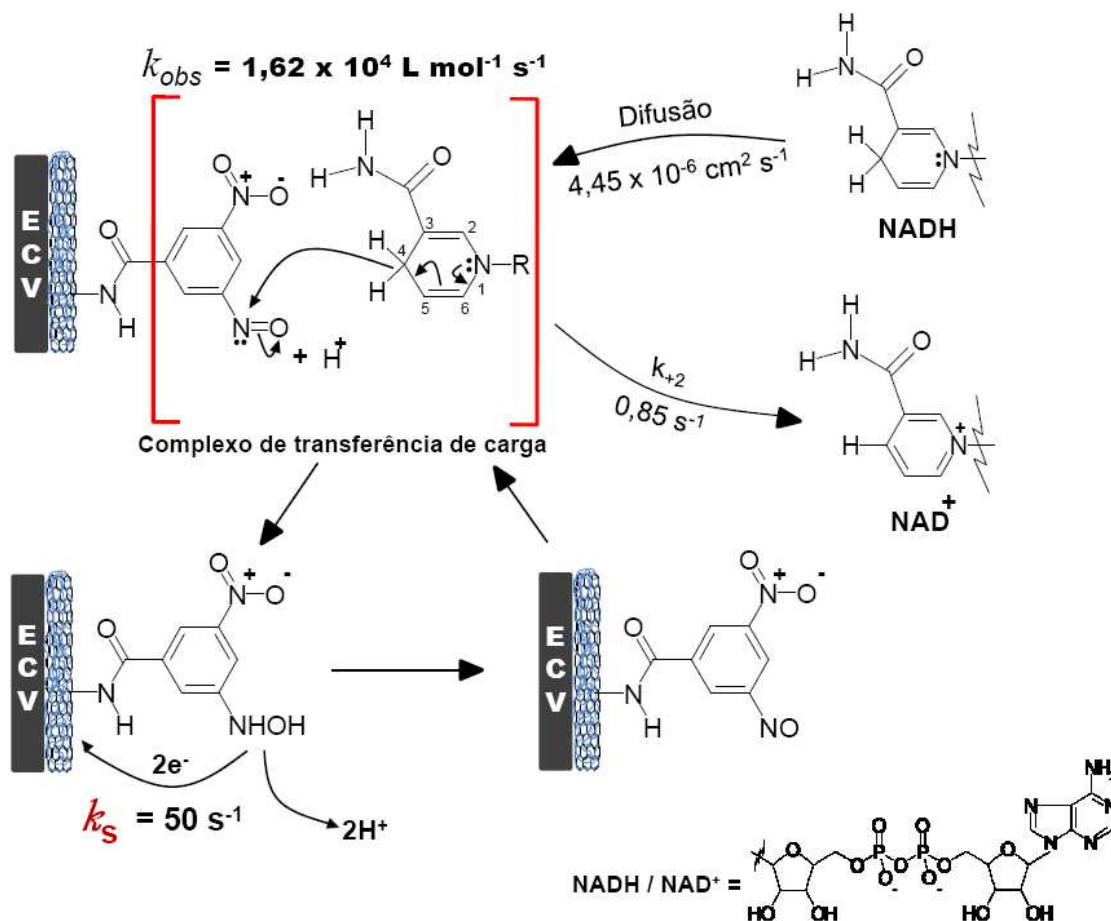


Figura IV.14. Proposta para as reações que ocorrem na superfície da plataforma na presença de NADH.

IV.2.9 Caracterização analítica

Para efetuar a caracterização analítica foram realizados experimentos amperométricos monitorando a corrente catalítica após adições sucessivas de NADH. Sendo assim, a influência de alguns parâmetros foram estudados, como: potencial aplicado, pH da solução, tipo e concentração do eletrólito. A Tabela IV.3

mostra as melhores condições obtidas para os parâmetros estudados.

Tabela IV.3. Caracterização analítica do sensor destinado a detecção de NADH.

Parâmetros estudados	Faixa / tipo de estudo	Melhor resposta*
Potencial aplicado	-100 até 0 mV	-30 mV
pH	5,0 até 8,0	7,0
Tipo de eletrólito	PIPES, HEPES, TRIS, McIlvaine e PBS	PBS
[Eletrólito] mol L ⁻¹	0,01 até 0,2	0,1

*Obtida pela sensibilidade das curvas após adições sucessivas de NADH.

Inicialmente foi realizado um estudo do potencial aplicado no eletrodo de trabalho para as análises de NADH. As respostas do sensor aumentaram até -30 mV e então permaneceram praticamente constantes devido as limitações que surgem do processo de transferência de massa. Assim, o potencial de 0 mV vs. ECS foi selecionado para os estudos posteriores.

O efeito do pH sobre a resposta do sensor também foi avaliado na faixa de 5,0 até 8,0. Em pH 7,0 a corrente atingiu o valor máximo e diminuiu para pHs maiores. Dessa forma, o pH 7,0 foi selecionado nos estudos posteriores.

No estudo do tipo de eletrólito suporte a resposta do sensor foi similar ao do sensor destinado à detecção de Cys (Figura III.13), a única diferença obtida foi que a resposta para o tampão PIPES foi superior ao do tampão HEPES. Assim, a solução tampão fosfato foi selecionada para os estudos subsequentes.

Finalmente, as respostas obtidas nas medidas cronoamperométricas em diferentes concentrações da solução tampão fosfato aumentaram até 0,1 mol L⁻¹. Para valores superiores a resposta permaneceu praticamente constante indicando que existe uma quantidade de carga suficiente para manter a eletroneutralidade do eletrodo. Nesse sentido, a concentração de eletrólito de 0,1 mol L⁻¹ foi selecionada e a curva analítica foi construída empregando os resultados

mostrados na Tabela IV.3.

A Figura IV.15 ilustra a resposta cronoamperométrica do sensor em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0, após sucessivas adições de NADH, em função de cada etapa (A – C) da construção do sensor.

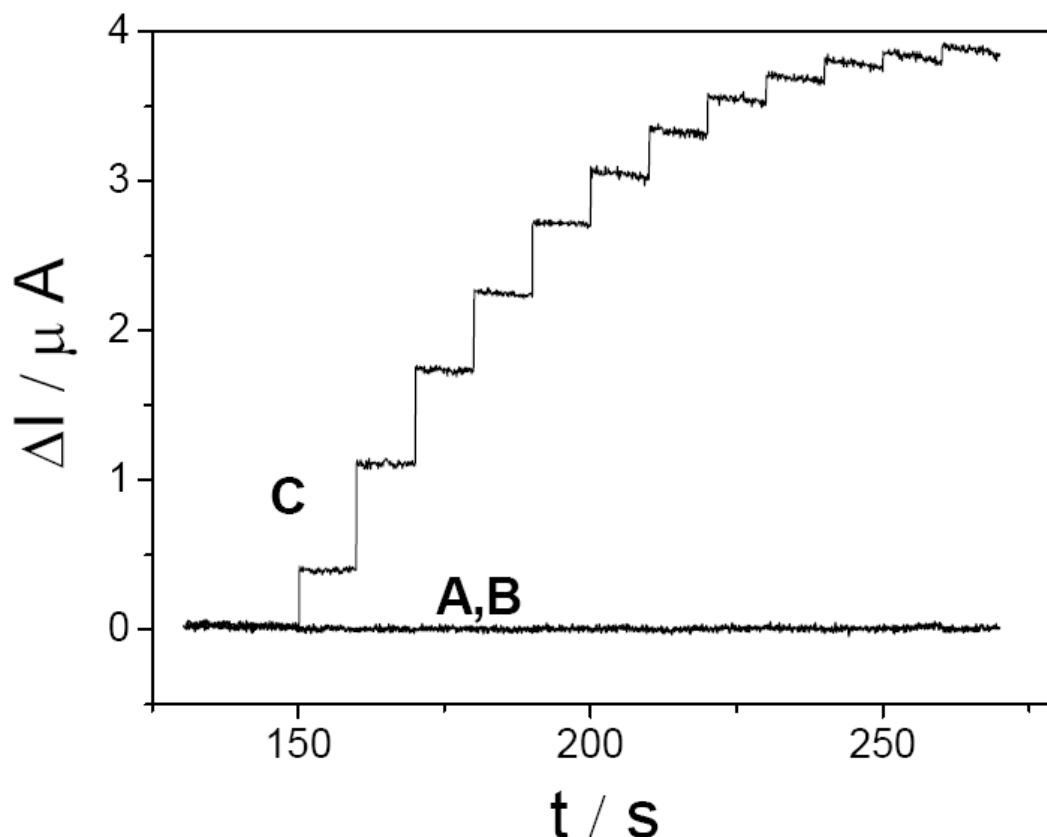


Figura IV.15. Resposta cronoamperométrica observada após adições sucessivas de uma solução estoque de NADH em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 para: (A) ECV, (B) +MWCNTs/PEI, (C) +3,5-DNB-ativado.

Como pode ser observado na Figura IV.15(C), somente quando a plataforma está modificada com o mediador redox é possível observar uma resposta cronoamperométrica com o potencial aplicado de -30 mV vs. ECS. Os resultados obtidos aqui estão em concordância com os voltamogramas cíclicos mostrados na Figura IV.7, mostrando que o efeito eletrocatalítico em baixos sobrepotenciais é atribuído devido a presença do mediador redox ativado na

superfície da plataforma.

Na Figura IV.16, pode ser observado uma faixa linear de resposta de 4,0 até 42,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, podendo ser expressa com a seguinte equação:

$$\Delta I(\mu\text{A}) = 0,11(\pm 0,14) + 0,07(\pm 0,01)[\text{NADH}] (\mu\text{mol L}^{-1}) \quad (\text{Eq. III.10})$$

com um coeficiente de correlação de 0,998 ($n = 5$). O sensor apresentou limite de detecção e quantificação de 1,2 e 3,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ respectivamente, seguindo as recomendações da IUPAC [123]. Além disso, o tempo de resposta do sensor foi de 0,12 s.

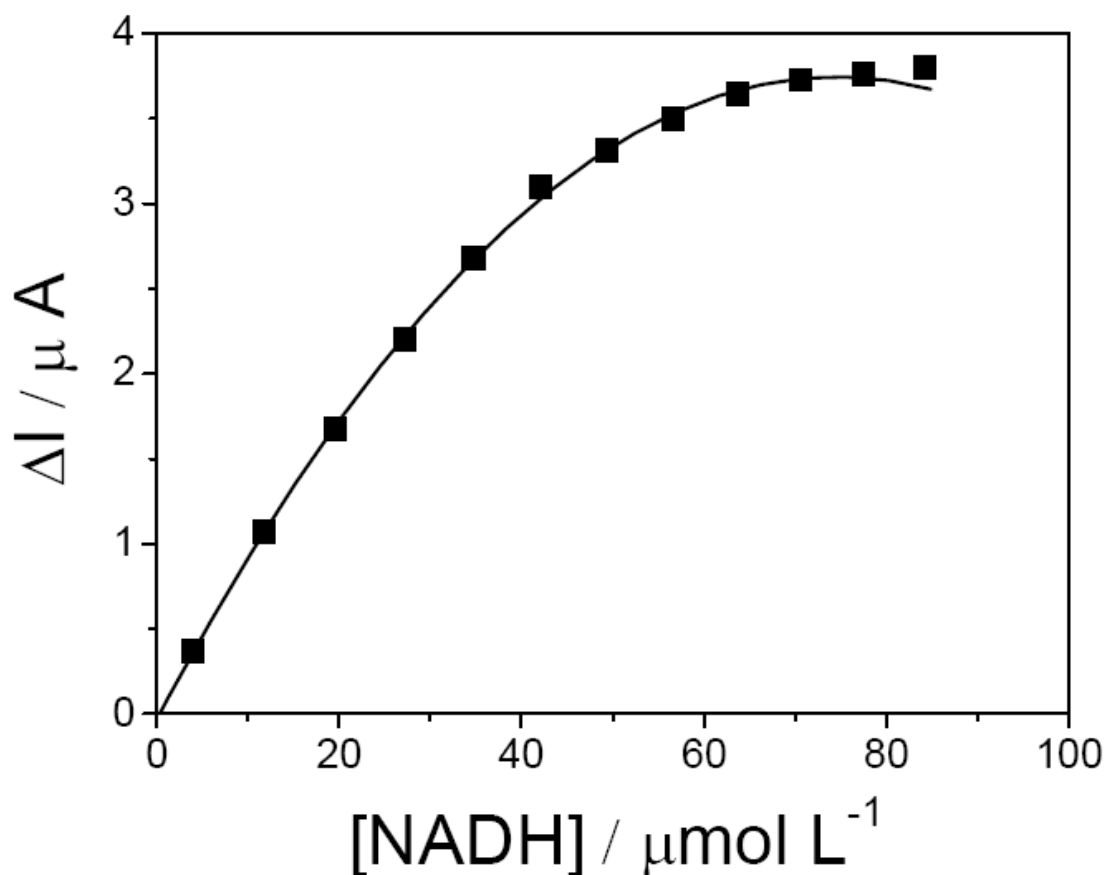


Figura. IV.16. Curva analítica.

A Tabela IV.4 mostra uma série de trabalhos envolvendo mediadores redox para a determinação de NADH.

Tabela IV.4 Métodos eletroquímicos, condições experimentais e parâmetros analíticos para a determinação de NADH.

Referências	Método	$E_{\text{apl.}}$ (mV)	Eletrólito de suporte	L.D. ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Sensibilidade (nA L μmol^{-1})
Banks e Compton [160]	Cronoamperometria	400 vs. ECS	PBS 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,4	0,965	54,6
Deng e col. [161]	Cronoamperometria	400 vs. ECS	PBS 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,0	0,05	2,25
Zhang e col. [162]	Cronoamperometria	400 vs. Ag/AgCl	PBS 0,05 mol L ⁻¹ pH 7,4	3,0	61,0
Wu e col. [163]	Cronoamperometria	600 vs. ECS	PBS 0,2 mol L ⁻¹ pH 7,0	–	5,6
Prieto-Simón e Fàbregas [164]	Cronoamperometria	650 vs. ECS	PBS 0,05 mol L ⁻¹ pH 6,5	–	21,1
Behera e col. [165]	Cronoamperometria	200 vs. ECS	PBS 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,2	0,1	1,982
Nassef e col. [154]	Cronoamperometria	150 vs. Ag/AgCl	PBS 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,0	0,15	14,0

Zhu e col. [108]	Cronoamperomeria	- 100 vs. Ag/AgCl	PBS 0,05 mol L ⁻¹ pH 6,85	0,05	0,52
Zeng e col. [166]	Cronoamperometria	0 vs. ECS	PBS 0,06 mol L ⁻¹ pH 7,0	0,5	–
Radoi e col. [167]	FIA - amperometria	150 vs. Ag/AgCl	PBS 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,0	1,2	–
Raj e Chakraborty [168]	Cronoamperometria	- 50 vs. ECS	PBS 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,0	0,1	1,65
Agüí e col. [169]	Cronoamperometria	300 vs. Ag/AgCl	PBS 0,05 mol L ⁻¹ pH 7,0	0,17	3,1
Jena e Raj [170]	Cronoamperometria	- 5 vs. Ag/AgCl	PBS 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,2	0,005	56
Maroneze e col. [171]	Cronoamperometria	- 120 vs. ECS	PBS 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,5	8,0	0,58
Radoi e col. [172]	Fia - amperometria	50 vs. Ag/AgCl	TRIS 0,1 mol L ⁻¹ pH 8,5	0,94	0,27

Pereira e col. [144]	Cronoamperometria	- 50 vs. ECS	PBS 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,0	7,10	20
Lima e col. [31]	Cronoamperometria	100 vs. Ag/AgCl	TRIS 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,0	0,25	500
Silva e col. [173]	Cronoamperometria	100 vs. Ag/AgCl	PBS 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,0	0,1	220
Yang e Liu [29]	Cronoamperometria	0 vs. Ag/AgCl	PBS 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,5	1,0	9,88
Zhang e Gorski [174]	Cronoamperometria	-100 vs. Ag/AgCl	PBS 0,05 mol L ⁻¹ pH 7,4	0,5	10,3
Wang e col. [175]	Cronoamperometria	300 vs. ECS	PBS 0,05 mol L ⁻¹ pH 6,8	0,06	84,4
Lawrence e Wang [176]	Cronoamperometria	-200 vs. Ag/AgCl	PBS 0,05 mol L ⁻¹ pH 7,4	15	0,975
Huang e col. [177]	Cronoamperometria	-100 vs. Ag/AgCl	PBS 0,5 mol L ⁻¹ pH 7,0	1,0	4,70

Tu e col [178]	Cronoamperometria	250 vs. Ag/AgCl	PBS 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,0	0,0064	11,5
Doaga e col. [179]	Cronoamperometria	-50 vs. Ag/AgCl	PBS 0,05 mol L ⁻¹ pH 7,0	50	6,1
Arvinte e col. [180]	Cronoamperometria	-50 vs. Ag/AgCl	PBS 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,5	6,0	0,46
Liu e col. [181]	Cronoamperometria	450 vs. Ag/AgCl	PBS 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,0	0,02	10
Arvinte e col. [182]	Cronoamperometria	350 vs. Ag/AgCl	PBS 0,2 mol L ⁻¹ pH 7,0	11	0,25
Este trabalho	Cronoamperometria	- 30 vs.ECS	PBS 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,0	1,2	70

FIA: análise por injeção em fluxo. (Ag/AgCl = ECS - 45 mV).

Como pode ser observado na Tabela IV.4, a sensibilidade da curva analítica obtida está entre as maiores já reportadas. Um dos aspectos que merece destaque se refere ao potencial de oxidação do NADH. De acordo com a Tabela IV.4, o presente trabalho apresenta um potencial de detecção para o NADH que está entre os mais baixos já reportados, resultando assim em uma análise que pode minimizar possíveis interferentes.

IV.2.10 Estabilidade do sensor

A estabilidade do eletrodos modificados foi avaliada em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 fazendo adições sucessiva de NADH e monitorando a corrente (ΔI) por cronoamperometria. Os eletrodos modificados, armazenados em temperatura ambiente, apresentaram estabilidade de aproximadamente 3 semanas.

A repetibilidade das medidas e da construção das interfaces também foram avaliadas. Depois de 8 medidas sucessivas, a resposta cronoamperométrica do sensor para 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de NADH apresentou um desvio padrão relativo (D.P.R.) 4,7 %. Além disso, quando a plataforma foi preparada 8 vezes da mesma forma e avaliada em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 o D.P.R. obtido foi menor que 5,0 %, indicando uma boa repetibilidade.

IV.2.11 Conclusões

O mediador redox 3,5-DNB (ácido 3,5-dinitrobenzoico) foi imobilizado com sucesso sobre uma plataforma nanoestruturada formada a partir de uma dispersão de MWCNTs em PEI. Os grupos amino do polímero permitiram que o mediador, na presença de EDC e NHS, fosse imobilizado na superfície da plataforma. As etapas de montagem do sensor foram caracterizadas por MEV e também através de ensaios eletroquímicos. Empregando a técnica de voltametria cíclica, foi possível obter parâmetros cinéticos como o n , α , k_s e o número de prótons envolvidos no processo redox do mediador. Além disso, a voltametria cíclica possibilitou caracterizar a eletrooxidação do NADH em função de cada etapa da

construção do sensor. Já os estudos cronoamperométricos forneceram uma rota experimental rápida para extrair a constante cinética (k_{obs}) da reação química e ainda calcular o número de elétrons envolvidos na reação entre o NADH e o 3,5-DNB-ativado. Empregando o EDR foi possível identificar que a reação entre o mediador e o NADH ocorre a través da formação de um complexo de transferência de carga, de maneira análoga ao modelo cinético de Michelis-Menten. Além do mais, k_{obs} , K_M , k_{+2} e o coeficiente de difusão do NADH em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ e pH 7,0 foram também obtidos através dos estudos com o EDR. Vale a pena destacar que os estudos foram realizados aplicando baixos sobrepotenciais, cuja característica é altamente importante quando se visa a construção de biossensores. Por fim, a curva analítica, obtida sob condições de pH neutro, apresentou boa sensibilidade quando comparada com trabalhos já reportados (Tabela IV.4).

CAPÍTULO V



CONCLUSÕES GERAIS

V.1 Conclusões gerais

Este trabalho demonstra a construção de plataformas nanoestruturadas para a detecção de Cys e NADH. Como material base para a construção foram empregados nanotubos de carbono de paredes múltiplas funcionalizados com PEI. As estratégias adotadas permitiram que os mediadores redox 3,5-DNB e DTNB fossem imobilizados nas diferentes plataformas construídas. O 3,5-DNB foi empregado na detecção e estudo mecanístico do NADH enquanto que o DTNB foi utilizado para a quantificação de Cys.

As micrografias do MEV foram úteis e possibilitaram identificar o processo de funcionalização da plataforma. Além disso, estudos eletroquímicos complementares possibilitaram identificar as porções eletroativas no processo de montagem da plataforma.

Após a montagem da plataforma, ambos os mediadores redox empregados foram facilmente ativados utilizando a voltametria cíclica. Após a ativação, o par redox R-NO/R-NHOH apresentou boa definição e ainda um E^0 em um sobrepotencial baixo.

Empregando a voltametria cíclica foi possível obter alguns parâmetros cinéticos como o n , α , k_s e n_p referentes ao processo redox dos mediadores. Os valores de n , α e n_p estão de acordo com trabalhos já reportados referentes ao processo redox nitroso-hidroxilamina. Já a k_s , apresentou valores superiores à muitos trabalhos já reportados, na faixa de $43 - 50 \text{ s}^{-1}$, indicando uma comunicação eletrônica rápida mediador-eletrodo.

Além disso, a voltametria cíclica foi empregada com sucesso para identificar a contribuição de cada material no processo de montagem da plataforma nanoestruturada. Esses experimentos possibilitaram visualizar claramente o decréscimo do sobrepotencial de oxidação dos analitos estudados.

Os estudos cronoamperométricos foram empregados aplicando baixos sobrepotenciais para calcular a constante cinética (k_{obs}) para ambos os sensores, o coeficiente de difusão da cisteína e o valor de n da reação mediador-NADH. As

constantes obtidas ($10^3 - 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) estão entre as maiores já reportadas e os parâmetros D e n apresentaram valores próximos de trabalhos já publicados.

O ácido 3,5-dinitrobenzoico foi utilizado com sucesso, pela primeira vez, como mediador redox para detectar o NADH. Adicionalmente, estudos cinéticos foram obtidos utilizando o EDR e a cronoamperometria. Experimentos empregando o EDR forneceram uma quantidade suficiente de parâmetros cinéticos que possibilitaram propor o mecanismo que ocorre na superfície da plataforma quando o NADH é adicionado. A constante cinética (k_{obs}) foi de $1,62 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, próximo do valor obtido pelos estudos cronoamperométricos. Além disso, outras constantes puderam ser calculadas e forneceram indícios significativos que o processo na interface da plataforma ocorre de maneira similar à cinética enzimática de Michaelis-Menten.

As curvas analíticas apresentaram sensibilidade de 21 e 70 nA L μmol^{-1} para a detecção de Cys e NADH, respectivamente. Já os limites de detecção dos sensores construídos estão na faixa de 1,2 – 2,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Além disso, os sensores construídos apresentaram estabilidade de aproximadamente 3 semanas e a repetibilidade do processo de construção para ambos os sensores apresentou um desvio padrão relativo próximo de 5 %. O sensor destinado a detecção de Cys foi aplicado em amostras reais e apresentou resultados estatisticamente iguais ao do método comparativo.

CAPÍTULO VI



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VI.1 Referências bibliográficas

- [1] Y. Tsybovsky, H. Donato, N. I. Krupenko, C. Davies, S. A. Krupenko, **Biochem.** 46 (2007) 2917-2929.
- [2] M. Naim, U. Zehavi, I. Zuker, R. L. Roussef, S. Nagy, **Sulfur Compounds in Foods**, 1994, cap 7, pp. 80-89.
- [3] S. A. Lipton, Y. Choi, H. Takahashi, D. Zhang, W. Li, A. Godzik, L. A. Bankston, **Trends Neurosci.** 25 (2002) 474 – 480.
- [4] H. B. White, III. **Evolution of coenzymes and the origin of pyridine nucleotides**, Academic Press; New York, 1982.
- [5] F. H. Westheimer, H. F. Fischer, E. E. Conn, B. Vennesland, **J. Am. Chem. Soc.** 73 (1951) 2403 – 2408.
- [6] L. Gorton, E. Domínguez, **Rev. Mol. Biotechnol.** 82 (2002) 371 – 392.
- [7] D. A. M. Zaia, K. C. L. Ribas, C. T. B. V. Zaia, **Talanta** 50 (1999) 1003 – 1010.
- [8] K. Rootwelt, **Scan. J. Clin. Lab. Invest.** 19 (1967) 325 – 330.
- [9] A. Talwalkar, K. Kailasapathy, J. Hourigan, P. Peiris, R. Arumugaswamy, **J. Microbiol. Meth.** 52 (2003) 333 – 339.
- [10] K. Kuśmierk, E. Bald, **Food Chem.** 106 (2008) 340 – 344.
- [11] P. Capitan, T. Malmezat, D. Breuillé, C. Obled, **J. Chromat. B** 732 (1999) 127 – 135.
- [12] K. Myiatake, H. Sakubara, S. Kitaoka, **Agric. Biol. Chem.** 51 (1987) 253 – 255.
- [13] W. J. Blaedel, R. A. Jenkins, **Anal. Chem.** 48 (1976) 1240 – 1247.
- [14] M. A. Hayes, W. G. Kuhr, **Anal. Chem.** 71 (1999) 1720 – 1727.
- [15] M. Musameh, J. Wang, A. Merkoci, Y. Lin, **Electrochem. Commun.** 4 (2002) 743 – 746.
- [16] A. Damian, S. Omanovic, **Langmuir** 23 (2007) 3162 – 3171.
- [17] C. P. Andrieux, P. Hapiot, J. Savéant, **Chem. Rev.** 90 (1990) 723 – 738.
- [18] Z. Galus, **Fundamentals of Electrochemical Analysis**, Ellis Horwood Press, New York, 1976.

- [19] A. J. Bard, L. Falkner, **Electrochemical methods – Fundamental and Applications**, 2nd, ed. Wiley, New York, 2001.
- [20] J. Savéant, **Chem. Rev.** 108 (2008) 2348 – 2378.
- [21] W. T. Tan, A. M. Bond, S. W. Ngooi, E. B. Lim, J. K. Goh, **Anal. Chim. Acta** 491 (2003) 181 – 191.
- [22] E. V. Ivanova, V. S. Sergeeva, J. Oni, C. Kurzawa, A. D. Ryabov, W. Schuhmann, **Bioelectrochem.** 60 (2003) 65 – 71.
- [23] L. Stoica, A. Lindgren-Sjolander, T. Ruzgas, L. Gorton, **Anal. Chem.** 76 (2004) 4690 – 4696.
- [24] M. M. Ardakani, P. Rahimi, P. E. Karami, H. R. Zare, H. Naeimi, **Sens. Act. B** 123 (2007) 763 – 768.
- [25] S. Serban, N. E. Murr, **Biosens. Bioelectron.** 20 (2004) 161 – 166.
- [26] A. Salimi, R. Hallaj, M. K. Amini, **Anal. Chim. Acta** 534 (2005) 335 – 342.
- [27] B. K. Jena, C. R. Raj, **Anal. Chem.** 78 (2006) 6332 – 6339.
- [28] H. Heli, M. Hajjizadeh, A. Jabbari, A. A. Moosavi-Movahedi, **Anal. Chem.** 388 (2009) 81 – 90.
- [29] D. Yang, H. Liu, **Biosens. Bioelectron.** 25 (2009) 733 – 738.
- [30] A. A. Ensafi, S. Behyan, **Sens. Act. B** 122 (2007) 282 – 288.
- [31] P. R. Lima, W. J. R. Santos, A. B. Oliveira, M. O. F. Goulart, L. T. Kubota, **Biosens. Bioelectron.** 24 (2008) 448 – 454.
- [32] E. J. Calvo, R. Etchenique, C. Danilowicz, L. Diaz, **Anal. Chem.** 68 (1996) 4186 – 4193.
- [33] J. C. Lenox, R. W. Murray, **J. Electroanal. Chem.** 78 (1977) 395 – 401.
- [34] E. Fitzer, K. Geigl, W. Huttner, R. Weiss, **Carbon** 18 (1980) 389 – 393.
- [35] C. Barbero, J. J. Silber, L. Sereno, **J. Electroanal. Chem.** 248 (1988) 321 – 340.
- [36] L. Otero, N. Vettorazzi, C. Barbero, M. C. Miras, J. J. Silber, **J. Electroanal. Chem.** 350 (1993) 251 – 265.
- [37] M. Noel, P. N. Anantharaman, **Surf. Coat. Technol.** 28 (1986) 161 – 179.
- [38] D. C. Alsmeyer, R. L. McCreery, **Anal. Chem.** 64 (1992) 1528 – 1533.

- [39] F. Regisser, M. A. Lavoie, G. Y. Champagne, D. Belanger, **J. Electroanal. Chem.** 415 (1996) 47 – 54.
- [40] P. A. Millner, H. C. W. Hays, A. Vakurov, N. A. Pselintsev, M. M. Billah, M. A. Rodgers, **Sem. Cell. Dev. Biol.** 20 (2009) 34 – 40.
- [41] S. Minnikanti, P. Skeath, N. Peixoto, **Carbon** 47 (2009) 884 – 893.
- [42] I. I. Suni, **Trends Anal. Chem.** 27 (2008) 604 – 611.
- [43] J. Wang, **Electroanal.** 17 (2005) 7 – 14.
- [44] C. Q. Sun, **J. Prog. Solid State Chem.** 35 (2007) 1 – 159.
- [45] W. W. Gerberich, W. M. Mook, C. R. Perrey, C. B. Carter, M. I. Baskes, R. Mukherjee, **J. Mech. Phys. Solids** 51 (2003) 979 – 992.
- [46] C. Q. Chen, Y. Shi, Y. S. Zhang, J. Zhu, Y. J. Yan, **Phys. Rev. Lett.** 96 (2006) 075505-1 – 075505-4.
- [47] A. B. Dalton, S. Collins, E. Munoz, J. M. Razal, V. H. Ebron, J. P. Ferraris, **Nature** 423 (2003) 703.
- [48] R. H. Baughman, **Science** 300 (2003) 269 – 269.
- [49] R. L. McCreery, **Carbon electrodes: Structural effects on electron transfer kinetics in electroanalytical chemistry**. vol. 17, Dekker, New York, 1991.
- [50] R. L. McCreery, **Chem. Rev.** 108 (2008) 2646 – 2687.
- [51] S. Iijima, **Nature** 354 (1991) 56 – 58.
- [52] R. R. Moore, C. E. Banks, R. G. Compton, **Anal. Chem.** 76 (2004) 2677 – 2682.
- [53] J. Koehne, J. Li, A. M. Cassell, H. Chen, Q. Ye, H. T. Ng. Q. Ye, W. Fan, J. Han, M. Meyyappan, **J. Mat. Chem.** 14 (2004) 676 – 684.
- [54] H. Dai, **Carbon Nanotubes**. Springer, Berlin, 2001.
- [55] H. Dai, **Acc. Chem. Res.** 35 (2002) 1035 – 1044.
- [56] R. C. Alkire, D. M. Kolb, J. Lipkowski, P. N. Ross, **Chemically modified electrodes**. vol. 11, Wiley-VCH, Weinheim, 2009.
- [57] M. Moniruzzaman, K. I. Winey, **Macromol.** 39 (2006) 5194 – 5205.
- [58] J. W. G. Wildoer, L. C. Venema, A. G. Rinzler, R. E. Smalley, C. Dekker, **Nature** 391 (1998) 59 – 62.
- [59] T. W. Odom, J. Huang, P. Kim, C. M. Lieber, **Nature** 391 (1998) 62 – 64.

- [60] B. Q. Wei, R. Vajtai, P. M. Ajayan, **Appl. Phys. Lett.** 79 (2001) 1172 - 1174.
- [61] S. Niyogi, A. Hamon, H. Hu, B. Zhao, P. Bhowmik, R. Sen, M. E. Itkis, R. C. Haddon, **Acc. Chem. Res.** 35 (2002) 1105 – 1113.
- [62] R. Taylor, D. R. M. Walton, **Nature** 363 (1993) 685 – 693.
- [63] Y. Chen, R. C. Haddon, S. Fang, A. M. Rao, P. C. Eklund, W. H. Lee, E. C. Dickey, E. A. Grulke, J. C. Pendergrass, A. Chavan, B. E. Haley, R. E. Smalley, **J. Mat. Res.** 13 (1998) 2423 – 2431.
- [64] J. Zhang, H. Zou, Q. Qing, Y. Yang, Q. Li, Z. Liu, X. Guo, Z. Du, **J. Phys. Chem. B** 107 (2003) 3712 – 3718.
- [65] C. E. Banks, R. G. Compton, **Anal. Sci.** 21 (2005) 1263 – 1268.
- [66] X. Ji, C. E. Banks, W. Xi, S. W. Wilkins, R. G. Compton, **J. Phys. Chem. Lett.** **B** 110 (2006) 22306 – 22309.
- [67] C. E. Banks, R. G. Compton, **Analyst** 131 (2006) 15 – 21.
- [68] S. Banerjee, T. Hemraj-Benny, S. S. Wong, **Adv. Mater.** 17 (2005) 17 – 29.
- [69] G. Zhang, S. Sun, D. Yang, J. Dolelet, E. Sacher, **Carbon** 46 (2008) 196 - 205.
- [70] Q. Shi, D. Yang, Y. Su, J. Li, Z. Jiang, Y. Jiang, W. Yuan, **J. Nanopart. Res.** 9 (2007) 1205 – 1210.
- [71] Z. Chen, W. Thiel, A. Hirsch, **ChemPhysChem** 1 (2003) 93 – 97.
- [72] J. L. Bahr, J. M. Tour, **Chem. Mater.** 13 (2001) 3823 – 3824.
- [73] V. N. Khabashesku, W. E. Billups, J. L. Margrave, **Acc. Chem. Res.** 35 (2002) 1087 – 1095.
- [74] D. Tasis, N. Tagmatarchis, A. Bianco, M. Prato, **Chem. Rev.** 106 (2006) 1105 – 1136.
- [75] J. Zhang, L. Gao, **Mat. Lett.** 61 (2007) 3571 – 3574.
- [76] S. Marković, S. Jovanović, D. Kleut, N. Romcević, V. Jokanović, V. Trajković, B. Todorović-Marković, **Appl. Surf. Sci.** 255 (2009) 6359 – 6366.
- [77] K. Park, D. Jung, S. E. Shim, **Int. J. Multiphase Flow** 35 (2009) 525 – 532.
- [78] W. Cheng, G. Jin, Y. Zhang, **Sens. Act. B** 30 (2006) 40 – 46.
- [79] M. Zheng, A. Jagota, E. D. Semke, B. A. Diner, R. S. Mclean, S. R. Lustig, R. E. Richardson, N. G. Tassi, **Nature** 2 (2003) 338 – 342.

- [80] J. Zhang, Q. Wang, L. Wang, A. Wang, **Carbon** 45 (2007) 1911 – 1920.
- [81] M. Shim, N. W. S. Kam, R. J. Chen, Y. Li, H. Dai, **Nano Lett.** 2 (2002) 285 – 288.
- [82] F. Westerlund, T. Bjørnholm, **Curr. Opin. Cell. & Interface Sci.** 14 (2009) 126 – 134.
- [83] J. Turkevitch, P. C. Stevenson, J. Hillier, **Discuss. Faraday Soc.** 11 (1951) 55 – 75.
- [84] G. Frens, **Nature Phys. Lett.** 241 (1973) 20 – 22.
- [85] W. Lv, S. Liu, X. Fan, S. Wang, G. Zhang, F. Zhang, **Macromol. Rapid. Commun.** 30 (2009) DOI: 10.1002/marc.200900624.
- [86] H. Shin, C. Kang, **Anal. Sci.** 19 (2003) 1667 – 1670.
- [87] S. Liu, T. Zhu, R. Hu, Z. Liu, **Phys. Chem. Chem. Phys.** 4 (2002) 6059 – 6062.
- [88] R. G. Pearson, **J. Am. Chem. Soc.** 85 (1963) 3533 – 3539.
- [89] M. Giersig, P. Mulvaney, **Langmuir** 9 (1993) 3408 – 3413.
- [90] M. Daniel, D. Astruc, **Chem. Rev.** 104 (2004) 293 – 346.
- [91] J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, G. M. Whitesides, **Chem. Rev.** 105 (2005) 1103 – 1170.
- [92] S. T. Selvan, J. P. Spatz, H. A. Klock, M. Möller, **Adv. Mater.** 10 (1998) 132 – 134.
- [93] J. Raula, J. Shan, M. Nuoponen, A. Niskanen, H. Jiang, E. I. Kauppinen, H. Tenhu, **Langmuir** 19 (2003) 3499 – 3504.
- [94] M. D. Rubianes, G. A. Rivas, **Electrochem. Commun.** 9 (2007) 480 – 484.
- [95] M. P. Siswana, K. I. Ozoemena, T. Nyokong, **Electrochim. Acta** 52 (2006) 114 – 122.
- [96] K. Rootwelt, **Scan. J. Clin. Lab. Invest.** 19 (1967) 325 – 330.
- [97] R. F. Teófilo, M. M. C. Ferreira, **Quim. Nova** 29 (2006) 338 – 350.
- [98] T. R. Soreta, J. Strutwolf, C. K. O’Sullivan, **ChemPhysChem** 9 (2008) 920 – 927.
- [99] E. Laviron, **J. Electroanal. Chem.** 101 (1979) 19 – 28.
- [100] N. Mano, A. Kahn, **J. Electroanal. Chem.** 477 (1999) 79 – 88.

- [101] A. C. Pereira, A. S. Santos, L. T. Kubota, *J. Coll. Interface Sci.* 265 (2003) 351 – 358.
- [102] P. R. Lima, “**Eletrodo modificado à base de 4-nitroftalonnitrila: sensor amperométrico para quantificação de alguns antioxidantes de relevância biológica**”, (Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas), 2009, p. 97 – 98.
- [103] F. D. Munteanu, N. Mano, A. Kuhn, L. Gorton, *J. Electroanal. Chem.* 564 (2004) 167 – 178.
- [104] S. M. Golabi, H. R. Zare, M. Hamzehloo, *Electroanal.* 14 (2002) 611 – 618.
- [105] H. R. Zare, S. M. Golabi, *J. Electroanal. Chem.* 464 (1999) 14 – 23.
- [106] J. C. Duarte, R. C. S. Luz, F. S. Damos, A. A. Tanaka, L. T. Kubota, *Anal. Chim. Acta.* 612 (2008) 29 – 36.
- [107] H. R. Zare, N. Nasirizadeh, M. M. Ardakani, *J. Electroanal. Chem.* 577 (2005) 25 – 33.
- [108] L. Zhu, J. Zhai, R. Yang, C. Tian, L. Guo, *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007) 2768 – 2773.
- [109] E. S. Gil, L. T. Kubota, *Bioelectrochem.* 51 (2000) 145 – 149.
- [110] C. P. Andrieux, J.M. Saveant, *J. Electroanal. Chem.* 93 (1978) 163 – 168.
- [111] C. Deng, J. Chen, X. Chen, M. Wang, Z. Nie, S. Yao, *Electrochim. Acta* 54 (2009) 3298 – 3302.
- [112] M. Musameh, J. Wang, A. Merkoci, Y. Lin, *Electrochem. Commun.* 4 (2002) 743 – 746.
- [113] V. Leskovac, S. Trivić, *J. Org. Chem.* 53 (1988) 6123 – 6124.
- [114] P. R. Lima, W. J. R. Santos, R. C. S. Luz, F. S. Damos, A. B. Oliveira, M. O. F. Goulart, L. T. Kubota, *J. Electroanal. Chem.* 612 (2008) 87 – 96.
- [115] P. Abiman, G. G. Wildgoose, R. G. Compton, *Electroanal.* 19 (2007) 437 – 444.
- [116] J. Raoof, R. Ojani, H. Beitollahi, *Electroanal.* 19 (2007) 1822 – 1830.
- [117] J. Raoof, R. Ojani, M. Kolbadinezhad, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 78 (2005) 818 – 826.
- [118] J. Tong, M. Nie, H. Li, *J. Electroanal. Chem.* 433 (1997) 121 – 126.

- [119] W. Jin, H. Chen, **Chromatographia** 52 (2000) 17 – 21.
- [120] K. P. C. Volhardt, N. E. Schore, **Organic chemistry: structure and function**, 4^a ed, Bookman, Porto Alegre, 2004.
- [121] P. C. White, N. S. Lawrence, J. Davies, R. G. Compton, **Electroanal.** 14 (2002) 89 – 98.
- [122] C. Adam, L. García-Río, J. R. Leis, L. Ribeiro, **J. Org. Chem.** 16 (2005) 6353 – 6361.
- [123] Analytical Methods Committee, **Analyst** 112 (1987) 199 – 204.
- [124] M. K. Amini, J. H. Khorasani, S. S. Khaloo, S. Tangestaninejad, **Anal. Biochem.** 320 (2003) 32 – 38.
- [125] T. Inoue, J. R. Kirchhoff, **Anal. Chem.** 72 (2000) 5755 – 5760.
- [126] S. Shahrokhian, M. Karimi, **Electrochim. Acta** 50 (2004) 77 – 84.
- [127] M. F. S. Teixeira, E. R. Dockal, E. T. G. Cavalheiro, **Sens. Act. B** 106 (2005) 619 – 625.
- [128] A. Salimi, S. Pourbeyram, **Talanta** 60 (2003) 205 – 214.
- [129] K. Ozoemena, P. Westbroek, T. Nyokong, **Electrochem. Commun.** 3 (2001) 529 – 534.
- [130] K. I. Ozoemena, T. Nyokong, P. Westbroek, **Electroanal.** 15 (2003) 1762 – 1770.
- [131] B. Filanovsky, **Anal. Chim. Acta** 394 (1999) 91 – 100.
- [132] H. Li, T. Li, E. Wang, **Talanta** 42 (1995) 885 – 890.
- [133] S. Shahrokhian, **Anal. Chem.** 73 (2001) 5972 – 5978.
- [134] N. Spătaru, B. V. Sarada, E. Popa, D. A. Tryk, A. Fujishima, **Anal. Chem.** 73 (2001) 514 – 519.
- [135] P. V. Ioannou, M. G. Siskos, **Appl. Organometal. Chem.** 15 (2001) 511 – 514.
- [136] Y. Liu, J. Tang, X. Chen, J.H. Xin, **Carbon** 43 (2005) 3178 – 3180.
- [137] S. Sam, L. Touahir, J. S. Andresa, P. Allongue, J. N. Chazalviel, A. C. Gouget-Laemmel, C. H. Villeneuve, A. Moraillon, F. Ozanam, N. Gabouze, S. Djebbar, **Lagmuir** 26 (2010) 809 – 814.

- [138] P. Chaignon, S. Cortial, A. P. Ventura, P. lopes, F. Halgand, O. Laprevote, J. Ouazzani, **Enz. Microbiol. Technol.** 39 (2006) 1499 – 1506.
- [139] S. Huang, P. A. Lindahl, C. Wang, G. N. Bennett, F. B. Rudolph, J. B. Hughes, **Appl. Environ. Microbiol.** 66 (2000) 1474 – 1478.
- [140] M. Bartra, P. Romea, F. Urpi, J. Vilarrasa, **Tetrahedron** 46 (2001) 587 – 594.
- [141] E. Colacino, P. Nun, F. M. Colacino, J. Martinez, F. Lamaty, **Tetrahedron** 64 (2008) 5569 – 5576.
- [142] M. Shim, A. Javey, N. W. S. Kam, H. Dai, **J. Am. Chem. Soc.** 123 (2001) 11512 – 11513.
- [143] N. Mano, A. Kuhn, **J. Electroanal. Chem.** 477 (1999) 79 – 88.
- [144] A. U. Pereira, A. D. Santos, L. T. Kubota, **Electrochim. Acta** 48 (2003) 3541 – 3550.
- [145] H. R. Zare, S. M. Golabi, **J. Solid State Electrochem.** 4 (2000) 87 – 94.
- [146] F. Pariente, E. Lorenzo, F. Tobalina, H. D. Abruna, **Anal. Chem.** 76 (1995) 3936 – 3944.
- [147] L. Gorton, A. Torstensson, H. Jaegfeldt, G. Johansson, **J. Electroanal. Chem.** 161 (1984) 103 – 120.
- [148] V. S. Vasantha, S. M. Chen, **Electrochim. Acta** 52 (2006) 665 – 674.
- [149] R. Antiochia, I. Lavagnini, F. Magno, **Anal. Bioanal. Chem.** 381 (2005) 1355 – 1361.
- [150] F. D. Munteanu, D. Dicu, I. C. Popescu, L. Gorton, **Electroanal.** 15 (2003) 386 – 391.
- [151] A. D. Santos, L. Gorton, L. T. Kubota, **Electroanal.** 14 (2002) 805 – 812.
- [152] L. T. Kubota, L. Gorton, **Electroanal.** 11 (1999) 719 – 728.
- [153] A. D. Santos, L. Gorton, L. T. Kubota, **Electrochim. Acta** 47 (2002) 3351 – 3360.
- [154] H. M. Nassef, A. E. Radi, C. K. O’Sullivan, **Electrochem. Commun.** 8 (2006) 1719 – 1725.
- [155] V. Leskovac, S. Trivić, **J. Org. Chem.** 53 (1988) 6123 – 6124.
- [156] P. V. Ioannou, M. G. Siskos, **Appl. Organometal. Chem.** 15 (2001) 511 – 514.

- [157] P. R. Lima, P. R. B. Miranda, A. B. Oliveira, M. O. F. Goulart, L. T. Kubota, ***Electroanal.*** 21 (2009) 2311 – 2320.
- [158] N. B. Saari, S. Fujita, R. Myiazoe, M. Okugawa, ***J. Food Biochem.*** 19 (1996) 321 – 327.
- [159] J. C. B. Fernandes, L. T. Kubota, G. O. Neto, ***Anal. Chim. Acta.*** 385 (1999) 3 – 12.
- [160] C. E. Banks, R. G. Compton, ***Analyst*** 130 (2005) 1232 – 1239.
- [161] C. Deng, J. Chen, X. Chen, C. Xiao, Z. Nie, S. Yao, ***Electrochem. Commun.*** 10 (2008) 907 – 909.
- [162] M. Zhang, A. Smith, W. Gorski, ***Anal. Chem.*** 76 (2004) 5045 – 5050.
- [163] L. Wu, X. Zhang, H. Ju, ***Anal. Chem.*** 79 (2007) 453 – 458.
- [164] B. Prieto-Simón, E. Fàbregas, ***Biosens. Bioelectron.*** 19 (2004) 1131 – 1138.
- [165] S. Behera, S. Sampath, C. R. Raj, ***J. Phys. Chem. C*** 112 (2008) 3734 – 3740.
- [166] J. Zeng, W. Wei, L. Wu, X. Liu, K. Liu, Y. Li, ***J. Electroanal. Chem.*** 595 (2006) 152 – 160.
- [167] A. Radoi, D. Compagnone, M. A. Valcarcel, P. Placidi, S. Materazzi, D. Moscone, G. Palleschi, ***Electrochim. Acta.*** 53 (2008) 2161 – 2169.
- [168] C. R. Raj, S. Chakraborty, ***Biosens. Bioelectron.*** 22 (2006) 700 – 706.
- [169] L. Agüí, C. Peña-Farfal, P. Yáñez-Sedeño, J. M. Pingarrón, ***Electrochim. Acta.*** 52 (2007) 7946 – 7952.
- [170] B. K. Jena, C. R. Raj, ***Anal. Chem.*** 78 (2006) 6332 – 6339.
- [171] C. M. Maroneze, L. T. Arenas, R. C. S. Luz, E. V. Benvenutti, R. Landers, Y. Gushikem, ***Electrochim. Acta*** 53 (2008) 4167 – 4175.
- [172] A. Radoi, D. Compagnone, M. Batic, J. Klincar, L. Gorton, G. Palleschi, ***Anal. Bioanal. Chem.*** 387 (2007) 1049 – 1058.
- [173] F. d. A. Silva, C. B. Lopes, E. d. O. Costa, P. R. Lima, L. T. Kubota, ***Electrochem. Commun.*** (2010), doi: 10.1016/j.elecom.2010.01.017
- [174] M. Zhang, W. Gorski, ***Anal. Chem.*** 77 (2005) 3960 – 3965.

- [175] Q. Wang, H. Tang, Q. Xie, L. Tan, Y. Zhang, B. Li, S. Yao, *Electrochim. Acta* 52 (2007) 6630 – 6637.
- [176] N. S. Lawrence, J. Wang, *Electrochem. Commun.* 8 (2006) 71 – 76.
- [177] M. Huang, H. Jiang, J. Zhai, B. Liu, S. Dong, *Talanta* 74 (2007) 132 – 139.
- [178] X. Tu, Q. Xie, Z. Huang, Q. Yang, S. Yao, *Electroanal.* 19 (2007) 1815 – 1821.
- [179] R. Doaga, T. McCormac, E. Dempsey, *Electroanal.* 21 (2009) 2099 – 2108.
- [180] A. Arvinte, A. M. Sesay, V. Virtanen, C. Bala, *Electroanal.* 20 (2008) 2355 – 2362.
- [181] Y. Liu, H. Hou, T. You, *Electroanal.* 20 (2008) 1708 – 1713.
- [182] A. Arvinte, F. Valentini, A. Radoi, F. Arduini, E. Tamburri, L. Rotariu, G. Palleschi, C. Bala, *Electroanal.* 19 (2007) 1455 – 1459.

CAPÍTULO VII



PERSPECTIVAS

VII.1 Perspectivas

O presente trabalho demonstrou que o processo de funcionalização de nanotubos de carbono empregando polímeros pode ser facilmente empregado para imobilizar mediadores redox. Agora, serão concentrados experimentos com o auxílio de pesquisadores na área de síntese orgânica no sentido de possibilitar que uma única molécula seja capaz de possuir três características interessantes:

I) Possuir um arranjo de átomos arquitetado de tal maneira que a molécula seja imobilizada através de um processo não-covalente;

II) Apresentar um grupo nitro em sua estrutura;

III) Apresentar um grupo funcional, preferencialmente R-NH_2 ou R-COOH , que possibilite a imobilização de uma enzima dependente do processo redox do NADH.