



**CÁTIA CRISPILHO CORRÊA**

**DESENVOLVIMENTO DE BIOCENSORES PARA DETERMINAÇÃO DA  
RAZÃO GLUTATIONA REDUZIDA/OXIDADA UTILIZANDO PLATAFORMAS À  
BASE DE NANOTUBOS DE CARBONO DISPERSOS EM QUITOSANA**

**CAMPINAS  
2013**





**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**CÁTIA CRISPILHO CORRÊA**

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES PARA DETERMINAÇÃO DA  
RAZÃO GLUTATIONA REDUZIDA/OXIDADA UTILIZANDO PLATAFORMAS À  
BASE DE NANOTUBOS DE CARBONO DISPERSOS EM QUITOSANA**

**ORIENTADOR: PROF. DR. LAURO TATSUO KUBOTA  
CO-ORIENTADOR: PROF. DR. ANDRÉ LUIZ BARBOZA FORMIGA**

**TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO  
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA  
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTORA EM CIÊNCIAS.**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA  
POR CÁTIA CRISPILHO CORRÊA, E ORIENTADA PELO PROF.DR. LAURO TATSUO  
KUBOTA**

---

**Assinatura do Orientador**

**CAMPINAS  
2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR SIMONE LUCAS - CRB8/8144 -  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

C817d Corrêa, Cátia Crispilho (1982-).  
Desenvolvimento de biossensores para a  
determinação da razão glutathiona reduzida/oxidada  
utilizando plataformas à base de nanotubos de carbono  
dispersos em quitosana / Cátia Crispilho Corrêa. –  
Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Lauro Tatsuo Kubota.  
Coorientador: André Luiz Barboza Formiga.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Instituto de Química.

1. Biossensores. 2. Estresse oxidativo. 3. Razão  
glutathiona reduzida/oxidada. 4. Plataforma nanoestrutura.  
5. Nanotubos de carbono. I. Kubota, Lauro Tatsuo.  
II. Formiga, André Luiz Barboza. III. Universidade  
Estadual de Campinas. Instituto de Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Development of biosensors for the determination of oxidized/reduced glutathione ratio using platforms based on carbon nanotubes dispersed in chitosan

**Palavras-chave em inglês:**

Biosensors  
Oxidative stress  
Ratio oxidized/reduced glutathione  
Nanostructured platform  
Carbon nanotube

**Área de concentração:** Química Analítica

**Titulação:** Doutora em Ciências

**Banca examinadora:**

Lauro Tatsuo Kubota [Orientador]  
Marília de Oliveira Fonseca Goulart  
Maria Del Pilar Taboada Sotomayor  
Ana Valéria Colnaghi Simionato Cantú  
Ana Flávia Nogueira

**Data de defesa:** 27/06/2013

**Programa de pós-graduação:** Química



*Aos meus pais Maria Manoela e Luiz e  
meus irmãos Sandro e Márcio,  
pela ajuda, pelo amor e  
pelo apoio incondicional em todos os momentos....*

*Ao Bruno, companheiro, carinhoso e paciente,  
que sempre me incentivou  
e soube compreender-me em vários momentos, com amor....*

**DEDICO.**



## AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota, pela oportunidade, pela confiança, dedicação, orientação competente e pelas palavras de incentivo ao longo do desenvolvimento desta tese de doutorado, ficam aqui os meus sinceros agradecimentos.

Ao prof. Dr. André Luiz Barboza Formiga, pela coorientação no desenvolvimento desta tese e pelo constante incentivo e amizade durante todo esse período.

Ao Dr. Stefan Thalhammer, pela orientação durante o período de estágio realizado na Alemanha.

A todos os colegas do grupo LEEDS, tenho certeza de que construí aqui valiosas amizades. Em especial ao Murilo, pela amizade, pelas valiosas discussões e sugestões durante o andamento da tese e pelos trabalhos em colaboração que foram desenvolvidos durante esse período. E especialmente a Cecília, Luciana, Viviane e Wilney, pelo apoio, amizade e carinho conquistados durante esse tempo, tenho certeza que irá permanecer. Ao técnico Humberto e a Rúbia por me auxiliar em todos os momentos em que precisei.

À Elisângela, Luciana Caminha e a Bárbara, pela ajuda e apoio durante meu período de estágio na Alemanha.

À Danielle, pela ajuda e sugestões na elaboração da tese.

Aos membros da banca do exame de qualificação, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Flávia Nogueira, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Valéria Colnaghi Simionato Cantú e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carla Beatriz Grespan Bottoli e aos membros da banca avaliadora de defesa de tese, pelas valiosas contribuições para a preparação final desta tese.

A todos os funcionários do Instituto de Química que colaboraram para a realização desta tese, especialmente a Izabel, Miguel e Gabriela (secretaria da CPG) por todos os esclarecimentos. Ao Daniel Razzo pela ajuda técnica e paciência durante a obtenção das micrografias de MEV.

À DAAD/CAPES pela bolsa concedida durante o estágio realizado na Alemanha.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo: 2009/00178-9) pela bolsa concedida.



## CURRICULUM VITAE

### I. INFORMAÇÕES PESSOAIS

**Nome:** Cátia Crispilho Corrêa

**Naturalidade:** Loanda-PR

**Data de nascimento:** 27/09/1982

### II. FORMAÇÃO ACADÊMICA

#### **03/2009 – 06/2013 Doutorado em Ciências**

Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas – SP.

Título da tese: “Desenvolvimento de biossensores para determinação da razão glutaciona reduzida/oxidada utilizando plataformas à base de nanotubos de carbono dispersos em quitosana”.

Orientador: Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota.

Coorientador: Prof. Dr. André Luiz Barboza Formiga.

#### **08/2011 – 02/2012 Realização de doutorado sanduíche**

Centro de Pesquisa Helmholtz Zentrum München, HZM, Alemanha.

Título do trabalho: “Desenvolvimento de um imunossensor descartável para detecção de troponina T”.

Orientador: Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota.

Coorientador: Prof. Dr. André Luiz Barboza Formiga.

Orientador Alemão: Dr. Stefan Thalhammer.

#### **08/2005 – 08/2007 Mestrado em Ciências**

Universidade de São Paulo, USP, São Carlos – SP.

Título da dissertação: “Análise da qualidade de carne bovina por RMN em baixo campo”.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Alberto Colnago.

#### **03/2001 – 12/2004 Graduação Bacharelado em Química**

Universidade Estadual de Maringá, UEM, Brasil.

Título: “Estudo da Influência da Força Iônica no Valor dos pKas de Grupos Ácidos em Substâncias Húmicas”.

Orientador: Prof. Dr. Willian Ferreira da Costa.

### III. ATUAÇÃO PROFISSIONAL

**04/2013 – atual**

Atua como assistente de pesquisa do Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM). Campinas – SP.

### VI. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

#### VI.1. Artigos publicados

**VI.1.1. C.C. CORRÊA**; M. SANTIAGO; A.L.B. FORMIGA; L.T. KUBOTA. “In situ activated nanostructured platform for oxidized glutathione biosensing”. **Electrochimica Acta**, v. 90, p. 309-316, 2013.

**VI.1.2. C.C.C. SILVA**; M.C. BREITKREITZ; M. SANTIAGO; **C.C. CORRÊA**; L.T. KUBOTA. “Construction of a new functional platform by grafting poly(4-vinylpyridine) in multi-walled carbon nanotubes for complexing copper ions aiming the amperometric detection of L-cysteine”. **Electrochimica Acta**, v. 71, p. 150-158, 2012.

**VI.1.3. C.C. CORRÊA**; M. SANTIAGO; C.C.C. SILVA; A.L.B. FORMIGA; L.T. KUBOTA. “Synthesis and Electrochemical Characterization of Poly(2-methoxy-4-vinylphenol) with MWCNTs”. **Electroanalysis**, v. 23, p. 2562-2568, 2011.

**VI.1.4. C.C. CORRÊA**; L.A. FORATO; L.A. COLNAGO. “High-throughput non-destructive nuclear magnetic resonance method to measure intramuscular fat content in beef”. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, p. 1357-1360, 2008.

#### VI.2. Artigos submetidos

**VI.2.1. C.C. CORRÊA**; M. SANTIAGO; R.A. TIMM; S.A.V. JANNUZZI; A.L.B. FORMIGA; L.T. KUBOTA. “Electrochemical sensor using MWCNTs modified with metallopolymer based on poly(4-vinylpyridine) for amperometric detection of L-cysteine”. **Submetido para Electrochimica Acta**.

**VI.2.2. C.C. CORRÊA**; P.M. DOS SANTOS; L.A. FORATO; R.R. TULLIO; G.M. CRUZ; L.A. COLNAGO. “A fast and non-destructive method to discriminate beef samples using TD-NMR and chemometrics analysis”. **Submetido para Talanta**.

## RESUMO

**Título:** “Desenvolvimento de biossensores para a determinação da razão glutaciona reduzida/oxidada utilizando plataformas à base de nanotubos de carbono dispersos em quitosana”.

**Autora:** Cátia Crispilho Corrêa

**Orientador:** Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota

**Coorientador:** Prof. Dr. André Luiz Barboza Formiga

**Palavras-chave:** Biossensores, estresse oxidativo, razão glutaciona reduzida/oxidada, plataforma nanoestruturada e nanotubos de carbono.

Este trabalho descreve o desenvolvimento de dois biossensores, sendo um para a detecção da glutaciona oxidada (GSSG), baseada na imobilização da enzima glutaciona redutase (GR) e outro para a detecção da glutaciona total (glutaciona reduzida e oxidada) através da imobilização das enzimas glutaciona redutase e glutaciona peroxidase (GPx). Ambas as imobilizações foram realizadas sobre uma plataforma nanoestruturada com nanotubos de múltiplas paredes (MWCNT), dispersos em quitosana ligada covalentemente a um mediador de elétrons, o ácido 3,5-dinitrobenzoico, que apresentou atividade eletrocatalítica para NADH. A plataforma nanoestruturada foi caracterizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), voltametria cíclica e cronoamperometria. Os valores de  $k_s$  e da constante cinética da reação entre o mediador de elétrons e NADH ( $k_{obs}$ ) foram  $14 \text{ s}^{-1}$  e  $5,1 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , respectivamente. Após o processo de ativação do par redox e da caracterização, a enzima GR foi facilmente imobilizada na superfície do eletrodo usando quitosana e glutaraldeído. Empregando medidas cronoamperométricas, foi possível analisar a influência de cada parâmetro utilizado na construção do biossensor para detecção de GSSG. As melhores condições para o emprego do biossensor foram: 50 unidades de GR,  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de quitosana e  $600 \mu\text{mol L}^{-1}$  de NADH. O biossensor apresentou uma faixa linear de 2,0 a  $35 \mu\text{mol L}^{-1}$  para a detecção de GSSG. Já os limites de detecção e quantificação foram 0,6 e  $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. Utilizando a mesma plataforma nanoestruturada foi possível imobilizar as duas enzimas (GR e GPx), sendo esse biossensor destinado para a detecção da glutaciona total (GSH+GSSG). Este biossensor apresentou uma faixa linear 2,0 a  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  para a detecção da glutaciona total, apresentando um limite de detecção e de quantificação de 0,6 e  $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente.



## ABSTRACT

**Title:** "Development of biosensors for the determination of oxidized/reduced glutathione ratio using platforms based on carbon nanotubes dispersed in chitosan."

**Author:** Cátia Crispilho Corrêa

**Adviser:** Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota

**Co-Adviser:** Prof. Dr. André Luiz Barboza Formiga

**Key-words:** Biosensors, oxidative stress, ratio oxidized/reduced glutathione, nanostructured platform and carbon nanotube.

This work describes the development of two biosensors, one for the detection of oxidized glutathione (GSSG) based on the immobilization of glutathione reductase (GR) and other for the detection of total glutathione (glutathione reduced and oxidized) by immobilizing the enzymes glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR). Both assets were carried on a nanostructured platform with multiwalled carbon nanotubes (MWCNT) dispersed in chitosan covalently linked to 3,5-dinitrobenzoic acid, a redox mediator, which showed electrocatalytic activity for NADH. The nanostructured platform was characterized performing scanning electron microscopy (SEM), cyclic voltammetry and chronoamperometry analyses. The obtained values for the  $k_s$  and for chemical reaction ( $k_{obs}$ ) between redox mediator and NADH were  $14 \text{ s}^{-1}$  and  $5.1 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , respectively. After the activation process and of the redox couple characterization the enzyme glutathione reductase was easily immobilized on the electrode surface using chitosan and glutaraldehyde. Employing chronoamperometric measures, it was possible to analyze the influence of each parameter used in the construction of the biosensor for detection of GSSG. The best conditions for the use of the biosensor were: 50 units of GR,  $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  chitosan and  $600 \mu\text{mol L}^{-1}$  NADH. The biosensor showed a linear range for detecting GSSG in concentrations from 2.0 to  $35 \mu\text{mol L}^{-1}$ . The detection and quantification limits obtained were 0.6 e  $2.0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectively. Using the same nanostructured platform, it was possible to immobilize both enzymes (GPx and GR), being this biosensor dedicated to detect the total glutathione (GSH + GSSG). This biosensor showed a linear range for detecting GSSG in concentrations from 2.0 up to  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ . The detection and quantification limits obtained were 0.6 e  $2.0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectively.



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	xxi
<b>LISTA DE TABELAS</b>	xxv
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	xxvii
<b>I. INTRODUÇÃO</b>	1
I.1 Introdução Geral	3
I.2 Glutaciona	4
I.3 Determinação da Glutaciona	9
I.4 Nanotubos de Carbono	14
I.5 Modificação dos nanotubos de carbono	17
I.5.1 Modificação não-covalente	17
I.5.2 Modificação covalente	18
I.5.3 Uso de mediadores de elétrons	18
I.6 Motivação	20
<b>II. OBJETIVOS</b>	23
II.1 Geral	25
II.2 Específicos	25
<b>III. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	27
III.1 Reagentes e soluções	29
III.2 Equipamentos	29
III.3 Limpeza do eletrodo de trabalho	30
III.4 Preparação da plataforma nanoestruturada no ECV	30
III.5 Construção do biossensor para detecção da glutaciona oxidada	31
III.5.1 Otimização no processo de imobilização enzimática	31

III.5.1.1 Influência da concentração enzimática	32
III.5.1.2 Concentração de quitosana	32
III.5.1.3 Concentração de NADH no eletrólito de suporte	32
III.5.2 Estudo da repetibilidade das determinações, da construção e estabilidade do biossensor	32
III.6 Construção do biossensor para a detecção da glutatona total (GSH+GSSG)	33
III.6.1 Estudo da repetibilidade das determinações, da construção e estabilidade do biossensor	33
III.7 Micrografias	34
<b>IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>35</b>
IV.1 Estabilidade, caracterização morfológica e otimização da dispersão	37
IV.2 Ativação e caracterização do par redox	43
IV.3 Atividade eletrocatalítica da plataforma nanoestruturada	51
IV.4 Estudos Cronoamperométricos	54
IV.5 Detecção amperométrica de NADH	58
IV.6 Biossensor para a detecção da glutatona oxidada	60
IV.6.1 Influência da concentração enzimática	61
IV.6.2 Concentração de quitosana	62
IV.6.3 Concentração de NADH no eletrólito de suporte	64
IV.6.4 Caracterização analítica do biossensor para a detecção da glutatona oxidada	65
IV.6.5 Estudo de repetibilidade e tempo de vida do biossensor	68
IV.7 Biossensor para a detecção da glutatona total (GSH+GSSG)	68
IV.7.1 Caracterização analítica do biossensor para a detecção da glutatona total (GSH+GSSG)	72
IV.7.2 Estudo de repetibilidade e tempo de vida do biossensor	75

<b>V. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS</b>	77
V.1 Considerações finais e perspectivas	79
<b>VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	81



**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>3,5-ADNB</b>	Ácido 3,5-dinitrobenzoico
<b>3,5-DNBSE</b>	(Ácido 3,5-dinitrobenzoico) succinimidil éster
<b>8-OH-dG</b>	8-hidroxi-desoxiguanosina
<b>A</b>	Área do eletrodo
<b><math>\alpha</math></b>	Coefficiente de transferência de elétrons
<b>BrB</b>	monobromobimano
<b>Ag/AgCl</b>	Eletrodo de referência de prata/cloreto de prata
<b>AGEs</b>	Do inglês “Advanced Glycation End products”
<b>C</b>	Concentração de NADH (Eq. IV.5 e Eq. Cottrell)
<b>CAT</b>	Catalase
<b>CDNB</b>	1-cloro-4-dinitrobenzeno
<b>D</b>	Coefficiente de difusão
<b><math>\Delta E</math></b>	$E_p - E^{o'}$
<b><math>\Delta E_p</math></b>	Separação dos potenciais de pico
<b><math>\Delta I</math></b>	Delta de corrente
<b>DTNB</b>	Ácido, 5,5' ditio-bis-(2-nitrobenzoico)
<b>D.P.R.</b>	Desvio padrão relativo
<b>ECS</b>	Eletrodo de calomelano saturado
<b>ECV</b>	Eletrodo de carbono vítreo
<b>EC<sub>cat</sub></b>	Eletroquímico-químico catalítico
<b>EDC</b>	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodimida cloridrato
<b>E<sub>apl.</sub></b>	Potencial aplicado
<b>EDR</b>	Eletrodo de disco rotatório
<b>E<sub>p</sub></b>	Potencial de pico
<b>E<sup>o'</sup></b>	Potencial formal ( $(E_{pa} + E_{pc}) / 2$ )
<b>ERO</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>ERN</b>	Espécies reativas de nitrogênio
<b>E<sub>pa</sub></b>	Potencial de pico anódico
<b>E<sub>pc</sub></b>	Potencial de pico catódico
<b>F</b>	Constante de Faraday
<b>FMN</b>	Flavina mononucleotídeo
<b>GP<sub>x</sub></b>	Glutathiona peroxidase

<b>GR</b>	Glutaciona redutase
<b>GSH</b>	Glutaciona
<b>GSSG</b>	Glutaciona na forma oxidada (dissulfeto)
<b>GSH/GSSG</b>	Razão glutaciona reduzida/glutaciona oxidada
<b>GTS</b>	Glutaciona S-transferase
<b>HEPES</b>	[N-(2-hidroxiethyl)piperazina-N-(ácido 2-etanosulfônico)]
<b>HOPG</b>	Grafite pirolítico altamente ordenado
<b>HNE</b>	Hidroxinonenal
<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>I</b>	Corrente
$I_{cat}$	Corrente catalítica na presença de NADH
$I_L$	Corrente na ausência de NADH
$I_{pa}$	Corrente de pico anódica
$I_{pc}$	Corrente de pico catódica
<b>L.D.</b>	Limite de detecção
<b>L.Q.</b>	Limite de quantificação
$K_M^{app}$	Constante aparente de Michaelis-Menten
$k_{obs}$	Constante cinética da reação mediador-analito
$k_s$	Constante de velocidade heterogênea de transferência de elétrons
<b>MDA</b>	Malondialdeído
<b>MEV</b>	Microscópio eletrônico de varredura
<b>MEKC</b>	Cromatografia micelar eletrocinética capilar
<b>MFD</b>	Detecção fluorescência multiparâmetro
<b>MFDi</b>	Imagem de fluorescência multiparâmetro
$M_{ox}$	Mediador de elétrons no estado oxidado
$M_{red}$	Mediador de elétrons no estado reduzido
<b>MWCNT</b>	Nanotubos de carbono de paredes múltiplas
<b>NaDDBS</b>	Dodecilbenzeno sulfonato de sódio
$n$	Número de elétrons
$n_p$	Número de prótons
$\eta$	Sobrepotencial
<b>NADH</b>	$\beta$ -nicotinamida adenina dinucleotídeo

<b>NHS</b>	N-hidroxi succinimida
<b>NTC</b>	Nanotubos de carbono
<b>PBS</b>	Solução tampão fosfato
<b>PIPES</b>	[Piperazina-N-N-bis[(ácido 2-etanossulfônico)]
<b>PVP</b>	Poli (4-vinilpiridina)
<b>QUIT</b>	Quitosana
<b><i>R</i></b>	Constante universal dos gases
<b>RMN</b>	Ressonância magnética nuclear
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato de sódio
<b>SOD</b>	Superóxido-dismutase
<b>SWCNT</b>	Nanotubos de carbono de paredes simples
<b><i>t</i></b>	Tempo
<b><i>T</i></b>	Temperatura
<b>TRIS</b>	[Tris(hidroximetil) amino-metano]
<b>TNB</b>	Ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico
<b>TPNH</b>	Nucleotídeo trifosfopiridina
<b><i>v</i></b>	Velocidade de varredura
<b><i>v<sub>a</sub></i></b>	Velocidade de varredura do processo anódico
<b><i>v<sub>c</sub></i></b>	Velocidade de varredura do processo catódico



## LISTA DE TABELAS

- Tabela I.1** Os biomarcadores de dano oxidativo associado com 8 algumas doenças humanas. Adaptada da referência [29].
- Tabela I.2** Métodos descritos na literatura para a determinação da 10 GSH e GSSG em amostras biológicas.
- Tabela IV.1** Parâmetros eletroquímicos e cinéticos de alguns eletrodos 47 modificados.
- Tabela IV.2** Parâmetros eletroquímicos e constante cinética de alguns 57 eletrodos modificados para a eletrooxidação de NADH.
- Tabela IV.3** Valores de corrente ( $\Delta I$ ) obtido para cada enzima 74 imobilizada e para o biossensor contendo as duas enzimas imobilizadas.



**LISTA DE FIGURAS**

- Figura I.1** Estrutura da glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG). 6
- Figura I.2** Interconversão de glutathiona nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR). Adaptada da referência [24]. 7
- Figura I.3** Nanotubos de paredes simples (SWCNT) e nanotubos de paredes múltiplas (MWCNT). 15
- Figura I.4** (A) planos edge e basal em camadas de grafite e (B) em MWCNT. Figura adaptada da referência [82]. 16
- Figura IV.1** Fotos das soluções de MWCNT em diferentes concentrações de quitosana considerando as etapas (1) antes do ultra-som, (2) depois de 30 min de ultra-som, (3) depois de 1 h de repouso e (4) depois de 24 h de repouso. As soluções empregadas foram: (a) MWCNT-QUIT 2,0%, (b) MWCNT-QUIT 1,0%, (c) MWCNT-QUIT 0,75%, (d) MWCNT-QUIT 0,5%, (e) MWCNT-QUIT 0,25%, (f) MWCNT-QUIT 0,1%. 37
- Figura IV.2** Micrografias obtidas da plataforma nanoestruturada contendo MWCNT-QUIT todas com ampliações de 40 k $\times$  e nas seguintes concentrações de QUIT: (A) MWCNT-QUIT 2,0 %, (B) MWCNT-QUIT 1,0 %, (C) MWCNT-QUIT 0,75 %, (D) MWCNT-QUIT 0,5 %, (E) MWCNT-QUIT 0,25 %, (F) MWCNT-QUIT 0,1 %. 38

- Figura IV.3** (A) Esquema de formação do intermediário 3,5-DNBSE a partir de uma solução contendo 3,5-ADNB, EDC e NHS. (B) Mediador de elétrons imobilizado na superfície do EVC. 40
- Figura IV.4** Gráfico de barras da otimização da concentração de quitosana em função corrente de pico anódico do par redox R-NO/R-NHOH em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0 e  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ . 41
- Figura IV.5** Fotos das soluções de (a) MWCNT em água, (b) MWCNT-QUIT e (c) MWCNT-QUIT/3,5-ADNB-at considerando as etapas (1) antes do ultra-som, (2) depois de 30 min de ultra-som, (3) depois de 1 h de repouso e (4) depois de 24 h de repouso. 42
- Figura IV.6** Micrografias de MEV com ampliação de 40×k: (A) MWCNT sem modificação, (B) MWCNT-QUIT e (C) MWCNT-QUIT/3,5-ADNB-at. 43
- Figura IV.7** (A) Voltamogramas cíclicos da formação do par redox R-NO/R-NHOH solução PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0 empregando  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$  para o ECV+MWCNT-QUIT/3,5-ADNB-at. 44
- Figura IV.8** Voltamogramas cíclicos do par R-NO/R-NHOH em várias velocidades de varredura após o processo de ativação. *Gráfico inserido:* (i)  $I_p$  vs.  $v$ . (ii) Gráfico de Laviron. Medidas realizadas em solução PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0. 45
- Figura IV.9** Voltamogramas cíclicos obtidos em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> para o eletrodo modificado com o 3,5-ADNB-at. em diferentes pHs (5,0-8,0) e  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ . 48

*Gráfico inserido:  $E^0$  vs pH.*

- Figura IV.10** Influência do pH da solução na corrente de pico anódica e 49  
catódica do mediador redox a partir de voltamogramas  
cíclicos adquiridos em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$   
e  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ .
- Figura IV.11** Influência da natureza do tampão na corrente de pico do 50  
par R-NO/R-NHOH. Condições empregadas:  
concentração  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ .
- Figura IV.12** Influência da concentração do tampão fosfato na corrente 51  
de pico do par R-NO/R-NHOH. Condições empregadas:  
pH 7,0 e  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ .
- Figura IV.13** Voltamogramas cíclicos obtidos em solução tampão 52  
fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 e  $v = 2 \text{ mV s}^{-1}$  na ausência de  
NADH (linha pontilhada) e na presença de NADH  $1,0 \times 10^{-4}$   
 $\text{mol L}^{-1}$  (linha contínua) para (A) ECV não modificado, (B)  
ECV modificado com MWCNT-QUIT e (C) ECV modificado  
com MWCNT-QUIT/3,5-ADNB-at.
- Figura IV.14** (A) Voltamogramas cíclicos para o ECV+MWCNT- 53  
QUIT/3,5-ADNB-at em várias velocidades de varredura  
( $v$ ): (a) 2, (b) 5, (c) 8, (d) 10, (e) 15, (f) 20, (g) 25 e (h) 30  
 $\text{mV s}^{-1}$ , (B) gráfico de  $I_p$  vs  $v^{1/2}$  e (C) variação de  $I_p/v^{1/2}$  vs  
 $v$ . Estudos realizados em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em  
pH 7,0 e  $[\text{NADH}] = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .
- Figura IV.15** Cronoamperogramas obtidos em solução de tampão 55  
fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0: (a) branco, (b) 2,0, (c) 4,0, (d)  
6,0 e (e) 8,0  $\text{mmol L}^{-1}$  de NADH.

- Figura IV.16** (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  $[NADH]^{1/2}$ . 56
- Figura IV.17** (A) Gráfico de  $I$  vs  $t^{1/2}$  e (B) gráfico dos coeficientes angulares obtidos em (A) vs  $[NADH]$ . As concentrações de NADH utilizadas são as mesmas dos cronoamperogramas mostrados na **Figura IV.15**. 58
- Figura IV.18** Resposta cronoamperométrica observada após adições sucessivas de uma solução estoque de NADH  $4,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,0 para: (A) ECV sem modificação, (B) ECV+MWCNT-QUIT e (C) ECV+MWCNT-QUIT /3,5-ADNB-at.  $E_{aplicado} = 50$  mV vs ECS. Velocidade de rotação do EDR de 250 rpm. 59
- Figura IV.19** Gráfico de  $\Delta I$  vs  $[NADH]$  após adições sucessivas de uma solução estoque de NADH 4,0 mmol L<sup>-1</sup> em PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,0 para o eletrodo modificado ECV+MWCNT-QUIT/3,5-ADNB-at. *Gráfico inserido: região da faixa linear.*  $E_{aplicado} = 50$  mV vs ECS. 60
- Figura IV.20** Efeito da quantidade de enzima GR preparação do biossensor analisada pela sensibilidade deste obtida pela resposta cronoamperométrica, após adições sucessivas de GSSG (solução padrão) em PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0, contendo 600  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> de NADH, [QUIT] 2,5  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> e  $E_{aplicado} = 50$  mV vs ECS. 62
- Figura IV.21** Efeito da concentração de quitosana na preparação da solução enzimática analisada pela sensibilidade do biossensor obtida pela resposta cronoamperométrica, após adições sucessivas de GSSG em PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup>, 63

pH 7,0, contendo  $600 \mu\text{mol L}^{-1}$  de NADH, 50 U de GR e  $E_{\text{aplicado}} = 50 \text{ mV vs ECS}$ .

- Figura IV.22** Efeito da concentração de NADH no eletrólito de suporte 64  
analisada pela sensibilidade do biossensor obtida pela resposta cronoamperométrica, após adições sucessivas de GSSG em PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0, [QUIT] de  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ , 50 U de GR e  $E_{\text{aplicado}} = 50 \text{ mV vs ECS}$ .
- Figura IV.23** Resposta cronoamperométrica observada após adições 66  
sucessivas de uma solução estoque de GSSG  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  em solução PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 contendo  $600 \mu\text{mol L}^{-1}$  de NADH para o ECV+MWCNT-QUIT/3,5-ADNB-at/GR.  $E_{\text{aplicado}} = 50 \text{ mV vs ECS}$ . Velocidade de rotação do EDR de 250 rpm.
- Figura IV.24** Gráfico de  $|\Delta I|$  vs [GSSG] do biossensor após adições 67  
sucessivas de uma solução estoque de GSSG  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  em solução PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 contendo  $600 \mu\text{mol L}^{-1}$  de NADH. *Gráfico inserido: região da faixa linear.*
- Figura IV.25** Voltamograma cíclico obtidos para o biossensor 70  
(ECV+MWCNT-QUIT/3,5-ADNB-at/GR/GPx) em PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 com  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$  (preto), na presença dos substratos das enzimas GR e GPx (vermelho) e da GSH (verde). Condições experimentais: 50 U da enzima glutatona redutase, 25 U da enzima glutatona peroxidase e [QUIT] de  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ .
- Figura IV.26** Voltamograma cíclico obtidos para o biossensor 71  
(ECV+MWCNT-QUIT/3,5-ADNB-at/GR/GPx) em PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 com  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$  (preto), na presença dos substratos das enzimas GR e GPx (vermelho), da GSH

(verde) e da GSH+GSSG (solução padrão). Condições experimentais: 50 U da enzima glutatona redutase, 25 U da enzima glutatona peroxidase e [QUIT] de  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

- Figura IV.27** Resposta cronoamperométrica observada após adições sucessivas de uma solução estoque de GSH+GSSG  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  em solução PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 contendo  $600 \mu\text{mol L}^{-1}$  de NADH e  $300 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e com 50 U da GR e 30 U da GPx para o ECV+MWCNT-QUIT/3,5-ADNB-at/GR/GPx.  $E_{\text{aplicado}} = 50 \text{ mV vs ECS}$ . Velocidade de rotação do EDR de 250 rpm. 73
- Figura IV.28** Gráfico de  $|\Delta I|$  vs [GSH+GSSG] do biossensor. *Gráfico inserido*: região da faixa linear. Medidas realizadas em solução PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 contendo  $600 \mu\text{mol L}^{-1}$  de NADH e  $300 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e com 50 U da GR e 30 U da GPx. 75



# I. INTRODUÇÃO



## I.1 Introdução Geral

Atualmente, o estresse oxidativo está relacionado com vários fatores de diversas naturezas como, por exemplo: hábitos de vida considerados impróprios (consumo de álcool, tabagismo, dieta inadequada, exercício físico executado de forma extrema, exposição à radiação não ionizante ultravioleta e outras ondas curtas); condições ambientais impróprias (temperatura elevada e poluição ambiental, domiciliar e ocupacional); envelhecimento e estados psicológicos que provoquem estresse emocional. Existem também patologias crônicas (*diabetes mellitus*, hipertensão arterial, câncer, entre outras) e patologias degenerativas (Mal de Alzheimer e Mal de Parkinson) associadas ao estresse redox [1,2]. Diante disso, há um grande interesse no estudo dos antioxidantes devido às descobertas sobre os efeitos das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio no organismo [3].

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbia e do nosso metabolismo e, assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou gerados por alguma disfunção biológica, processos inflamatórios ou provenientes de alimentos. No organismo, encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. Por outro lado, quando sua produção é exacerbada apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA [3,4].

Dessa forma, há fortes evidências de que o estresse oxidativo tem importância capital nos processos de envelhecimento, transformação e morte celular, com consequências diretas em muitos processos patológicos, entre eles, a indução do câncer e a propagação de AIDS em pacientes soropositivos (HIV<sup>+</sup>), bem como na fisiopatologia de muitas doenças crônicas, entre elas, doenças autoimunes, cardiopatias, câncer, doenças do pulmão, intoxicação por xenobióticos e muitas outras, podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral [1,3].

Portanto, para combater o excesso de radicais livres, o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio. Existem os antioxidantes produzidos pelo corpo que agem enzimaticamente, a exemplo da enzima glutatona peroxidase (GPx), catalase (CAT) e superóxido-dismutase (SOD) [5] ou, não enzimaticamente, a exemplo de glutatona (GSH), proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina) e ácido diidrolipóico. Além dos

antioxidantes produzidos pelo corpo, o organismo utiliza aqueles provenientes da dieta como o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina-E),  $\beta$ -caroteno (pro-vitamina-A), ácido ascórbico (vitamina-C), e compostos fenólicos onde se destacam os flavonoides e poliflavonoides [3,6]. O reconhecimento dessa relação estimulou o desenvolvimento de estudos de marcadores de dano oxidativo e de substâncias antioxidantes em sistemas biológicos.

Por essa razão, estudos com ênfase na detecção e quantificação de antioxidantes de relevância biológica têm requerido uma série de desafios, tanto na área científica quanto tecnológica. Dentre os compostos antioxidantes citados acima, podemos encontrar os tióis, cujo monitoramento em fluidos fisiológicos é muito importante.

Dentre os mais diversos tióis a glutathiona desperta um grande interesse devido à participação desta de maneira direta e indireta de muitos fenômenos importantes, incluindo a síntese de proteínas e DNA, transporte de aminoácidos, atividade enzimática, metabolismo e proteção das células. Sua utilização como um biomarcador para diferentes estados clínicos, desperta um interesse considerável pelo desenvolvimento de metodologias analíticas utilizando as mais diversas técnicas tais como: espectrofotometria, espectrometria de massa, ressonância magnética nuclear, cromatografia gasosa, eletroforese capilar, assim como técnicas eletroquímicas que nos permitem fazer a determinação de forma rápida.

## I.2 Glutathiona

A glutathiona (GSH) é o principal e mais abundante tiol (R-SH) intracelular e não proteico possuindo baixo peso massa molecular, encontrado em células dos seres humanos, animais e plantas [7], que vem apresentando um grande interesse na área científica, devido às propriedades multifuncionais, tais como, síntese de proteínas e DNA, transporte de aminoácidos, atividade enzimática, metabolismo e proteção das células. Além disso, a GSH possui um papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos e na defesa das células contra o estresse oxidativo [8].

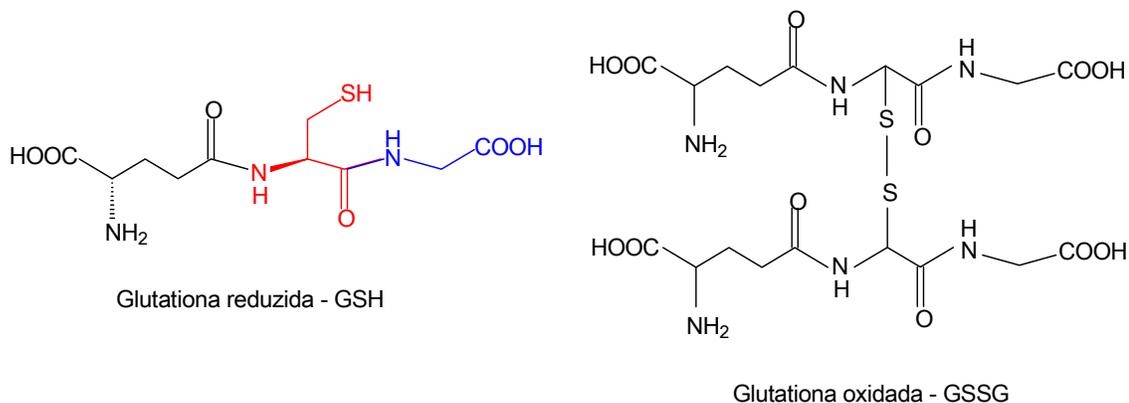
Estruturalmente, a glutathiona é um tripeptídeo (Y -L-glutamil-L-cisteinil-glicina) composto por três aminoácidos: ácido glutâmico (preto), cisteína (vermelho) e glicina (azul), ligados peptidicamente, como mostra a **Figura I.1**. É uma das moléculas de

maior importância encontradas no organismo, a qual atua como um tampão redox quando presente em altos níveis de concentração (aproximadamente  $5 \text{ mmol L}^{-1}$ ), com isso, protege as células sanguíneas do prejuízo oxidativo devido também a suas propriedades redutoras e nucleofílicas [9,10].

A glutatona apresenta duas importantes características na sua estrutura: a  $\gamma$ -glutamil e o grupo sulfidril. Esses compostos facilitam sua participação em um grande número e variedade de funções. Algumas das importantes funções da glutatona:

- Participação no transporte de aminoácidos (especialmente cistina e alguns outros aminoácidos neutros) e também de peptídeos e aminas [11];
- Participação em reações de trans-hidrogenação que estão envolvidas na formação e manutenção dos grupos sulfídricos de outras moléculas tais como: coenzima A, várias enzimas e proteínas [12];
- No sistema nervoso central, onde foi registrado que a maioria dos pacientes com defeitos no ciclo  $\gamma$ -glutamil podem sofrer de retardamento mental ou exibir outros defeitos cerebrais [11];
- Eliminação de peróxido de hidrogênio, peróxidos orgânicos e radicais livres, assim como eliminação de uma variedade de compostos xenobióticos que interagem com a glutatona, sendo excretados pela urina ou fezes na forma de ácidos mercaptúricos [11];
- Proteção da membrana celular do estresse oxidativo e da radiação [7,13].

Além das importantes funções da glutatona, a mesma existe no organismo nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) como mostrado na **Figura I.1**, atuando direta e indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo a síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular. Em particular, problemas na síntese e metabolismo da glutatona estão associados a algumas doenças, nas quais os níveis de glutatona e das enzimas que atuam no seu metabolismo podem ser bastante significativos no diagnóstico de alguns tipos de câncer, bem como em outras doenças relacionadas ao estresse oxidativo [14,15,16,17].



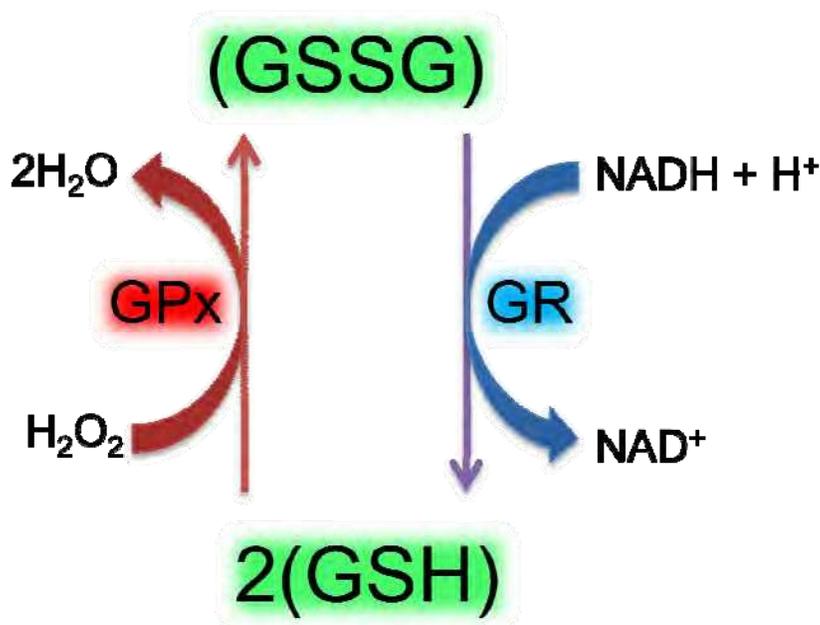
**Figura I.1.** Estrutura da glutaciona reduzida (GSH) e glutaciona oxidada (GSSG).

O estresse oxidativo, ou o desbalanceamento redox, é decorrente de um aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio causado pelo desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante no organismo. Essas espécies reativas, são compostos por radicais livres cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados **ERO** (espécies reativas de oxigênio) ou **ERN** (espécies reativas de nitrogênio) [6,18,19,20]. Os principais constituintes das **ERO** são: oxigênio, hidroxila ( $\text{HO}^\bullet$ ), superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), peroxila ( $\text{ROO}^\bullet$ ), alcoxila ( $\text{RO}^\bullet$ ), peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. Já no grupo das **ERN** incluem-se o óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ), óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ), nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) e peroxinitritos ( $\text{ONOO}^-$ ) [3].

Assim, a célula possui um importante sistema de defesa enzimático que envolve a enzima glutaciona peroxidase (GPx), encontrada em muitos tecidos de origem animal. Os mecanismos catalíticos de funcionamento da GPx envolvem seus principais substratos, glutaciona e peróxido de hidrogênio. Portanto, a atividade enzimática de GPx é um dos meios de controle do organismo dos níveis de peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos, oriundos do ataque de espécies radicalares. Outra enzima que age conjuntamente com a glutaciona peroxidase é a enzima glutaciona redutase (GR). Esta enzima não age diretamente na remoção de espécies radicalares, porém é responsável pela regeneração da glutaciona à sua forma reduzida (GSH) na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), tendo como objetivo impedir a paralisação do ciclo metabólico da glutaciona [14,21,22,23,24]. Além da enzima GPx que atuam no sistema de defesa contra o aumento de radicais livres, a glutaciona, superóxido-dismutase (SOD), catalase e

vitamina E atuam como eliminador de radicais livres antes que estes causem lesões. Na outra linha de defesa que tem a função de reparar as lesões ocorridas, na qual tem a GR atuando, também agem o ácido ascórbico, glutathiona peroxidase, entre outros [25].

Nas células, a glutathiona pode ser encontrada na forma livre ou ligada a proteínas, permitindo a formação de proteínas glutathioniladas. A GSH livre está presente principalmente em sua forma reduzida, a qual pode ser convertida à forma oxidada (GSSG) durante o estresse oxidativo, e pode ser revertido para a forma reduzida pela ação da enzima glutathiona redutase (GR) [24]. A **Figura I.2** ilustra a interconversão da glutathiona nas suas formas reduzida e oxidada pela ação das enzimas glutathiona peroxidase e glutathiona redutase, de maneira simplificada, pois no organismo esse mecanismo é mais complexo.



**Figura I.2.** Interconversão de glutathiona nas suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) pela ação das enzimas glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR). Adaptada da referência [24].

A resistência de muitas células contra o estresse oxidativo está associada com os elevados níveis intracelulares de glutathiona em sua forma reduzida. O estresse oxidativo pode causar mudanças no estado redox da glutathiona aumentando a liberação de glutathiona oxidada (dissulfeto) no organismo. Sendo que o estado redox depende das quantidades relativas das formas reduzidas e oxidadas

da glutathiona (GSH/GSSG), e essas quantidades são um parâmetro crítico e determinante na célula [15,26]. A razão de GSH/GSSG tem que ser mantida em torno de 100:1 [27,28], qualquer alteração nessa proporção poderá estar relacionada a várias doenças que são causadas pelo estresse oxidativo, como mostrado na **Tabela I.1.**

**Tabela I.1.** Os biomarcadores de dano oxidativo associado com algumas doenças humanas. Adaptada da referência [29].

<b>Doenças</b>	<b>Biomarcadores</b>
Câncer	MDA, razão GSH/GSSG, NO <sub>2</sub> -Tyr, 8-OH-dG.
Doença cardiovascular	HNE, razão GSH/GSSG, acroleína, NO <sub>2</sub> -Tyr, F <sub>2</sub> -isoprostano.
Artrite reumatóide	razão GSH/GSSG, NO <sub>2</sub> -Tyr, F <sub>2</sub> -isoprostano.
Doença de Alzheimer	MDA, HNE, razão GSH/GSSG, acroleína, NO <sub>2</sub> -Tyr, F <sub>2</sub> -isoprostano, AGE.
Doença de Parkinson	HNE, razão GSH/GSSG, F <sub>2</sub> -isoprostano.
Isquemia reperfusão Aterosclerose	Razão GSH/GSSG, F <sub>2</sub> -isoprostano. MDA, HNE, acroleína, NO <sub>2</sub> -Tyr, F <sub>2</sub> -isoprostano.
<i>Diabetes mellitus</i>	MDA, razão GSH/GSSG, proteínas S-glutacionadas, , NO <sub>2</sub> -Tyr, F <sub>2</sub> -isoprostano, AGE.

MDA: Malondialdeído; 8-OH-dG: 8-hidroxi-desoxiguanosina; HNE: Hidroxinonenal; AGEs: "Advanced Glycation End products". Produtos finais de glicação avançada.

A glutathiona tanto na forma reduzida quanto oxidada pode ser encontrada dentro das células em nível de milimolar e no plasma sanguíneo no nível de micromolar [30,31,32,33]. Tsai *et al.*[34] relatam a ocorrência da diminuição da razão GSH/GSSG em amostra de sangue de pacientes que apresentam câncer de mama. Os autores observaram que em tecidos cancerígenos há um aumento de oito vezes da GSSG e um aumento de quase três vezes da GSH. Já no trabalho de Berg *et*

al,[35] foi observado que há uma diminuição de 60-65 % dos níveis de GSH das amostras controle em relação aos que sofrem da doença de Parkinson. Com os resultados da correlação entre diversas doenças com a razão GSH/GSSG, há necessidade no monitoramento da glutathiona em amostras biológicas com o propósito de estudar a patologia de algumas doenças relacionadas ao estresse oxidativo, sendo este avaliado pelas quantidades relativas das formas reduzida e oxidada da glutathiona (GSH/GSSG).

### I.3 Determinação da Glutathiona

Nas células, GSH e GSSG constituem as formas livres e, junto à fração ligada com proteína representam a glutathiona total. O primeiro passo na análise da glutathiona livre é usualmente a precipitação de proteína por acidificação (ácido tricloroacético, ácido perclórico ou ácido sulfosalicílico) produzindo um sobrenadante límpido e livre de proteína após centrifugação, logo a GSH e GSSG podem ser determinadas.

Acidificação é geralmente requerida na maioria dos procedimentos para a determinação de tiol e/ou dissulfetos. Somente alguns métodos, por exemplo, a ressonância magnética nuclear, é apropriada para a obtenção de medidas em amostras de células intactas ou não desproteinizadas [36,37].

Na literatura há diversos métodos descritos para a determinação da GSH e GSSG em amostras biológicas (**Tabela I.2**). Entre eles podemos encontrar: cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *high-performance liquid chromatography*) [38,39], espectrofluorimetria [40], espectrofotometria [41,42], eletroforese capilar eletrocinética micelar (MEKC, do inglês *chromatography micellar electrokinetic capillary*) [43], ressonância magnética nuclear (RMN) [44], fluorescência [45] e métodos baseados em quimioluminescência, eletroquímica [46], entre outros.

**Tabela I.2.** Métodos descritos na literatura para a determinação da GSH e GSSG em amostras biológicas.

Metodologia	Deteção	Amostra biológica	Composto	Faixa linear ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	L.D. ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Ref.
HPLC	Espectrofotometria (ultravioleta)	Sangue humano	GSH GSSG	50-1500 2-500	0,5	[47]
HPLC	Eletroquímica e fluorometria	plasma	GSH	0-10	0,001	[48]
HPLC	Espectrometria de massas	Sangue humano	GSH GSSG	250-2000 6,25-100	-	[49]
MEKC	Espectrofotometria (ultravioleta)	plasma	GSH GSSG	16-81 8-40	0,8 0,4	[43]
RMN	<i>Double quantum</i> $^1\text{H}$ RMN	Sangue de coelho	GSH	1000-50,000	-	[44]
Eletroforese capilar	fluorometria	plasma	GSH	0,22-45,00	0,046	[45]
Quimiluminescência	Quimiluminometria	Sangue de coelho e cérebro de rato	GSH	$4,0 \times 10^{-3}$ - 0,4	$5,0 \times 10^{-4}$	[50]
Não-enzimático	Fluorometria	Sangue e fígado de ratos	GSH	0,065-32,5	0,065	[51]
Enzimático (redutase-GSSG)	Espectrofotometria (visível)	Sangue humano, saliva, urina e plasma de rato	tGSH GSSG	$3,25 \times 10^{-3}$ - $3,25 \times 10^{-2}$	-	[52]
Enzimático (GSH transferase)	Espectrofotometria (ultravioleta)	Fígado perfundidos	GSH	1-25	0,3	[53]
Eletroquímico	Amperometria	Sangue humano	GSH	2-500	2	[46]

O método de cromatografia líquida de alta eficiência é considerado o método de preferência para medidas de GSH, GSSG e tióis relacionados a amostras biológicas. A determinação simultânea de glutatona e outros tióis em um só ensaio pode ser conseguida pela escolha apropriada da coluna, derivatização e protocolos de eluição e sistemas de deteção. Por outro lado, os procedimentos envolvidos são

demorados, exigindo um tempo longo de preparação da amostra com derivação da pré e pós-coluna [47] e possuem uma frequência de amostragem baixa, devido ao modo sequencial analítico executado. As vezes, esses processos requerem sistemas especiais para detecção eletroquímica [48] ou espectrometria de massa [49]. O método de HPLC com detecção eletroquímica representa uma ferramenta importante para a análise de compostos reativos redox, tais como tióis e dissulfetos, incluindo glutathiona.

O método espectrofotométrico mais utilizado para a detecção da GSH em amostras biológicas é o que utiliza o reagente de Ellman's [54] sendo este o ensaio mais comum. Os primeiros trabalhos utilizando o reagente de Ellman's [54] foram realizados por Ellman em 1959. Após esta data, vários artigos têm sido publicados relatando a determinação de sulfidrilas e glutathiona em amostras biológicas [28,41,42,52]. O ensaio se baseia na reação entre a GSH e o reagente conhecido como reagente de Ellman, o ácido, 5,5' ditio-bis-(2-nitrobenzoico) (DTNB), gerando o composto ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico (TNB), o qual desenvolve uma coloração amarela, e é monitorado espectrofotometricamente a 412 nm.

Já os ensaios enzimáticos são vantajosos por apresentarem alta especificidade, ao contrário dos outros métodos que envolvem a derivatização não específica do grupo sulfidril da GSH [51,55]. Basicamente, os métodos enzimáticos, são divididos em duas categorias: o método baseado na reação de ciclagem enzimática que foi descoberto por Owens e Belcher [56] e desenvolvido por Tietze em 1969 [52] onde a GSSG reage com o nucleotídeo trifosfopiridina (TPNH) e a GSH gerada reage com o DTNB. Este método permite a determinação da glutathiona total sendo mais sensível que aqueles obtidos com o método espectrofotométrico usando o reagente de Ellman e é livre de interferência de outros tióis [52]. E a outra categoria é o método do ponto final. Esse utiliza a glutathiona S-transferase (GTS) e 1-cloro-4-dinitrobenzeno (CDNB) determinando apenas a GSH e foi reportado pela primeira vez por Brigelius *et al.* na avaliação da GSH em hepáticos [28,57], e a determinação da GSSG – ponto final foi desenvolvido por Güntherberg Rost em 1966 para a determinação de GSSG em eritrócitos [28,58]. Neste último ensaio, a determinação é baseada no consumo de NADPH por GR, provocando a redução da GSSG que está presente na amostra. Sendo bastante específicos, estes métodos oferecem sensibilidade muito mais baixa do que a do ensaio baseado na ciclagem enzimática.

O método utilizando a quimiluminescência para determinar a GSH foi desenvolvido por Hinze em 1984 [59], porém, o limite de detecção encontrado foi maior do que dos métodos espectrofotométricos onde o reagente de Ellman é empregado. Em 1998, Romero e Mueller-Klieser [28,60] desenvolveram o método de bioluminescência para a determinação da glutathiona reduzida. O princípio bioquímico é a quimiluminescência da bactéria luciferase. A glutathiona está ligada ao sistema redox NADP/NADPH+H<sup>+</sup> por meio da enzima glutathiona redutase. O sistema redox pode ser acoplado numa forma quantitativa à bactéria luciferase via flavina mononucleotídeo (FMN). A acumulação de NADPH é determinada via reação de bioluminescência da FMN e a bactéria luciferase. Com isso, uma correlação linear é obtida entre a intensidade de bioluminescência da reação luciferase e a quantidade de GSH em amostras líquidas. Esse processo enzimático oferece flexibilidade, desde que cada substância possa ser ligada quantitativamente ao sistema redox. Este ensaio apresenta a vantagem de utilizar pequenas quantidades de amostras líquidas e pode ser usado numa ampla faixa de concentrações de glutathiona. Por outro lado, isto pode ser apropriado para uso em microtituladores. A desvantagem deste método é ser semiquantitativo.

Vários métodos fluorimétricos também têm sido desenvolvidos e aplicados para a determinação da GSH, GSSG em amostras biológicas [28,51,61]. Inicialmente o método fluorimétrico foi proposto por Cohn e Lyle [51] e se baseia na reação entre o-ftaldialdeído (OPA) e aminoácidos. Os autores modificaram o procedimento da reação com OPA para a determinação de GSH em sangue e tecidos de ratos por simples precipitação das proteínas com o ácido metafosfórico a 25 % (m/v). A reação da glutathiona com o OPA ocorre em pH 8,0, após 15 minutos de reação à temperatura ambiente, há a formação de um produto altamente fluorescente, o qual é estável por 30 minutos. A banda de emissão e a banda de absorção de fluorescência ocorrem a 420 nm e 350 nm, respectivamente. A faixa linear de resposta foi de 60  $\mu\text{mol L}^{-1}$  a 32,5  $\text{mmol L}^{-1}$ . A grande desvantagem desse método é apresenta baixa seletividade devido à interferência significativa de aminoácidos que também reagem com o OPA, tais como, asparagina, histamina, glutamina, entre outros. Há outros reagentes fluoróforos, além do OPA, que também são usados para determinação de glutathiona, como por exemplo o monobromobimano (BrB) o qual é um reagente específico para grupos funcionais tiólicos formando adutos BrB-tiol com alta fluorescência [62].

Uma nova abordagem interessante para a detecção e identificação de várias espécies é a utilização da detecção por fluorescência multiparâmetro (MFD) [63] ou imagem de fluorescência multiparâmetro (MFDi) [64]. Em MFDi, as três coordenadas espaciais são armazenadas, sendo possível monitorar informações simultânea de fluorescência, permitindo uma avaliação em tempo real em relação à dinâmica das moléculas em solução em células. Entretanto, valores quantitativos e potenciais de aplicação das técnicas para análise em peptídeos e glutatona ainda não foram determinados.

Dentre os métodos de detecção de glutatona, o eletroquímico vem se destacando por possuir importantes aplicações na análise de amostras biológicas, utilizando eletrodos de diferentes materiais. Normalmente, a determinação tanto da GSH quanto da GSSG é baseada na oxidação direta do grupo tiol em diferentes eletrodos convencionais, como eletrodo de carbono vítreo [65], grafite pirolítico [66] e ouro [67] que são amplamente explorados. 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 oxidação direta de GSH em eletrodos de carbono tem sido reportada, como descrita por Zhang *et al* [68] onde o eletrodo de carbono foi colocado no final da coluna capilar de cromatografia líquida. O eletrodo apresentou boa sensibilidade a compostos tiólicos tais como: cisteína, glutatona, entre outros, para um potencial aplicado de 900 mV.

Moore *et al* [66], relataram o uso do eletrodo de grafite pirolítico de plano perpendicular ao plano basal para a detecção de tióis, entre eles a GSH. Com este eletrodo os autores conseguiram diminuir o potencial de oxidação da GSH para 650 mV quando comparado com eletrodos de grafite pirolítico de plano basal modificado com filme de nanotubos de carbono e eletrodo de carbono vítreo, que apresentaram potenciais de oxidação para GSH superiores a 900 mV.

Como observado nos exemplos citados acima, a GSH se oxida em potenciais altos em eletrodos convencionais. Outro ponto a ser destacado é que existem vários métodos de detecção da GSH descritos na literatura. Já para a detecção da GSSG os métodos são mais restritos, sendo a maioria dos métodos de análise baseado em HPLC [30]. Para contornar, o problema do elevado potencial, em eletrodos a base de carbono, este pode ser diminuído por um pré-tratamento, utilizando

nanomateriais e mediadores de elétrons a fim de minimizar o efeito de possíveis interferentes, principalmente em amostras biológicas.

## I.4 Nanotubos de Carbono

Os nanotubos de carbono (NTC) são sistemas modelo para a nanociência e nanotecnologia. As propriedades desses materiais são determinadas pelo tamanho e morfologia, originando uma fascinante sintonia em suas propriedades físico-químicas. Talvez os exemplos mais claros e ilustrativos desses fenômenos possam ser tomados da ciência do carbono após a descoberta do fulerenos, em 1985 [69], e dos nanotubos de carbono, em 1991[70]. Essas novas estruturas de carbono são bastante versáteis para integrarem diferentes áreas do conhecimento e são capazes de promover uma inter/multidisciplinaridade muito forte. Nos dias atuais, as pesquisas em nanotubos de carbono cruzam fronteiras da física, química, biologia e da ciência dos materiais.

Os nanotubos de carbono têm surgido como uma nova classe de nanomateriais que têm despertado um considerável interesse nos últimos anos pelas comunidades científicas e tecnológicas [71,72,73]. Os NTC são longos cilindros de átomos de carbono ligados covalentemente e apresentam propriedades singulares devido à combinação de sua dimensionalidade, estrutura e topologia. Estes materiais são diferenciados por possuírem diâmetros muito pequenos, podendo chegar a 0,4 nm, contendo assim, até 10 átomos de carbono em torno de sua circunferência. A razão de aspecto (comprimento/diâmetro) pode ser muito grande (maior até que  $10^4$ ), desta forma os NTC podem ser considerados sistemas unidimensionais (1D) [74].

Estas estruturas podem apresentar elevada condutividade elétrica, alta estabilidade química, bem como apresentam alta superfície de adsorção, podendo se dividir em duas classes: nanotubos de carbono de parede simples (SWCNT, do inglês *single-walled carbon nanotubes*) e nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT, do inglês *multi-walled carbon nanotubes*) [75,76], como mostra a **Figura I.3**. O comprimento dos NTC pode variar de algumas centenas de nanômetros a vários micrômetros, e o diâmetro de 0,4-2 nm para os SWCNT e 2-100 nm para MWCNT [77].

Nem sempre as extremidades dos tubos estão abertas como mostrado na **Figura I.3**. O fechamento das extremidades dos NTC pode ser facilmente

racionalizado considerando a presença de ligações pendentes com alta energia nos limites dos tubos. A energia total de 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 [78].

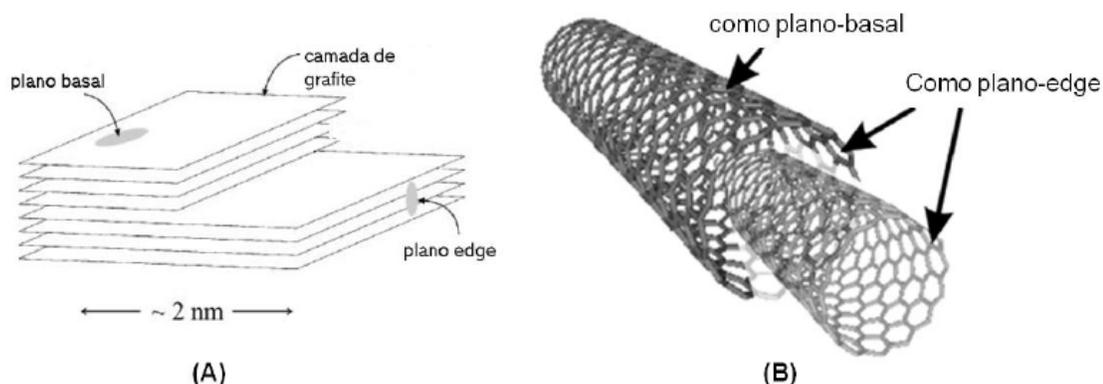


**Figura I.3.** Nanotubos de paredes simples (SWCNT) e nanotubos de paredes múltiplas (MWCNT).

Em relação à reatividade química dos NTC, esta depende da sua estrutura local. Dessa forma, as extremidades dos tubos são mais reativas do que as suas paredes laterais devido à alta energia das ligações erráticas (do inglês, *dangling bonds*) presentes nos átomos de carbono periféricos [73]. Por outro lado, o desempenho eletroquímico de materiais de carbono é basicamente determinado pelas propriedades eletrônicas, pela sua estrutura e química superficial (grupos funcionais terminais ou processos de adsorção). Tais características poderão afetar a cinética dos processos de eletrodo, janela eletroquímica de potencial, corrente capacitiva e a interação com moléculas em solução [78].

Com o objetivo de entender melhor as propriedades eletrocatalíticas dos NTC, alguns pesquisadores têm comparado o comportamento redox de inúmeras espécies sobre eletrodos de grafite pirolítico altamente ordenado (do inglês, *Highly Oriented Pyrolytic Graphite* (HOPG)), visto que um grande número de trabalhos associa os efeitos eletrocatalíticos dos NTC à presença de grupos químicos típicos destes planos (edge e basal). O plano basal do HOPG engloba todos os carbonos de uma folha de grafite, enquanto que o plano edge corresponde ao eixo perpendicular ao plano basal, como ilustrado na **Figura I.4 (A)**. 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) [79]. O plano basal do HOPG é quimicamente mais inerte do que o plano edge. Tal anisotropia também influencia o comportamento eletroquímico do material. Já foi reportado que o plano basal exibe uma cinética de transferência eletrônica lenta enquanto que os sítios localizados no plano edge favorecem o processo redox [80]. Essa mesma anisotropia eletroquímica também pode ser esperada para os NTC. As extremidades abertas dos NTC assemelham-se ao plano edge, enquanto as paredes laterais do tubo assemelham-se ao plano basal dos HOPGs. Assim, a base da natureza eletrocatalítica dos NTC reside na transferência eletrônica a partir de suas extremidades [81]. **Figura I.4 (B)** ilustra os planos edge e basal em um MWCNT.



**Figura I.4.** (A) planos edge e basal em camadas de grafite e (B) em MWCNT. Figura adaptada da referência [82].

Devido ao tamanho nanométrico, os NTC podem ser manipulados para projetar novas arquiteturas de eletrodos ou para amplificação de sinais. Com isso, devido à sua elevada área superficial, estes materiais podem ser empregados na modificação dos eletrodos, o que fornece benefícios não só para aumentar as correntes eletroquímicas das espécies eletroativas, mas também para permitir que enzimas, antígenos, anticorpos, mediadores de elétrons e nanopartículas metálicas sejam imobilizados em sua estrutura [83,84,85]. Nesse sentido, inúmeras estratégias têm sido adotadas para permitir que tais processos ocorram.

## I.5 Modificação dos nanotubos de carbono

Muitas vezes o emprego dos NTC no desenvolvimento de (bio) sensores eletroquímicos implica em sua modificação. Essa modificação é no intuito de contornar um dos problemas encontrados na manipulação dos NTC, que é a dificuldade em dispersá-los, principalmente em meio aquoso, pelo fato da aglomeração dos tubos que ocorrem devidos às forças intermoleculares que existem entre eles [86]. Além disso, a modificação dos NTC pode ajudar na interação destes com moléculas orgânicas e biológicas e possibilitar a imobilização de mediadores de elétrons, biomoléculas, entre outros, garantindo a estes materiais propriedades diferenciadas. Neste sentido, existem basicamente dois tipos de modificação dos NTC: as modificações não-covalentes e as covalentes [87,88].

### I.5.1 Modificação não-covalente

A modificação não-covalente é atraente devido à possibilidade de adsorção de vários grupos na superfície dos NTC, sem que haja mudança nas propriedades eletrônicas dos mesmos, ou seja, a estrutura  $sp^2$  e a conjugação dos átomos de carbono são conservadas [89]. Esta modificação ocorre com base nas interações de van der waals,  $\pi$ - $\pi$ ,  $\sigma$ - $\pi$ , e outras interações entre a parte hidrofóbica das moléculas adsorvidas e as paredes laterais dos NTC [90].

Existem muitos exemplos na literatura de modificações não-covalentes no NTC com agentes capazes de promover o desprendimento dos NTC e torná-los mais solúveis e biocompatíveis. Entre eles, destacam-se as modificações com surfactantes, biomacromoléculas ou envolvimento por polímeros [91].

Os surfactantes aniônicos como o dodecilsulfato de sódio (SDS) e dodecilbenzeno sulfonato de sódio (NaDDBS) são comumente empregados para diminuir a agregação dos NTC em água [92,93]. A modificação dos NTC com biomacromoléculas tem sido de grande interesse, já que possibilita a utilização destes materiais na construção de biossensores [94]. Já o envolvimento dos NTC por polímeros foi recentemente estendido aos biopolímeros, incluindo a quitosana, sulfato de condroitina e ácido hialurônico. Dessa maneira, biomoléculas de interesse, como enzimas e anticorpos, podem ser posteriormente ancoradas a esses biopolímeros envoltos aos NTC [95,96].

### I.5.2 Modificação covalente

Embora as extremidades dos NTC sejam 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 oxigenados (-COOH e -OH) em sua estrutura [87]. Assim, a funcionalização covalente pode ser realizada por qualquer modificação nos grupos funcionais ricos em oxigênio dos NTC ou por uma adição direta de reagentes às suas paredes. Mais grupos funcionais como, -COOH, -C=O e -OH, podem ser criados no locais de defeitos dos NTC por ação de agentes oxidantes fortes como ácidos sulfúricos e nítrico concentrados e soluções ácidas de peróxido de hidrogênio e de permanganato de potássio [97]. Após o tratamento, dentre os grupos funcionais obtidos, um de interesse especial é o grupo R-COOH, pois uma variedade de reações químicas e imobilizações de biomoléculas podem ser realizadas a partir deles [86].

Com isso, as modificações químicas melhoram a solubilidade e processabilidade dos NTC e garantem dispersões estáveis por longos períodos de tempo, mas também alteram a estrutura e as propriedades eletrônicas dos mesmos, devido à destruição parcial do sistema  $\pi$  conjugado dos átomos de carbono ao formar epóxido, que passam de uma hibridização  $sp^2$  para  $sp^3$  [98].

### I.5.3 Uso de mediadores de elétrons

A integração entre mediadores de elétrons e nanotubos de carbono (NTC), em matrizes poliméricas para o desenvolvimento de (bio) sensores, tem sido bastante explorada nos últimos anos. Pois, a união das propriedades desses dois materiais proporciona uma notável sinergia no desempenho dos (bio) sensores. Assim, buscando contornar o problema do elevado potencial de oxidação de tióis e do NADH, a combinação do mediador de elétrons juntamente com materiais nanoestruturados imobilizados sobre os eletrodos convencionais é uma abordagem que traz propriedades interfaciais interessantes [99,100]. Um mediador de elétrons é uma substância de baixa massa molecular, com propriedades redox e que, numa primeira etapa, interage com o substrato ou produto de uma determinada reação, sofrendo uma transferência de elétrons rápida sob um potencial substancialmente

menor do que aquele necessário para a eletrooxidação ou redução de um analito [101].

Os mediadores de elétrons precisam apresentar características desejáveis para que seja selecionado na modificação de eletrodos que são: transferência de elétrons rápida entre mediador-analito e mediador-eletrodo, potencial formal de baixos valores para evitar a oxidação de possíveis espécies interferentes, apresentar comportamento eletroquímico reversível e estabilidade das formas reduzida e oxidada [102].

As características mencionadas já foram exploradas empregando vários tipos de mediadores, como: quinonas [103,104], nanopartículas metálicas [105,106], complexos de metais de transição [107,108], corantes [109,110], etc. Nesse sentido, há relatos na literatura que as moléculas que apresentam o grupo funcional nitro (R-NO<sub>2</sub>) tem se destacado bastante nos últimos anos como estratégia para a formação de pares redox que se enquadram nas características desejáveis para um mediador [111].

No entanto, o grupo nitro em seu estado oxidado não apresenta atividade eletrocatalítica para a oxidação de tióis ou NADH [112]. Porém, quando esse grupo nitro é reduzido eletroquimicamente *in situ*, o mesmo é transformado no grupo hidroxilamina. Essa hidroxilamina formada pode ser oxidada para nitroso (par R-NO/R-NHOH), por meio de um processo redox envolvendo  $2e^-/2H^+$ , resultando em um par redox estável confinado na superfície do eletrodo e apresenta elevada constante cinética [111].

Há descrito na literatura a construção de sensor utilizando mediador de elétrons e NTC que foram co-imobilizados em matriz de biopolímero de quitosana (QUIT) e testado como uma plataforma nanoestruturada para detecção amperométrica de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) [113]. Nesse caso, algumas perguntas serão respondidas, como por exemplo: Porque um sensor para detecção de NADH. E porque o uso da QUIT para imobilização do mediador de elétrons e NTC.

A nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) é um cofator muito estudado devido à grande quantidade de enzimas desidrogenases dependentes de seu processo redox, e devido à sua importância como transportador de elétrons em células vivas. Atualmente, sabe-se que existem mais de 250 enzimas que dependem de NADH [114], dentre elas a glutatona redutase, que é importante no sistema de

defesa da célula. O papel desse cofator não-proteico em reações catalisadas por enzimas é servir comoceptor/doador de elétrons e com isso, acaba sendo crucial no transporte de elétrons em sistemas biológicos [115].

Já a QUIT é utilizada para superar a dificuldade de solubilidade e dispersão dos NTC em meio aquoso, sendo esta causada pela existência de forças intermoleculares presentes nos NTC. Devido a isso, diferentes estratégias [116,117,118] têm sido propostas para superar esse problema, uma das utilizadas para aumentar a solubilidade dos NTC é o uso de QUIT [119,120,121,122,123,124].

O uso da QUIT como matriz oferece algumas vantagens interessantes. A quitosana é um biopolímero, obtida a partir da reação de desacetilação da quitina (presente nas cascas de crustáceos e fungos). Apresenta uma grande variedade de uso em áreas como agricultura, medicina, alimentação e tratamento de esgoto; por ser biocompatível, biodegradável e apresentar baixa toxicidade. A quitosana possui propriedades químicas e biológicas distintas, pelo fato de apresentar grupos reativos de amino em sua cadeia de alta massa molecular e que são passíveis a modificações químicas. Adicionalmente, os grupos amino fazem com que a quitosana seja um dos poucos polieletrólitos catiônicos ( $pK_a = 6,5$ ) encontrados na natureza. Sua basicidade fornece propriedades únicas, sendo solúvel em meio aquoso ácido com pH inferior a 6,5 e, quando dissolvida, possui carga positiva devido aos grupos  $-NH_3^+$ , portanto, pode facilmente aderir-se a superfícies carregadas negativamente. Além de sua boa aderência, a quitosana apresenta uma excelente capacidade de formação de filmes. Assim, pode ser uma boa alternativa para o desenvolvimento de sensores químicos e biossensores devido à possibilidade de imobilizar enzimas e mediadores de elétrons orgânicos e inorgânicos[119,120,121,123,124].

## **I.6 Motivação**

Diante do exposto, o presente trabalho teve como motivação principal unir as propriedades eletrônicas e eletroquímicas dos nanotubos de carbono juntamente com o mediador de elétrons derivado do grupo nitro, o ácido 3,5-dinitrobenzoico para a construção de uma plataforma nanoestruturada com atividade eletrocatalítica para o NADH.

Nesse sentido, busca-se o desenvolvimento de dois biossensores amperométricos para a detecção da glutatona oxidada e glutatona total (GSH+GSSG) através do consumo de NADH, com o intuito da determinação da razão GSH/GSSG.



## II. OBJETIVOS



## II.1 Geral

O presente trabalho visa a construção de dois biossensores para a determinação da razão [GSH]/[GSSG], sendo um para a detecção da glutathiona oxidada, baseada na imobilização da enzima glutathiona redutase e outro para a detecção da glutathiona total (GSH+GSSG) através da imobilização das enzimas glutathiona redutase e glutathiona peroxidase. Ambas as imobilizações são realizadas sobre uma plataforma nanoestruturada com MWCNT, dispersos em quitosana ligada covalentemente a um mediador de elétrons; o ácido 3,5-dinitrobenzoico; que apresenta atividade eletrocatalítica para NADH.

## II.2 Específicos

- Construir um sensor amperométrico para a detecção de NADH.
- Realizar caracterização morfológica e eletroquímica desta plataforma.
- Obter as constantes cinéticas das reações interfaciais.
- Realizar a caracterização analítica do sensor.
- Imobilizar a enzima glutathiona redutase sobre uma plataforma nanoestruturada com MWCNT, dispersos em quitosana ligada covalentemente com o mediador de elétrons, o ácido 3,5-dinitrobenzoico, visando à detecção da glutathiona oxidada.
- Realizar as otimizações necessárias no processo de imobilização enzimática por meio da avaliação da sensibilidade do biossensor destinado para detecção da glutathiona oxidada.
- Determinar a faixa linear, sensibilidade, limite de detecção e quantificação do biossensor destinado para a detecção da glutathiona oxidada.
- Imobilizar as enzimas glutathiona redutase e glutathiona peroxidase sobre a plataforma nanoestruturada, visando à detecção da glutathiona total (GSH+GSSG).
- Determinar a faixa linear, sensibilidade, limite de detecção e quantificação do biossensor destinado para detecção da glutathiona total (GSH+GSSG).
- Realizar os testes de repetibilidade das determinações, da construção e estabilidade dos dois biossensores.



### **III. MATERIAIS E MÉTODOS**



### III.1 Reagentes e soluções

A glutationa na forma oxidada (GSSG), glutationa na forma reduzida (GSH), enzima glutationa redutase (GR), enzima glutationa peroxidase (GPx), NADH, MWCNT (obtido a partir do método catalítico de deposição química de vapor (do inglês, CVD), com diâmetro interno 2 - 6 nm e externo de 10 – 15 nm, comprimento 0,1 - 10  $\mu\text{m}$ , possuindo uma parede com espessura média de 5 – 15 camadas de grafeno, com 90 % de pureza, sendo livre de carbono amorfo e apresentando traços de impurezas metálicas), ácido 3,5-dinitrobenzoico (3,5 – ADNB), quitosana de alta massa molecular (QUIT), PIPES [piperazina-N-N-bis (ácido 2-etanosulfônico)], HEPES [N-(2-hidroxietil)piperazina-N-(ácido 2-etanosulfônico)], TRIS [tris(hidroximetil) amino-metano], 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodimida cloridrato (EDC), N-hidroxi succinimida (NHS), ferrocianeto de potássio, ferricianeto de potássio e peróxido de hidrogênio foram obtidos da Sigma, St. Louis, USA. Ácido acético ( $\text{H}_3\text{C-COOH}$ ), acetato de sódio ( $\text{H}_3\text{C-COONa}$ ), dihidrogenofosfato de sódio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), hidrogênio fosfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), cloreto de potássio (KCl) e etanol foram obtidos da Synth, São Paulo, Brasil. Alumina (suspensão aquosa de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  com tamanho de partícula de 0,3  $\mu\text{m}$ ) foi adquirida da empresa Fortel, São Paulo, Brasil.

Todas as soluções aquosas foram preparadas com água deionizada (Sistema Mili-Q de purificação de água, Millipore Inc., USA) com resistividade maior que 18  $\text{M}\Omega\text{ cm}^{-1}$ . Os valores de pH das soluções tampão foram ajustados com o auxílio de um pHmetro Corning, modelo 350, USA.

### III.2 Equipamentos

As medidas voltamétricas e cronoamperométricas foram realizadas em um potenciostato modelo PGSTAT-30 da Autolab Eco Chemie (Utrecht, Holanda) conectado a um computador utilizando o programa computacional GPES 4.9. Foi utilizada uma célula eletroquímica convencional de vidro com capacidade de 10,0 mL composta de três eletrodos, sendo um eletrodo de calomelano saturado (ECS) como referência, um fio de platina enrolado em forma helicoidal como eletrodo auxiliar e o eletrodo de trabalho de carbono vítreo (ECV, Metrohm), com área geométrica de 0,07  $\text{cm}^2$ . Para homogeneizar a solução do eletrólito de suporte após

a adição dos analitos (NADH,  $H_2O_2$ , GSSG e GSH) foi utilizado um agitador magnético da marca Corning com seis velocidades. A célula eletroquímica possui um local para a entrada de nitrogênio ( $N_2$ ), que serve para remover o oxigênio dissolvido.

O experimento utilizando o eletrodo de disco rotatório foi realizado por um equipamento de controle de rotação da Autolab acoplado ao ECV, sendo o mesmo rotacionado com velocidade de 250 rpm. Para o preparo da dispersão e limpeza do ECV foi empregado um banho de ultrassom da marca UNIQUE modelo USC-1400. Uma balança analítica Sartorius BP 211D, de cinco casas decimais, foi utilizada para pesar os reagentes.

### III.3 Limpeza do eletrodo de trabalho

Antes das modificações, o eletrodo de trabalho foi polido com uma pasta de alumina de 0,3  $\mu m$  para obter uma superfície espelhada, depois lavada com água destilada. O ECV foi levado ao banho de ultrassom em uma solução 1:1 (v/v) etanol/água por 5 minutos para remover possíveis partículas de alumina adsorvidas na superfície do eletrodo.

Para verificar se a superfície do ECV estava realmente limpa e pronta para ser modificada, realizaram-se medidas de voltametria cíclica em solução de hexacianoferrato (III/IV) de potássio 5,0 mmol  $L^{-1}$  em KCl 0,1 mol  $L^{-1}$ , na faixa de potencial de 0 a 450 mV vs ECS. O parâmetro de avaliação da efetividade da limpeza foi a diferença de potencial de pico,  $\Delta E_p$  ( $E_{pa} - E_{pc}$ , potencial de pico anódico e catódico, respectivamente) para o sistema  $Fe(CN)_6^{(3-/4-)}$ , com o valor de  $\Delta E_p = 59$  mV.

### III.4 Preparação da plataforma nanoestruturada no ECV

Para obter a dispersão de MWCNT-QUIT/3,5-ADNB, o seguinte procedimento foi adotado: 1,0 mg de MWCNT, 2,0 mg de EDC, 2,0 mg de NHS, 2,0 mg do mediador de elétrons (3,5-ADNB) e 100  $\mu L$  de etanol foram colocados no microtubo e em seguida foi levado ao banho de ultrassom por 30 minutos. Então, foram adicionados 900  $\mu L$  da solução de QUIT 0,5% (m/v) e novamente colocado no banho de ultrassom por 4 h. A solução de QUIT foi preparada em tampão acetato, 0,1 mol

$L^{-1}$ , pH = 4,7 [119]. O efeito da concentração de QUIT usada na preparação da dispersão com MWCNT foi avaliado através da medida da corrente de pico anódico ( $I_{pa}$ ) do par redox (R-NO/R-NHOH). Foram estudadas as seguintes concentrações de QUIT: 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 e 2,0 % (m/v). A concentração de QUIT que apresentou maior resposta ( $I_{pa}$ ) foi fixada e utilizada para os estudos posteriores. A modificação do ECV foi realizada da seguinte forma: uma alíquota de 5,0  $\mu$ L da dispersão MWCNT-QUIT/3,5-ADNB foi adicionada na superfície do ECV limpo e então a superfície do eletrodo foi seca em atmosfera de  $N_2$ .

As espécies hidroxilamina foram eletrogeradas *in situ* a partir do 3,5-ADNB após ciclar o potencial entre 0,2 e -0,4 V vs ECS, com velocidade de varredura de 10  $mV s^{-1}$ . Dois ciclos em solução tampão fosfato (PBS) 0,1  $mol L^{-1}$ , pH 7,0 foram suficientes para gerar o par redox nitroso/hidroxilamina. O potencial negativo foi suficiente para reduzir somente um único grupo nitro presente na molécula do 3,5-ADNB [111].

A área eletroativa do eletrodo modificado foi obtida utilizando uma solução de  $Fe(CN)_6^{(3-/4-)}$  1  $mmol L^{-1}$  em KCl 0,1  $mol L^{-1}$  empregando a equação de Randles Sevcik [125]. Assim a área eletroativa foi de aproximadamente 0,230  $cm^2$ .

### III.5 Construção do biossensor para detecção da glutatona oxidada

Depois do processo de ativação do eletrodo modificado descrito no item III.4, o eletrodo modificado foi seco em atmosfera de  $N_2$ . Em seguida, foram adicionados 5,0  $\mu$ L da solução da enzima glutatona redutase preparada em solução de quitosana e glutaraldeído 5 % (v/v) (solução estoque), em seguida a superfície do eletrodo modificado foi novamente seca em atmosfera de  $N_2$ . Foram realizados estudos de otimização da concentração de quitosana e da concentração enzimática utilizadas no preparo do biossensor, visando o melhor desempenho deste.

#### III.5.1 Otimização no processo de imobilização enzimática

Primeiramente, uma solução de glutaraldeído 5% (v/v) foi preparada e mantida na geladeira. Para a preparação da solução enzimática a quantidade de glutaraldeído utilizada foi mantida fixa em 2,0  $\mu$ L. A fim de obter a melhor condição de preparação e desempenho do biossensor, uma otimização da concentração enzimática, da concentração de quitosana utilizada na preparação da solução

enzimática e da concentração de NADH no eletrólito de suporte foram realizadas. A influência de cada parâmetro foi verificada analisando a sensibilidade do biossensor obtida por meio da resposta cronoamperométrica, após adições sucessivas de GSSG (solução padrão) em PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0 e em potencial aplicado de 50 mV vs ECS.

### **III.5.1.1 Influência da concentração enzimática**

A influência da concentração da enzima glutatona redutase no processo de imobilização foi estudada. As concentrações avaliadas da enzima foram: 0,0; 13,8; 30,0; 60,0; 90,0; 120,0 g L<sup>-1</sup>. Estas concentrações correspondem a 0,0; 10,0; 25,0; 50,0; 75,0; 100,0 unidades (U) de enzima, para um volume de 5,0 µL adicionado no eletrodo.

### **III.5.1.2 Concentração de quitosana**

A concentração de quitosana estudada para a preparação da solução enzimática variou de 5,0x10<sup>-5</sup> até 5,0x10<sup>-3</sup> % (m/v), sendo essas concentrações obtidas partir de uma solução estoque de quitosana 0,5% (m/v). Essas porcentagens correspondem a 0,5; 1,0; 2,5 e 5,0 µg mL<sup>-1</sup> de quitosana. Essa solução estoque de quitosana foi preparada em tampão acetato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH = 4,7.

### **III.5.1.3 Concentração de NADH no eletrólito de suporte**

As concentrações avaliadas de NADH no eletrólito de suporte variaram de 150 até 1000 µmol L<sup>-1</sup>.

Assim, após alcançar as melhores condições de preparação e desempenho do biossensor, determinou-se a faixa linear, sensibilidade, limite de detecção e quantificação do mesmo.

## **III.5.2 Estudo da repetibilidade das determinações, da construção e estabilidade do biossensor**

A repetibilidade das determinações do biossensor à base da enzima glutatona redutase foi obtida monitorando a variação da corrente ( $\Delta I$ ) por cronoamperometria na presença de 7,0 µmol L<sup>-1</sup> de GSSG (solução padrão) para

quatro amostras e calculado o desvio padrão relativo (DPR). Já a repetibilidade da construção do biossensor foi avaliada empregando as mesmas condições descritas acima, usando a resposta de quatro biossensores diferentes, modificados seguindo o mesmo procedimento.

A estabilidade do biossensor foi avaliada realizando várias determinações consecutivas de  $7,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de GSSG (solução padrão) com o mesmo biossensor e os valores de  $\Delta I$  obtidos foram comparados. O tempo de vida do biossensor foi avaliado fazendo três adições (média) por dia para  $7,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de GSSG (solução padrão).

### **III.6 Construção do biossensor para a detecção da glutatona total (GSH+GSSG)**

Depois do processo de ativação do eletrodo modificado descrito no item III.4, o eletrodo modificado foi seco em atmosfera de  $\text{N}_2$ . Então, foram adicionados  $5,0 \mu\text{L}$  da solução das enzimas glutatona redutase e glutatona peroxidase preparada em solução de quitosana  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  e glutaraldeído 5 % (v/v) (solução estoque), em seguida a superfície do eletrodo modificado foi novamente seca sob atmosfera de  $\text{N}_2$ .

#### **III.6.1 Estudo da repetibilidade das determinações, da construção e estabilidade do biossensor**

A repetibilidade das determinações do biossensor à base da enzima glutatona redutase e glutatona peroxidase foi obtida monitorando a variação da corrente ( $\Delta I$ ) por cronoamperometria na presença de  $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de GSH+GSSG (solução padrão) para quatro amostras e calculado o desvio padrão relativo (DPR). Já a repetibilidade da construção do biossensor foi avaliada empregando as mesmas condições descritas acima, usando a resposta de quatro biossensores diferentes, modificados seguindo o mesmo procedimento.

A estabilidade do biossensor foi avaliada realizando várias determinações consecutivas de  $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de GSH+GSSG (solução padrão) com o mesmo biossensor e os valores de  $\Delta I$  obtidos foram comparados. O tempo de vida do

biossensor foi avaliado fazendo três adições (média) por dia para  $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de GSH+GSSG (solução padrão).

### **III.7 Micrografias**

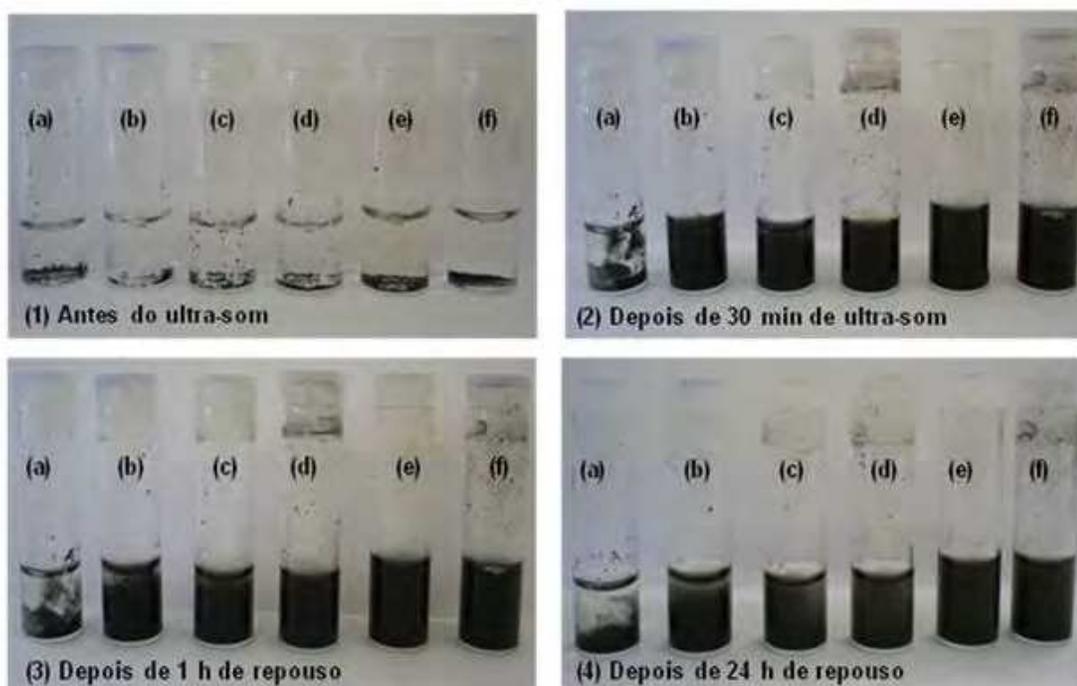
As micrografias foram obtidas utilizando um microscópio eletrônico de varredura (MEV) JEOL JSM-5610LV. As amostras foram preparadas sobre porta amostra utilizando as mesmas condições empregadas no item III.4. As micrografias foram obtidas para as dispersões de MWCNT com diferentes concentrações de QUIT e para a condição otimizada que foi utilizada na preparação da plataforma nanoestruturada.

## **IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO**



## IV.1 Estabilidade, caracterização morfológica e otimização da dispersão

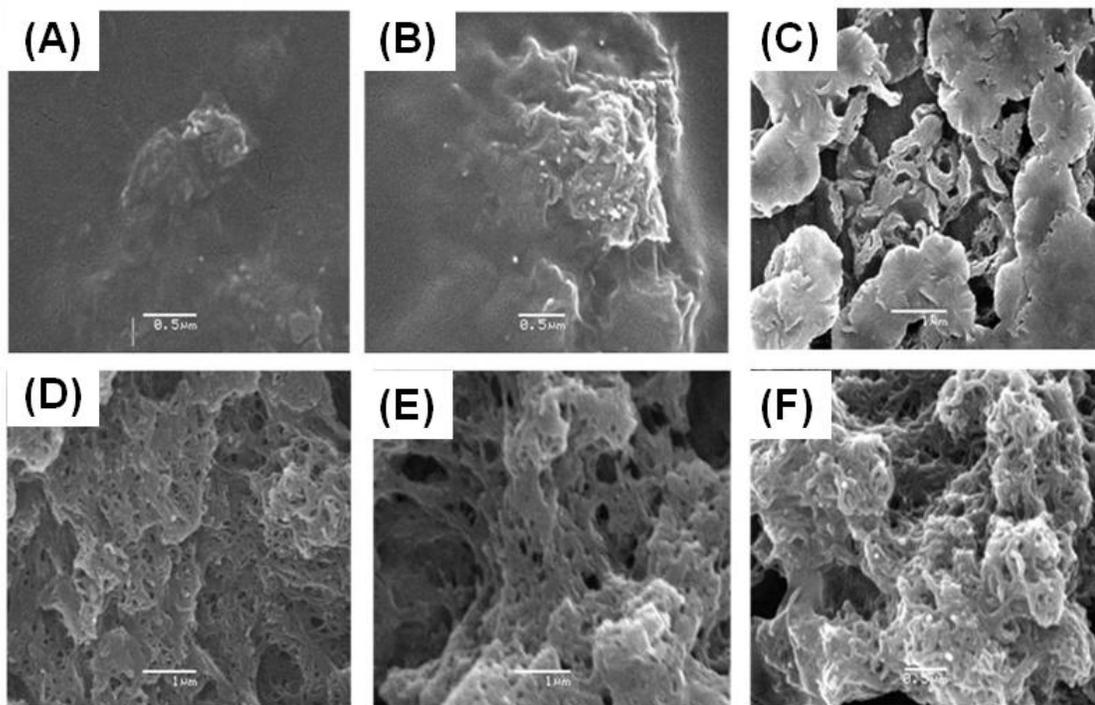
A **Figura IV.1** ilustra fotos das soluções de MWCNT em diferentes concentrações de quitosana, considerando as etapas antes do banho de ultrassom, depois de 30 min do banho de ultrassom, depois de 1 h e 24 h de repouso, sendo possível avaliar a homogeneidade e estabilidade das dispersões. Analisando a etapa (2) da **Figura IV.1** pode ser observado uma dispersão homogênea e que não há diferença significativa na estabilidade entre as mesmas. Entretanto, pode ser observado que a solução (a) para as etapas (2), (3) e (4) não apresenta uma dispersão homogênea entre os MWCNT-QUIT com maior concentração de quitosana, isso pode estar relacionado com a elevada viscosidade da solução de quitosana que dificulta a obtenção de uma dispersão completamente homogênea.



**Figura IV.1.** Fotos das soluções de MWCNT em diferentes concentrações de quitosana considerando as etapas (1) antes do ultra-som, (2) depois de 30 min de ultra-som, (3) depois de 1 h de repouso e (4) depois de 24 h de repouso. As soluções empregadas foram: (a) MWCNT-QUIT 2,0%, (b) MWCNT-QUIT 1,0%, (c) MWCNT-QUIT 0,75%, (d) MWCNT-QUIT 0,5%, (e) MWCNT-QUIT 0,25%, (f) MWCNT-QUIT 0,1%.

A contribuição da quitosana para a excelente dispersão e estabilidade das soluções (b), (c), (d), (e) e (f) da **Figura IV.1** nas etapas (3) e (4) é devido a presença de grupos amino protonados que estão presentes na quitosana, minimizando as interações hidrofóbicas e forças intermoleculares dos nanotubos [126].

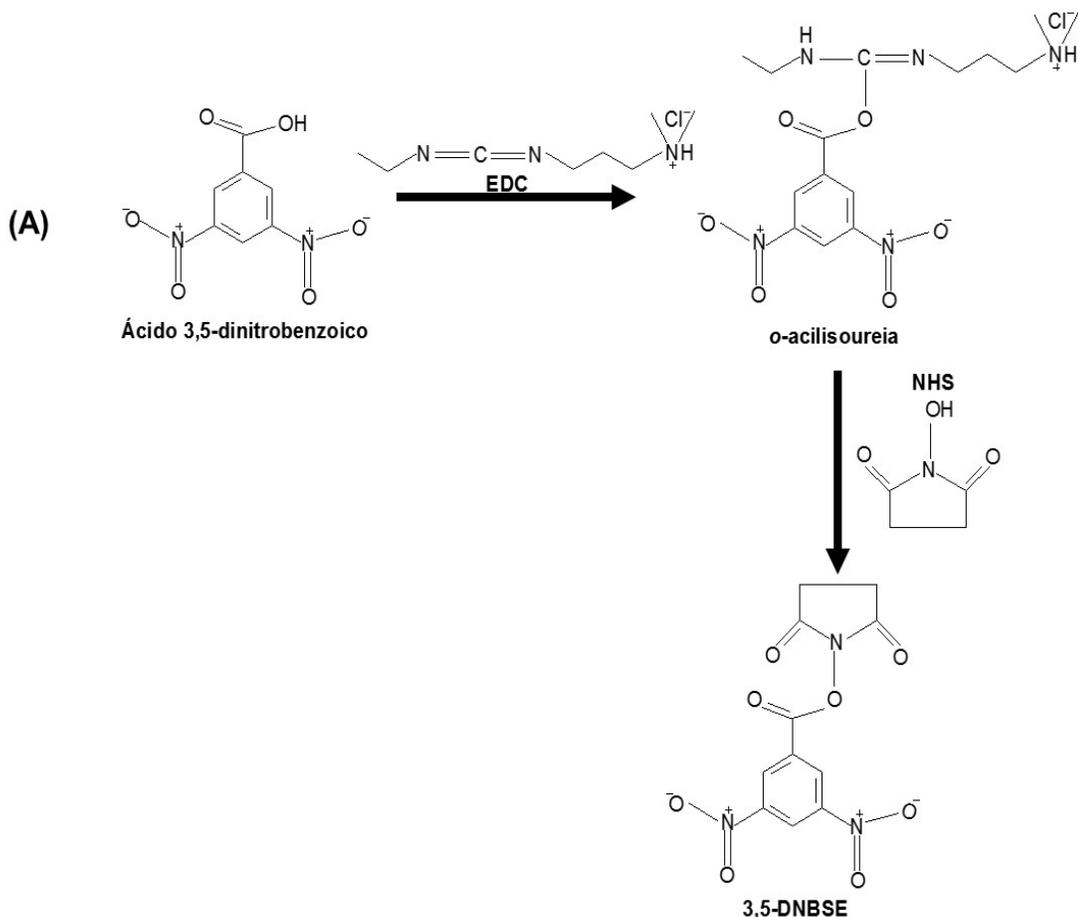
A **Figura IV.2** mostra as micrografias do MEV da plataforma nanoestruturada baseada nas dispersões de MWCNT-QUIT nas diferentes concentrações e com ampliações de 40 k $\times$ . As micrografias ilustradas na **Figura IV.2** (A), (B) e (C) mostram placas de quitosana sobre os MWCNT. A partir da **Figura IV.2** (D), (E) e (F), pode ser observado que os MWCNT estão densamente empacotados e eficientemente trapeados na rede polimérica fornecendo uma matriz ideal para receber mediadores de elétrons ou enzimas.

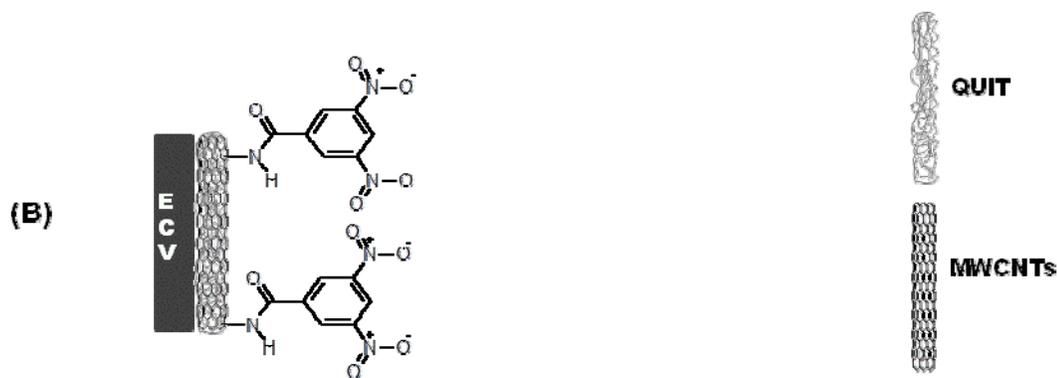


**Figura IV.2.** Micrografias obtidas da plataforma nanoestruturada contendo MWCNT-QUIT todas com ampliações de 40 k $\times$  e nas seguintes concentrações de QUIT: (A) MWCNT-QUIT 2,0 %, (B) MWCNT-QUIT 1,0 %, (C) MWCNT-QUIT 0,75 %, (D) MWCNT-QUIT 0,5 %, (E) MWCNT-QUIT 0,25 %, (F) MWCNT-QUIT 0,1 %.

Sendo assim, a imobilização do mediador redox na superfície do ECV foi realizada através da ligação química entre os grupos carboxílicos do mediador de

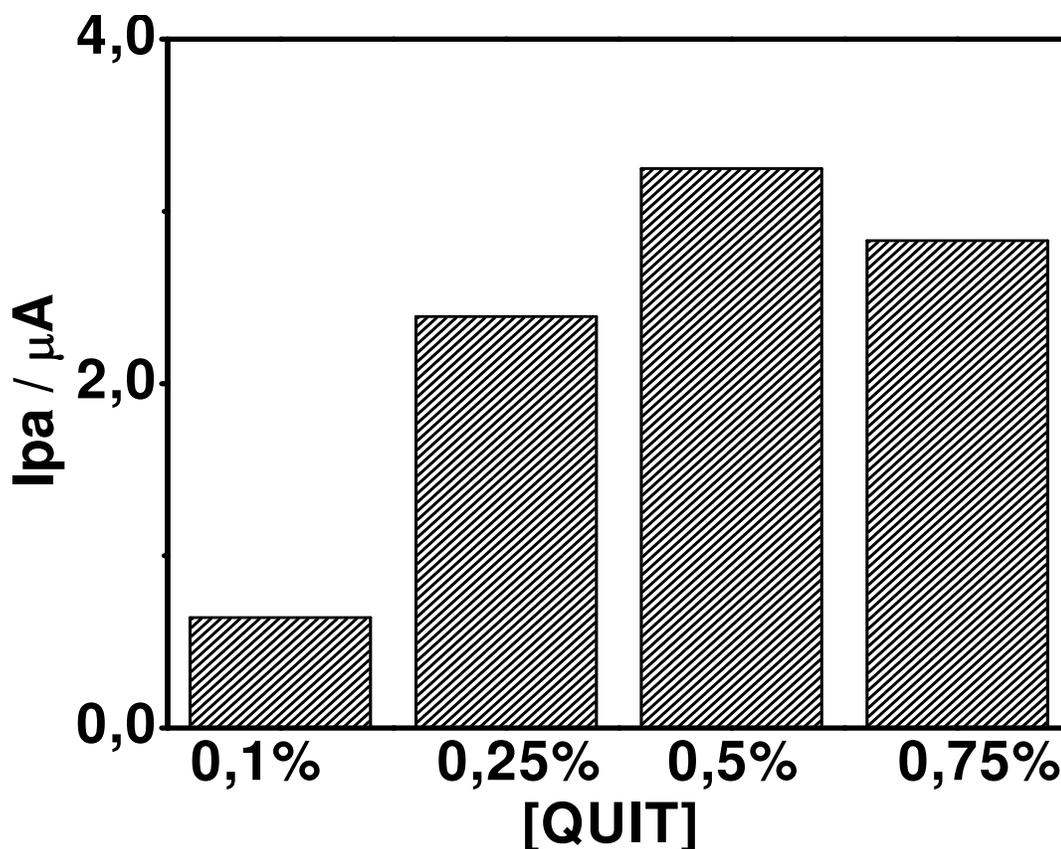
elétrons e os grupos amino da QUIT utilizando como catalisador da reação o sistema EDC/NHS. O sistema EDC/NHS é amplamente utilizado na literatura para ligar um grupo R-COOH com uma função R-NH<sub>2</sub> através da formação de uma amida [127,128]. O EDC reage com o grupo carboxil do 3,5-ADNB, formando um intermediário (*o*-acilisourea). Além disso, o EDC favorece a ligação do grupo carboxil com o NHS, formando um intermediário mais reativo derivado do grupo succinimidil-éster [128], permitindo uma conjugação mais eficiente e uma ligação amida estável. Assim, a **Figura IV.3** (A) e (B) mostra a formação do intermediário (3,5-DNBSE) a partir do grupo R-COOH do 3,5-ADNB e o mediador de elétrons imobilizado na superfície do ECV, respectivamente.





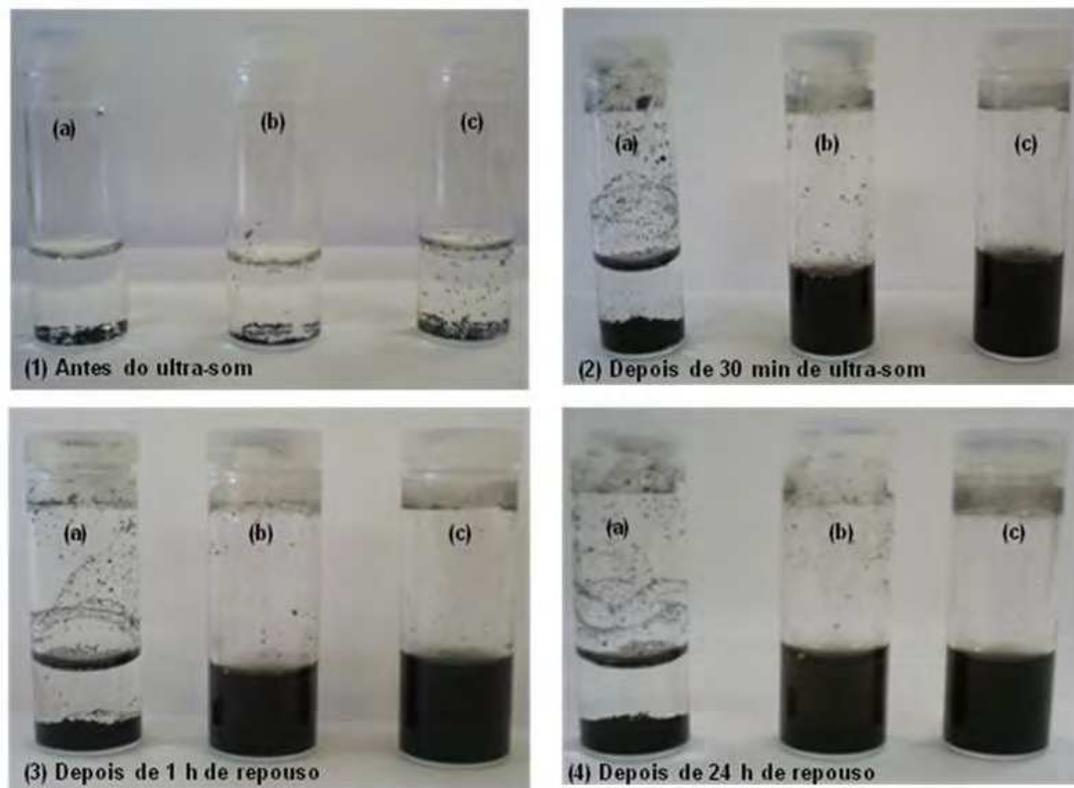
**Figura IV.3.** (A) Esquema de formação do intermediário 3,5-DNBSE a partir de uma solução contendo 3,5-ADNB, EDC e NHS. (B) Mediador de elétrons imobilizado na superfície do EVC.

Em seguida foi estudada a melhor condição da preparação do eletrodo por meio da influência da concentração de QUIT a ser utilizada na dispersão. Foram empregadas quatro dispersões contendo MWCNT, EDC, NHS, 3,5-ADNB, etanol e QUIT. Esse estudo foi realizado através do monitoramento da corrente de pico anódico do par redox presente no mediador, 3,5-ADNB-at (R-NO/R-NHOH), em função das concentrações de quitosana, sendo que a concentração de QUIT que apresentou a maior resposta de corrente de pico foi a de 0,5%, como é observado no gráfico de barras da **Figura IV.4**. Para as concentrações de QUIT 2,0% e 1,0% não foi possível realizar o experimento, devido à elevada viscosidade da dispersão, impossibilitando a modificação da superfície do eletrodo. Diante disso, a concentração de QUIT empregada para os estudos posteriores foi a de 0,5%.



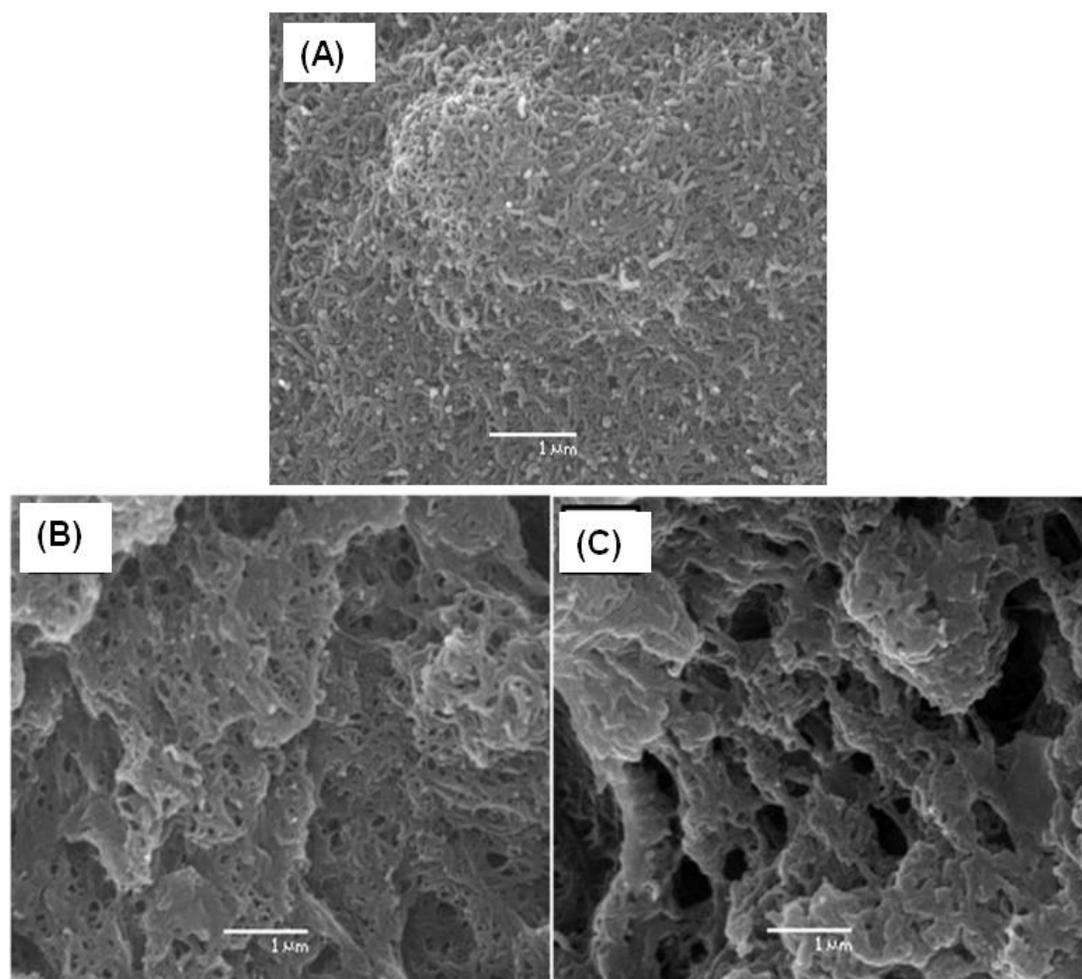
**Figura IV.4.** Gráfico de barras da otimização da concentração de quitosana em função corrente de pico anódico do par redox R-NO/R-NHOH em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0 e  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ .

A **Figura IV.5** ilustra fotos comparando a estabilidade das soluções dos MWCNT em água (a) com as soluções de MWCNT em QUIT 0,5% para a dispersão MWCNT-QUIT 0,5% (b) e para a dispersão de MWCNT-QUIT/3,5-ADNB-at (c), a qual foi utilizada na modificação da superfície do ECV. Analisando as etapas (2), (3) e (4) da **Figura IV.5** pode ser observado uma dispersão completamente homogênea e com uma excelente estabilidade, exceto para a solução (a). Isso ocorre devido à insolubilidade dos MWCNT em solventes aquosos [129].



**Figura IV.5.** Fotos das soluções de (a) MWCNT em água, (b) MWCNT-QUIT e (c) MWCNT-QUIT/3,5-ADNB-at considerando as etapas (1) antes do ultra-som, (2) depois de 30 min de ultra-som, (3) depois de 1 h de repouso e (4) depois de 24 h de repouso.

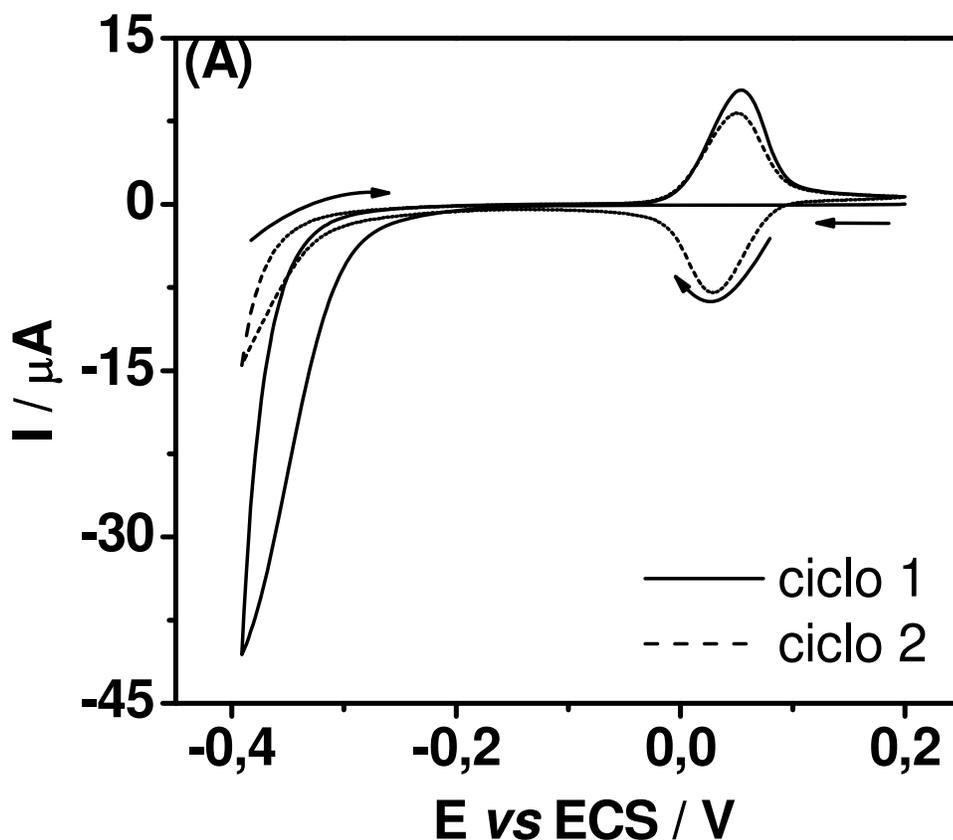
A morfologia da superfície do ECV modificado com a dispersão dos MWCNT em dimetil formamida, MWCNT-QUIT e MWCNT-QUIT/3,5-ADNB-at foram investigadas por MEV, como mostrado na **Figura IV.6**. A micrografia da **Figura IV.6** (A) mostra um comportamento típico de distribuição de MWCNT sem qualquer tipo de modificação. No entanto, a **Figura IV.6** (B) mostra os MWCNT dispersos em QUIT, como pode ser observado os MWCNT estão densamente empacotados e eficientemente envolvidos na rede polimérica, apresentando uma excelente distribuição do material sobre a superfície, fornecendo assim, uma matriz ideal para receber mediadores de elétrons ou enzimas. A **Figura IV.6** (C) mostra que a imobilização do mediador de elétrons não alterou significativamente a morfologia do material.



**Figura IV.6.** Micrografias de MEV com ampliação de 40k $\times$ : (A) MWCNT sem modificação, (B) MWCNT-QUIT e (C) MWCNT-QUIT/3,5-ADNB-at.

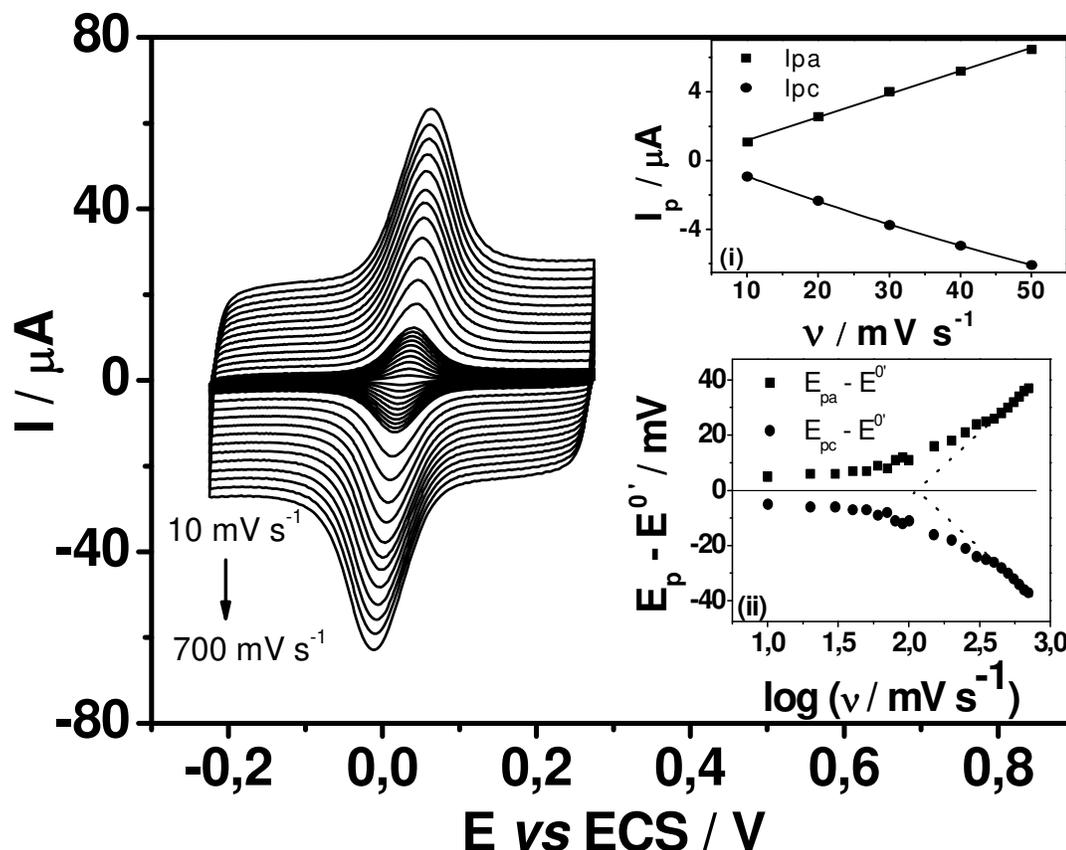
## IV.2 Ativação e caracterização do par redox

Após o 3,5-ADNB estar quimicamente ligado nos grupos amino da QUIT, o par redox R-NO/R-NHOH foi eletrogerado *in situ* através de uma ciclagem do potencial entre 0,2 e -0,4 V vs ECS em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0 e velocidade de varredura ( $v$ ) de 10 mV s<sup>-1</sup>. Como pode ser observado na **Figura IV.7** (A), 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 como reportado por Kubota e colaboradores [111].



**Figura IV.7.** (A) Voltamogramas cíclicos da formação do par redox R-NO/R-NHOH solução PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0 empregando  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$  para o ECV+MWCNT-QUIT/3,5-ADNB-at.

Depois do processo de ativação, uma faixa de potencial ao redor do par redox foi selecionada usando as mesmas condições do processo de ativação e foram obtidos voltamogramas cíclicos em várias velocidades de varredura ( $10\text{-}700 \text{ mV s}^{-1}$ ) mostrados na **Figura IV.8**. Nesta figura podem ser observados voltamogramas cíclicos bem definidos e persistentes indicando que o 3,5-ADNB foi ligado com sucesso na superfície do eletrodo. A **Figura IV.8** (i) mostra um gráfico de corrente de pico em função da velocidade de varredura obtido a partir dos voltamogramas cíclicos. O gráfico de corrente de pico anódica e catódica apresentou um comportamento linear em função da velocidade de varredura, indicando assim, que o 3,5-ADNB-ativado apresenta um comportamento eletroquímico característico de espécies redox que estão confinadas na superfície do eletrodo [125].



**Figura IV.8.** Voltamogramas cíclicos do par R-NO/R-NHOH em várias velocidades de varredura após o processo de ativação. *Gráfico inserido:* (i)  $I_p$  vs.  $v$ . (ii) Gráfico de Laviron. Medidas realizadas em solução PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0.

Com o objetivo de se obter informações importantes sobre o ECV+MWCNT-QUIT/3,5-ADNB-at, como o valor do coeficiente de transferência de elétrons ( $\alpha$ ), o número de elétrons envolvidos no processo redox ( $n$ ) e a constante de velocidade heterogênea de transferência de elétrons ( $k_s$ ), foram empregadas às expressões formuladas por Laviron [130], para as respostas voltamétricas de varredura linear de potencial, no caso de espécies eletroativas confinadas na superfície do eletrodo da seguinte forma: quando  $\Delta E_p > 200/n$  mV:

$$\frac{\alpha}{1-\alpha} = \frac{v_a}{v_c} \quad \alpha/(1-\alpha) = v_a/v_c \quad \text{Equação IV.1}$$

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

onde  $F$  é a constante de Faraday,  $n$  é o número de elétrons,  $RT$  apresentam seus valores usuais, e  $v_c$  e  $v_a$  representam as velocidades de varredura no intercepto das linhas retas do processo catódico e anódico, respectivamente. A **Figura IV.8** (ii) exibe o gráfico de Laviron, onde  $\Delta E = E_p - E^0$  ( $E_p$  é o potencial de pico e  $E^0$  é o potencial formal [ $E^0 = (E_{pa} + E_{pc})/2$ ]) é função do log da velocidade de varredura ( $v$ ). Como pode ser observado, quando ( $v \rightarrow 0$ ) o valor de  $\Delta E_p$  são praticamente independente do log da velocidade de varredura sugerindo uma cinética de transferência de elétrons 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, conforme proposto pela teoria de Laviron [130].

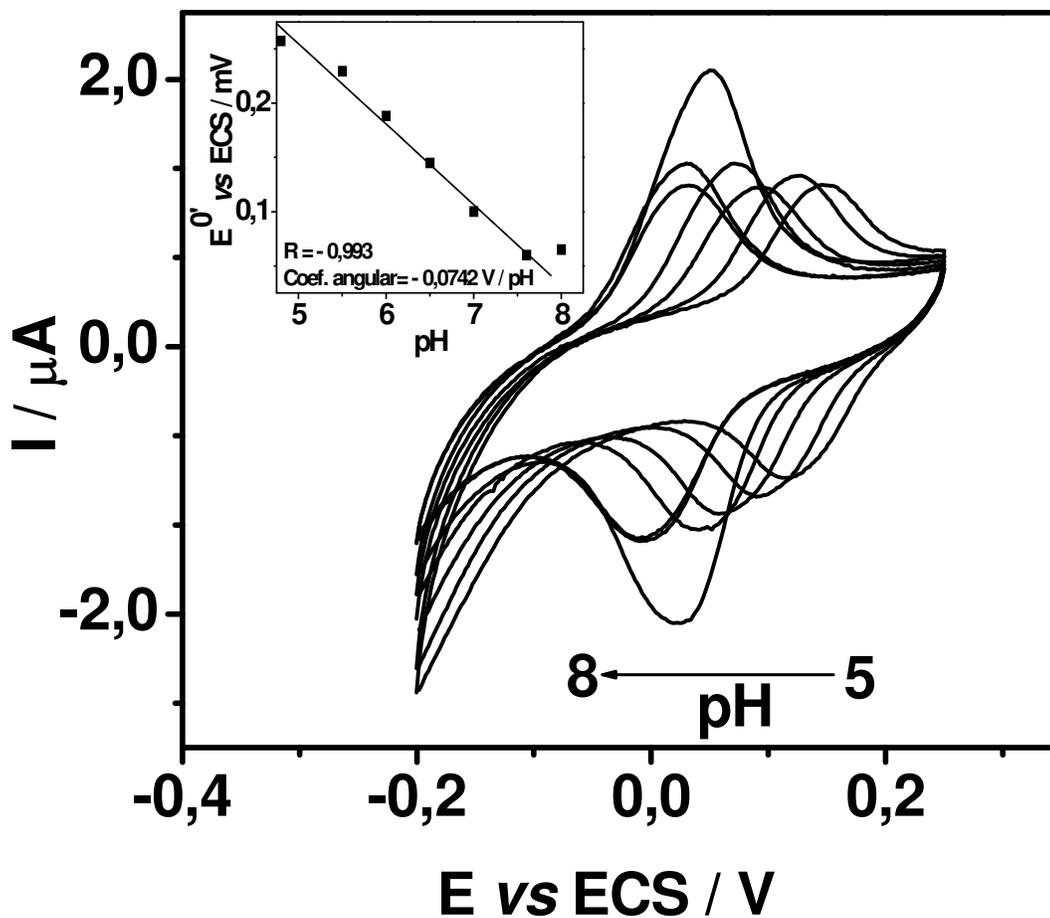
A partir da extrapolação das retas para  $\Delta E_p = 0$  (linha horizontal na **Figura IV.8** (ii)) o valor de  $\alpha = 0,5$  foi obtido empregando a **Equação IV.1**. Utilizando os valores dos coeficientes angulares das retas, para ambos os processos anódico  $2,3RT/(1 - \alpha)nF$  e catódico  $-2,3RT/\alpha nF$ , respectivamente, o valor de  $n = 2,3$  foi encontrado. O valor obtido foi muito próximo do valor esperado de 2 elétrons para o processo redox nitroso/hidroxilamina [131].

Além disso, utilizando a **Equação IV.2**, o valor de  $k_s$  foi calculado empregando as velocidades de varredura onde  $\Delta E_p = 0$ , sendo obtido o valor de  $14 \text{ s}^{-1}$ . O valor obtido para a constante é superior quando comparado com alguns trabalhos de modificação de eletrodos reportados na literatura, com exceção para o eletrodo modificado com catalisador de Doyle [132], conforme apresentado na **Tabela IV.1**. A rápida transferência de elétrons entre o mediador redox e a superfície do ECV deve estar relacionado ao fato dos nanotubos de carbono apresentarem uma elevada condutividade elétrica ( $\sim 10^6 \text{ S m}^{-1}$ ), facilitando assim a transferência eletrônica no ECV+MWCNT-QUIT/3,5-ADNB-at [91].

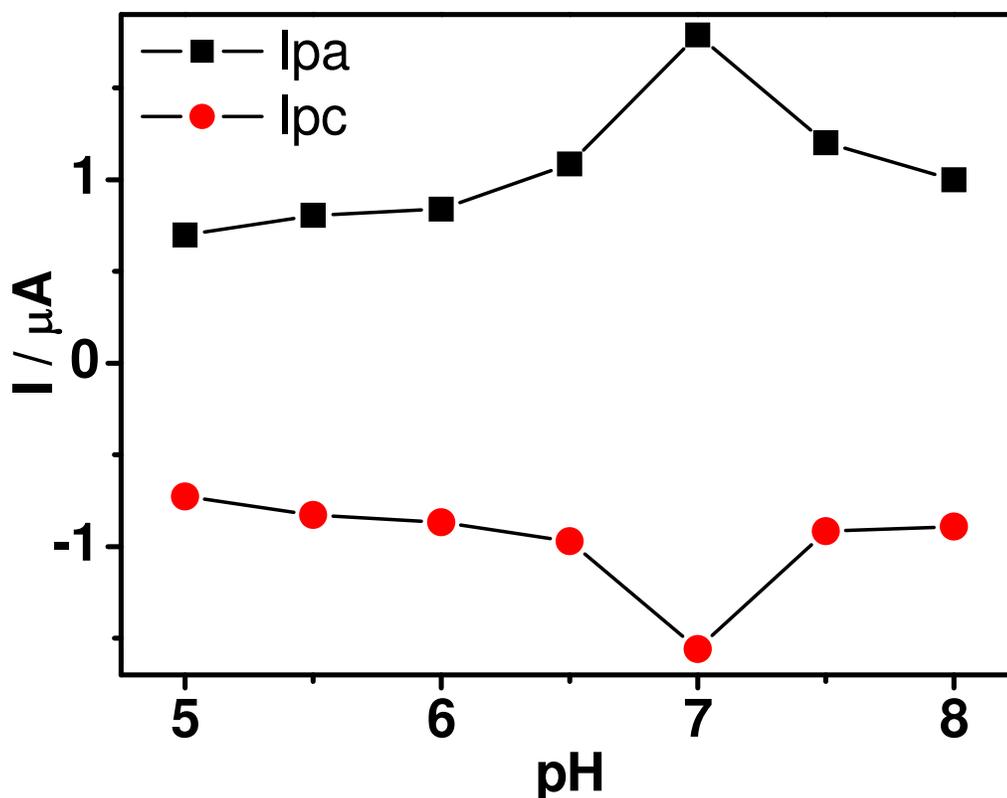
**Tabela IV.1.** Parâmetros eletroquímicos e cinéticos de alguns eletrodos modificados

<b>Eletrodo modificado</b>	<b><math>\alpha</math></b>	<b>n</b>	<b><math>k_s / s^{-1}</math></b>
Catalisador de Doyle [132]	0,22	-	17,0
Violeta de pirocatecol [133]	0,49	-	5,30
MWCNT-PVP/Cu <sup>2+</sup> [117]	0,50	1,04	5,78
MWCNT com poli(2-metóxi-4-vinilfenol) [116]	0,50	1,83	7,63
Tetrabromo-p-benzoquinona [134]	0,55	2,00	3,80
4-Nitroftalonnitrila [135]	0,50	2,30	9,70
Azul de meldola [136]	0,51	-	5,3
Este trabalho	0,50	2,30	14,0

Após as caracterizações do par redox em função da velocidade de varredura, o perfil voltamétrico do eletrodo modificado com 3,5-ADNB-at foi caracterizado em vários valores de pH (5,0 a 8,0) por voltametria cíclica. Como pode ser observado na **Figura IV.9**, o potencial formal ( $E^0$ ) sofre um deslocamento em função do pH e, esse deslocamento, pode ser analisado de maneira mais criteriosa obtendo-se um gráfico de  $E^0$  vs pH. Como pode ser visto no gráfico inserido na **Figura IV.9**, o coeficiente angular ( $E^0 / \text{pH}$ ) é de 74,2 mV/pH na faixa de pH estudada. É possível observar que não há um deslocamento no  $E^0$  entre os valores de pH 7,5 e 8,0, indicando que a partir desses valores de pH o par redox não sofre nenhuma alteração. Este coeficiente angular é próximo para reações onde a razão  $e^-/H^+$  é igual a um ( $59,2 (n_p/n_e)$ ) mV/pH onde  $n_p = n_e$  a 25 °C [137]. 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. A partir dos voltamogramas cíclicos obtidos na **Figura IV.9**, foi possível construir um gráfico com os valores de corrente de pico anódica e catódica em função do pH (**Figura IV.10**). Como pode ser observado a corrente de pico que apresenta maior valor é para o pH 7,0. Outro ponto interessante sobre o par redox R-NO/R-NHOH é que a maior resposta é normalmente observada em torno de pH 7,0, o que está em boa concordância com o pH ótimo da enzima glutatona redutase [138]. Portanto, para os estudos posteriores optou-se por utilizar um eletrólito de suporte em pH 7,0.



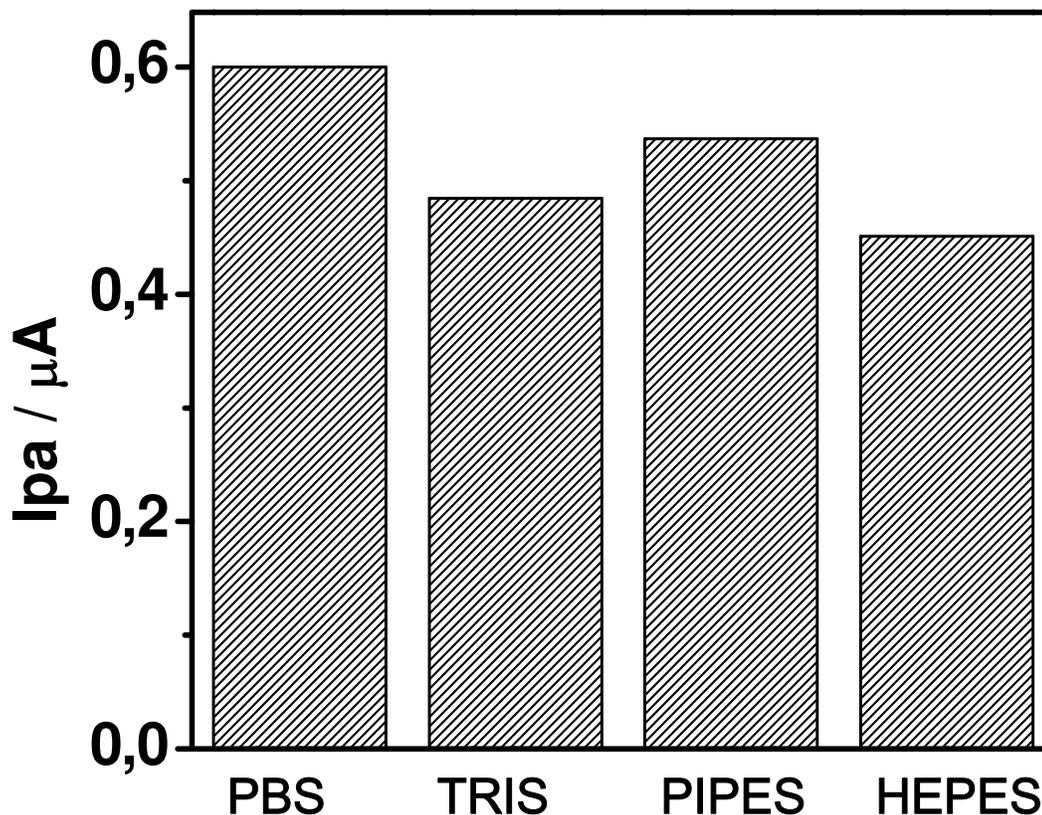
**Figura IV.9.** Voltamogramas cíclicos obtidos em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> para o eletrodo modificado com o 3,5-ADNB-at em diferentes valores de pH (5,0-8,0) e  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ . Gráfico inserido:  $E^{0'}$  vs pH.



**Figura IV.10.** Influência do valor de pH da solução na corrente de pico anódica e catódica do mediador de elétrons a partir de voltamogramas cíclicos adquiridos em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ .

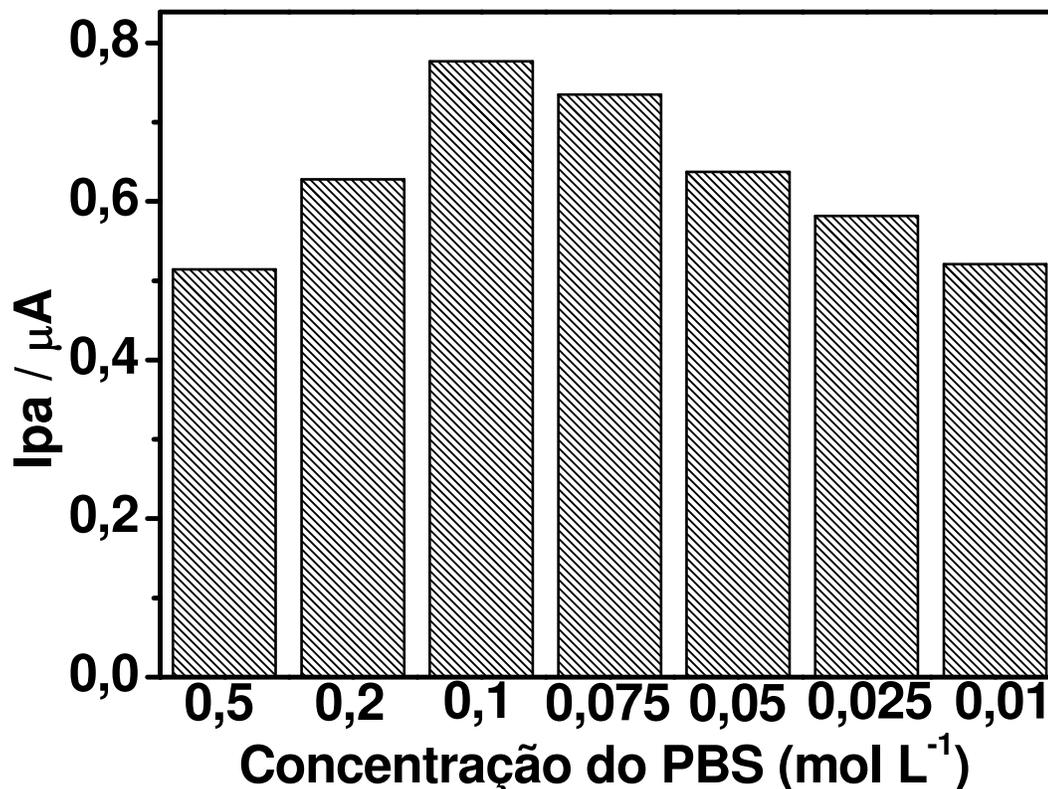
O efeito da natureza do eletrólito de suporte no desempenho do ECV+MWCNT-QUIT/3,5-ADNB-at também foi avaliado. Para isso, foram selecionados quatro eletrólitos de suporte, todos em pH 7,0 e concentração  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ .

A **Figura IV.11** mostra a influência do tipo de eletrólito suporte no valor de  $I_{pa}$ . Como pode ser observado, o ECV+MWCNT-QUI/3,5-ADNB-at apresenta um valor de  $I_{pa}$  muito maior em tampão fosfato, seguida por PIPES, TRIS e HEPES. Como pode ser observado na **Figura IV.11**, a resposta do ECV+MWCNT-QUI/3,5-ADNB-at foi maior para o tampão fosfato, isso pode ser devido ao tampão fosfato apresentar uma pequena estrutura e ser totalmente inorgânico, isso, possivelmente facilita a sua difusão pela plataforma. Assim, este tampão foi selecionado para os estudos subsequentes.



**Figura IV.11.** Influência da natureza do tampão na corrente de pico do par R-NO/R-NHOH. Condições empregadas: concentração  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ .

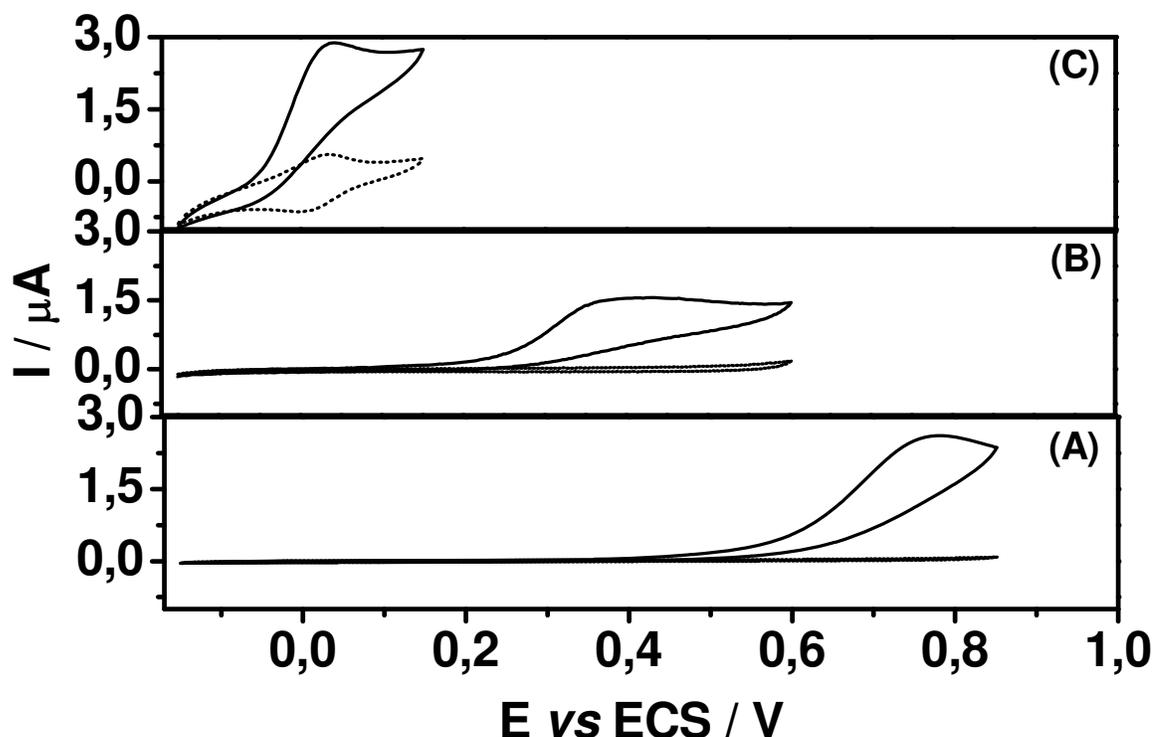
Por fim, realizou-se o estudo do efeito da concentração do tampão fosfato de sódio, pH 7,0, no desempenho do ECV+MWCNT-QUIT/3,5-ADNB-at. Como pode ser observado na **Figura IV.12** o valor de  $I_{pa}$  para o processo R-NO/R-NHOH aumenta com o aumento da concentração do eletrólito de suporte, até atingir um máximo em  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Em concentrações superiores a esta, há um pequeno decaimento no valor de  $I_{pa}$ . Assim,  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de PBS com pH 7,0, foi selecionado como a melhor condição para os estudos posteriores.



**Figura IV.12.** Influência da concentração do tampão fosfato na corrente de pico do par R-NO/R-NHOH. Condições empregadas: pH 7,0 e  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ .

### IV.3 Atividade eletrocatalítica da plataforma nanoestruturada

A construção de plataformas nanoestruturadas visa à melhoria dos processos interfaciais podendo trazer inúmeras vantagens ao sensor e/ou biossensor. Diante disso, 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, como reportado na literatura [139]. Desta forma, para a elucidação da atividade eletrocatalítica da plataforma nanoestruturada contendo o 3,5-ADNB-ativado para a detecção de NADH foram obtidos voltamogramas cíclicos na presença de NADH. Os voltamogramas cíclicos foram obtidos após cada etapa de montagem da plataforma nanoestruturada. O processo associado com a oxidação eletroquímica do analito pode ser observado nos voltamogramas cíclicos da **Figura IV.13**.

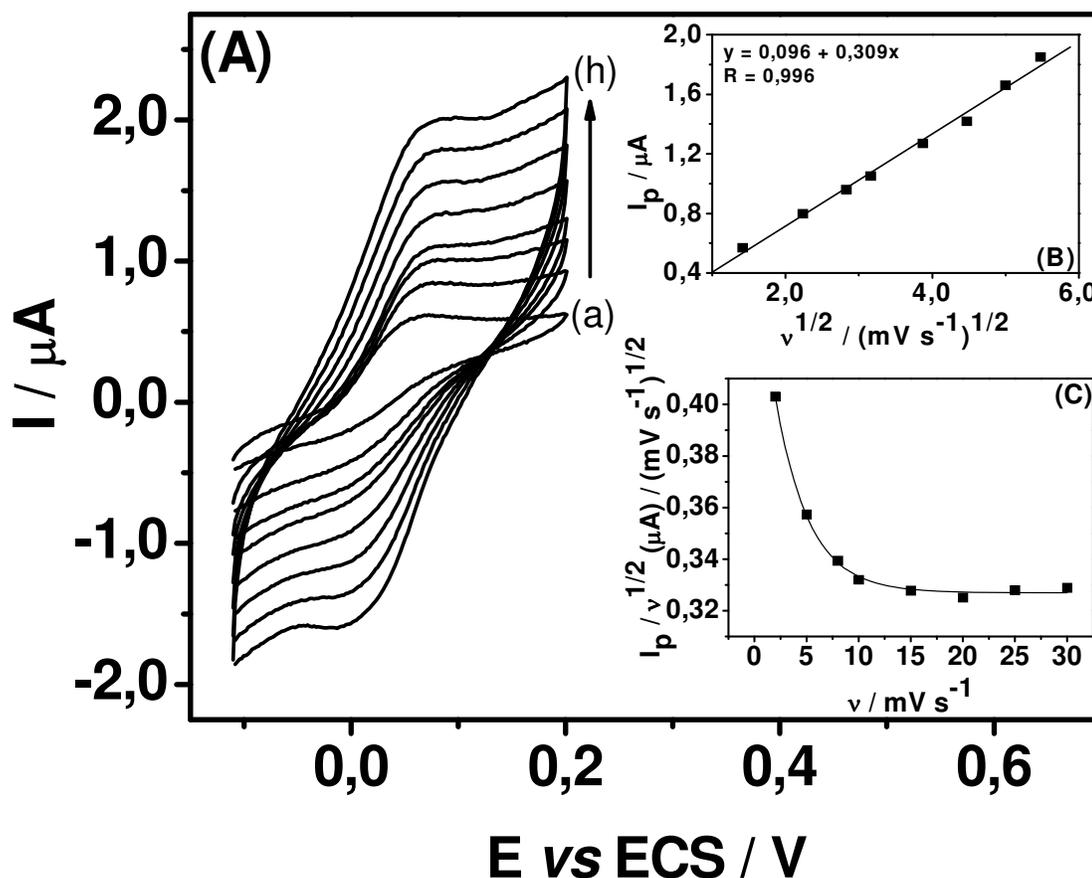


**Figura IV.13.** Voltamogramas cíclicos obtidos em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 e  $v = 2 \text{ mv s}^{-1}$  na ausência de NADH (linha pontilhada) e na presença de NADH  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  (linha contínua) para (A) ECV não modificado, (B) ECV modificado com MWCNT-QUIT e (C) ECV modificado com MWCNT-QUIT/3,5-ADNB-at.

Como pode ser observado na **Figura IV.13** (A), com o ECV não modificado e na ausência do NADH obteve-se um perfil voltamétrico típico do ECV, onde nenhum pico de oxidação e/ou redução é observado. Já na presença de NADH é observado que a oxidação ocorre em sobrepotenciais elevados, com um potencial de pico em aproximadamente 773 mV. Já o eletrodo modificado com a dispersão de MWCNT-QUIT (**Figura IV.13** (B)) mostra um deslocamento catódico substancial do potencial de pico anódico, aproximadamente 368 mV. Estes resultados confirmam que mesmo na presença de quitosana, os MWCNT mantiveram sua reatividade química, porém há uma diminuição na corrente, possivelmente devido à quitosana não ser condutora dificultando o processo difusional do NADH. Além disso, quando o 3,5-ADNB-ativado está ligado na plataforma, um decréscimo drástico do potencial de oxidação (cerca de 732 e 327 mV em relação ao ECV e ao ECV+MWCNT-QUIT, respectivamente),

um incremento de corrente e um perfil bem definido podem ser observados na **Figura IV.13 (C)**, mostrando, dessa forma, a eficiência eletrocatalítica do mediador redox empregado.

Estudos mais detalhados a respeito da corrente de pico de oxidação de NADH na superfície do ECV+MWCNT-QUIT/3,5-ADNB-at foram realizados por voltametria cíclica em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0. A **Figura IV.14** exibe os voltamogramas cíclicos de uma solução de NADH  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  em diferentes velocidade de varredura.



**Figura IV.14.** (A) Voltamogramas cíclicos para o ECV+MWCNT-QUIT/3,5-ADNB-at em várias velocidades de varredura ( $v$ ): (a) 2, (b) 5, (c) 8, (d) 10, (e) 15, (f) 20, (g) 25 e (h)  $30 \text{ mV s}^{-1}$ , (B) gráfico de  $I_p$  vs  $v^{1/2}$  e (C) variação de  $I_p/v^{1/2}$  vs  $v$ . Estudos realizados em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em pH 7,0 e  $[\text{NADH}] = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .

Como observado na **Figura IV.14 (A)**, o pico de oxidação catalítico desloca gradualmente para potenciais mais positivos com o aumento da velocidade de varredura, sugerindo uma limitação cinética na reação entre os grupos eletroativos e

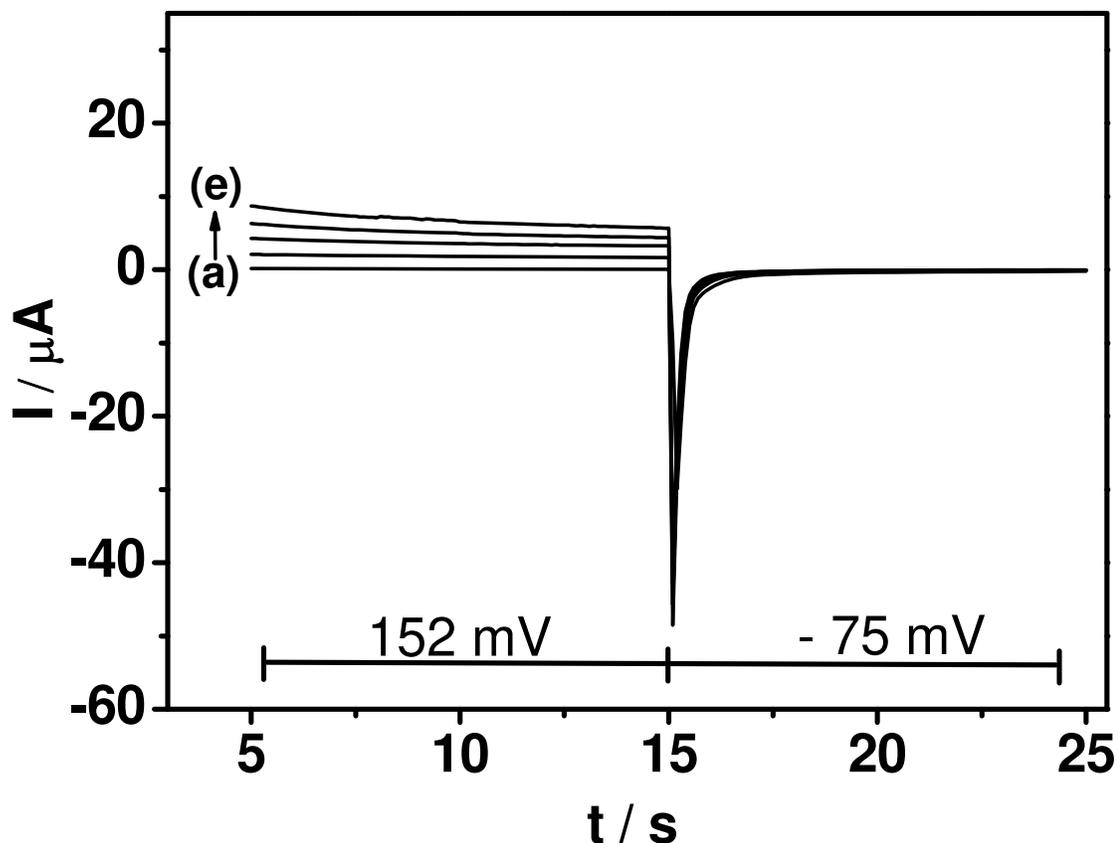
o NADH. Por outro lado, um gráfico de corrente catalítica  $I_{pa}$  vs a raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial ( $v^{1/2}$ ) na faixa de velocidade de 2 a 30  $\text{mV s}^{-1}$  foi construído e resultou numa dependência linear (**Figura IV.14 (B)**), expressa pela seguinte **Equação IV.3**:

$$I (\mu\text{A}) = 0,09 + 0,31 v^{1/2} (\text{mV s}^{-1})^{1/2} \quad \text{Equação IV.3}$$

Assim, esta dependência linear sugere que o processo é controlado por difusão na faixa de velocidade de varredura e de potencial estudados. Para verificar que o processo de oxidação eletrocatalítica entre o NADH e o ECV+MWCNT-QUIT/3,5-ADNB-at de fato apresenta uma etapa química acoplada, foi realizado um gráfico de corrente de pico ( $I_p/v^{1/2}$ ) vs velocidade de varredura, como mostra a **Figura IV.14 (C)**. Através da análise do gráfico da **Figura IV.14 (C)** permite observar um perfil característico de um típico processo eletroquímico-químico catalítico ( $EC_{cat}$ ) [125]. Portanto, diante dos estudos apresentados é nítida a eficiência eletrocatalítica do mediador redox empregado. Informações adicionais da reação química que ocorre na superfície do eletrodo podem ser obtidas por cronoamperometria.

#### IV.4 Estudos Cronoamperométricos

A cronoamperometria foi empregada na investigação dos processos eletroquímicos na presença e ausência de NADH. A **Figura IV.15** exhibe curvas de corrente em função do tempo para o ECV+MWCNT-QUIT/3,5-ADNB-at obtidas com  $E_{inicial} = 152 \text{ mV}$  (1ª etapa) e  $E_{final} = -75 \text{ mV}$  (2ª etapa) vs ECS para várias concentrações de NADH.



**Figura IV.15.** Cronoamperogramas obtidos em solução de tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,0: (a) branco, (b) 2,0, (c) 4,0, (d) 6,0 e (e) 8,0 mmol L<sup>-1</sup> de NADH.

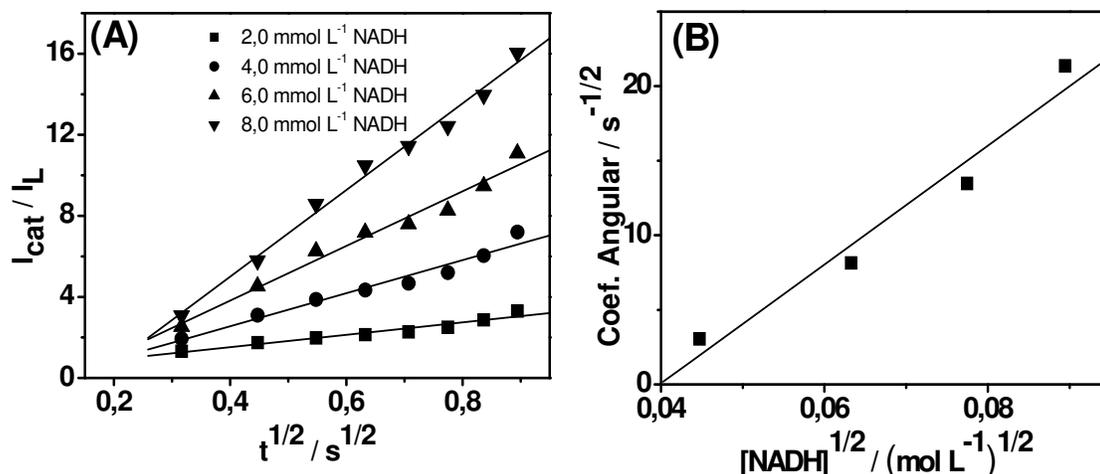
Como pode ser visto na **Figura IV.15**, quando a concentração de NADH aumenta, a corrente anódica associada com o potencial aplicado na primeira etapa também aumenta. No entanto, na segunda etapa a corrente catódica não aumenta, evidenciando que o grupo nitroso ( $M_{ox}$ ) está sendo consumido em uma etapa química que pode ser explicada pela **Equação IV.4**:



Além disso, a constante cinética ( $k_{obs}$ ) para a reação química entre o NADH e os sítios redox confinados na superfície do eletrodo é um importante parâmetro a ser determinado, pois, de um modo geral constantes com valores elevados poderão proporcionar um biossensor com melhor sensibilidade [125]. Desta maneira, a constante pode ser obtida por cronoamperometria de acordo com o método descrito na literatura [140]:

$$\frac{I_{cat}}{I_L} = \gamma^{1/2} \pi^{1/2} = \pi^{1/2} (k_{obs} Ct)^{1/2} \quad \text{Equação IV.5}$$

onde  $I_{cat}$  é a corrente catalítica do eletrodo modificado na presença de NADH,  $I_L$  é a corrente na ausência de NADH e  $\gamma = k_{obs} Ct$  (C é a concentração de NADH 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.



**Figura IV.16.** (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  $[NADH]^{1/2}$ .

Assim, como pode ser observado na **Figura IV.16** (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 graficados em função da  $[NADH]^{1/2}$ , **Figura IV.16** (B). O coeficiente angular obtido foi de  $398,2 s^{-1/2} L^{1/2} mol^{-1/2}$ , resultando em um valor de  $k_{obs}$  de  $5,1 \times 10^4 L mol^{-1} s^{-1}$ . Como pode ser observado na **Tabela IV.2**, a constante cinética obtida está entre uma das maiores já reportadas ( $10^4 - 10^5 L mol^{-1} s^{-1}$ ).

**Tabela IV.2.** Parâmetros eletroquímicos e constante cinética de alguns eletrodos modificados para a eletrooxidação de NADH.

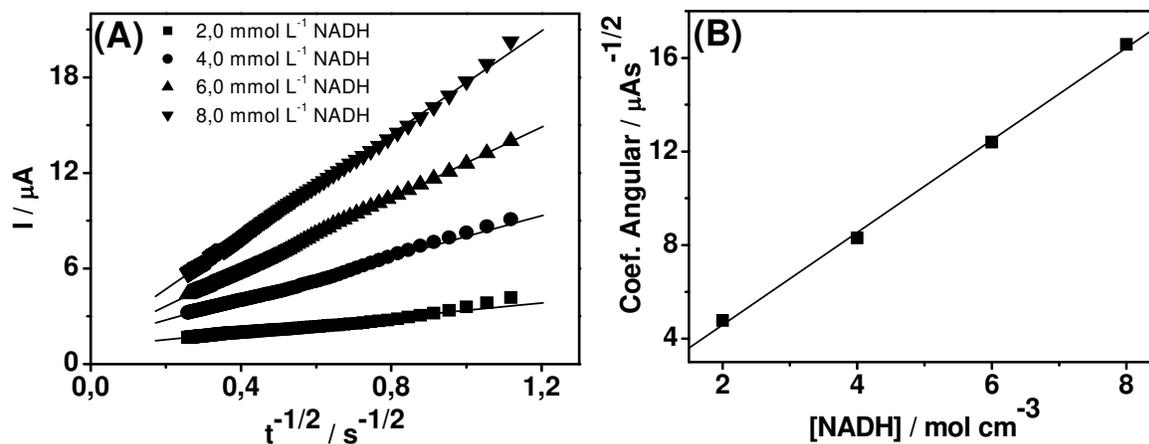
Referências	E <sub>apl.</sub> * (mV)	pH	k <sub>obs</sub> (L mol <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
Goulart e col. [141]	100 vs Ag/AgCl	7,0	6,6×10 <sup>4</sup>
Antiochia e col.[142]	-	7,0	2,0×10 <sup>3</sup>
Santos e col. [143]	-60 vs ECS	7,0	1,8×10 <sup>3</sup>
Vasantha e col. [144]	200 vs Ag/AgCl	7,0	9,8×10 <sup>3</sup>
Munteanu e col. [145]	156 vs Ag/AgCl	6,0	3,0×10 <sup>3</sup>
Lima e col. [146]	100 vs Ag/AgCl	7,0	1,0×10 <sup>4</sup>
Santhiago e col [111]	-50 vs ECS	7,0	1,6×10 <sup>4</sup>
Pereira e col. [147]	-140 vs ECS	7,0	5,5×10 <sup>3</sup>
Mano e Kuhn [148]	-50 vs Ag/AgCl	8,0	5,0×10 <sup>4</sup>
Nassef e col [149]	200 vs Ag/AgCl	7,0	1,1×10 <sup>5</sup>
Este trabalho	152 vs ECS	7,0	5,1×10 <sup>4</sup>

\*Potencial aplicado (Ag/AgCl vs ECS = - 45 mV).

Com o intuito de extrair mais informações dos cronoamperogramas mostrados na **Figura IV.15** o coeficiente de difusão de NADH foi estimado. 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 [125].

$$I = \frac{nFAD^{1/2} C}{\pi^{1/2} t^{1/2}} \quad \text{Equação IV.6}$$

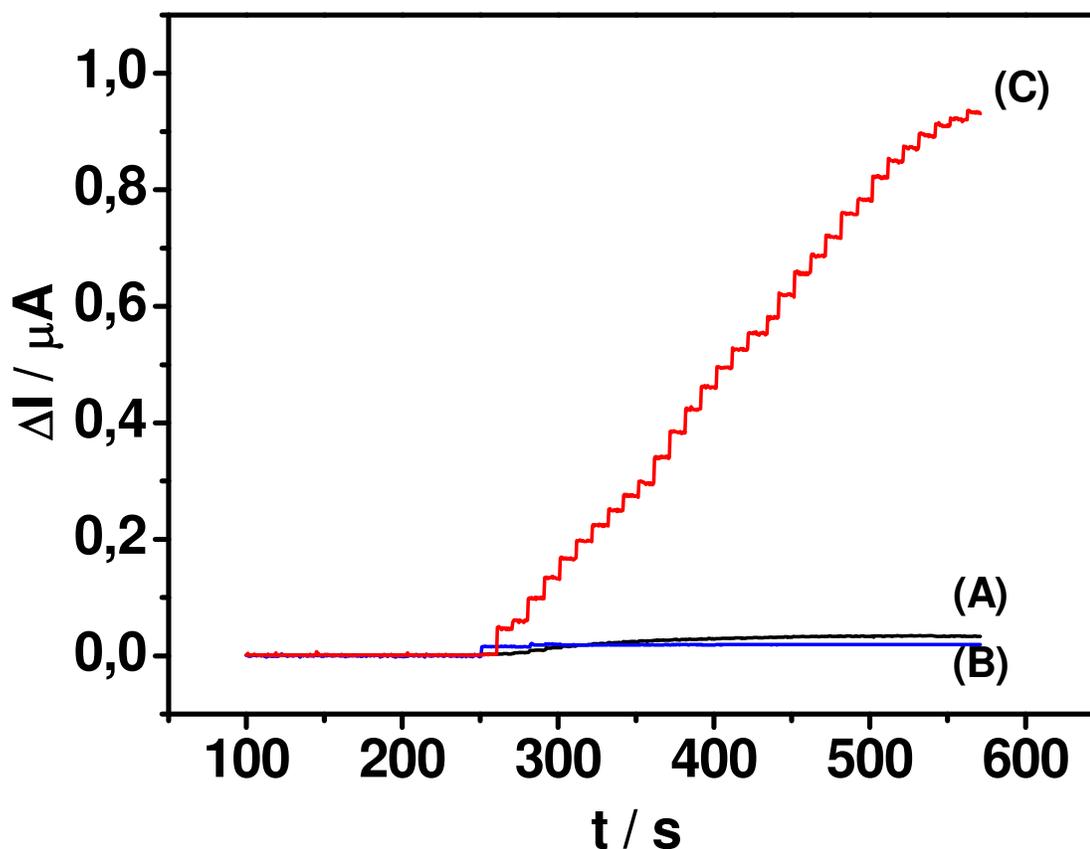
onde  $A$ ,  $D$  e  $C$  são a área eletroativa (0,230 cm<sup>2</sup>) o coeficiente de difusão (cm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>) e a concentração (mol cm<sup>3</sup>) da espécie eletroativa, respectivamente. Um gráfico de  $I$  vs  $t^{1/2}$  deve ser linear, e a partir do seu coeficiente angular, o coeficiente de difusão pode ser obtido. O gráfico de  $I$  vs  $t^{1/2}$  para as concentrações de NADH empregadas resultaram em linhas retas (**Figura IV.17 (A)**) e os coeficientes angulares dessas retas foram graficadas em função da concentração de NADH, como mostrado na **Figura IV.17 (B)**. Assim, o coeficiente de difusão de NADH foi estimado como sendo 9,0×10<sup>-6</sup> cm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>. O valor encontrado do coeficiente de difusão está de acordo com alguns trabalhos já reportados na literatura [111,112,141].



**Figura IV.17.** (A) Gráfico de  $I$  vs  $t^{-1/2}$  e (B) gráfico dos coeficientes angulares obtidos em (A) vs  $[\text{NADH}]$ . As concentrações de NADH utilizadas são as mesmas dos cronoamperogramas mostrados na **Figura IV.15**.

#### IV.5 Detecção amperométrica de NADH

Com o objetivo de realizar a detecção amperométrica de NADH foi realizado experimento de cronoamperometria após adições sucessivas de NADH em solução PBS 0,1  $\text{mol L}^{-1}$ , pH 7,0 e potencial aplicado de 50 mV vs ECS. A **Figura IV.18** ilustra a resposta cronoamperométrica do sensor em função de cada etapa (A-C) da construção do sensor. Como pode ser observado, somente o eletrodo modificado com o 3,5-ADNB apresenta resposta cronoamperométrica para o NADH.

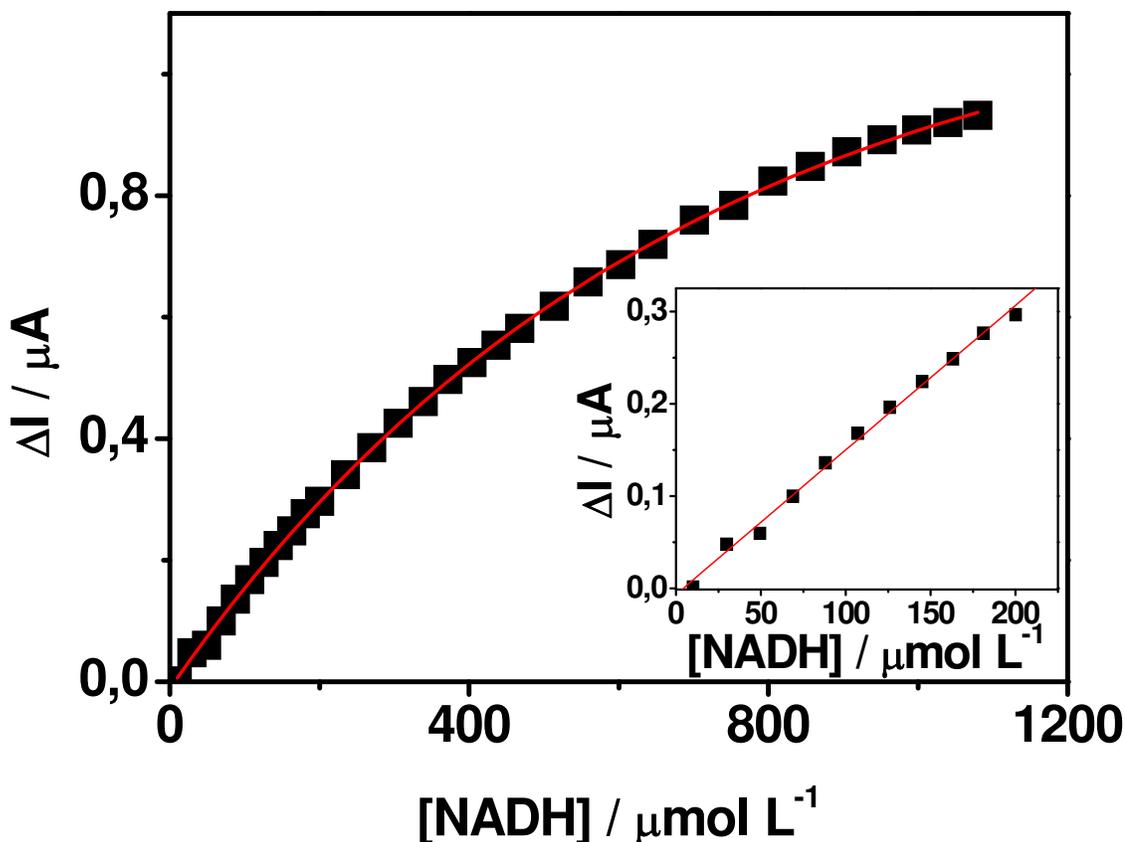


**Figura IV.18.** Resposta cronoamperométrica observada após adições sucessivas de uma solução estoque de NADH  $4,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0 para: (A) ECV sem modificação, (B) ECV+MWCNT-QUIT e (C) ECV+MWCNT-QUIT /3,5-ADNB-at.  $E_{\text{aplicado}} = 50 \text{ mV vs ECS}$ . Velocidade de rotação do EDR de 250 rpm.

Na **Figura IV.19**, pode ser observado uma faixa linear de 10 a  $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ , podendo ser expressa com a seguinte equação:

$$\Delta I \text{ (nA)} = -6,91 + 1,57 [\text{NADH}] (\mu\text{mol L}^{-1}) \quad \text{Equação IV.7}$$

com um coeficiente de correlação de 0,998. O sensor apresentou limites de detecção e quantificação de  $3,0$  e  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  respectivamente, seguindo as recomendações da IUPAC [150] ( $L.D = 3\sigma/B$   $L.Q = 10\sigma/B$ , respectivamente). Além disso, o tempo de resposta do sensor foi de 0,5 s.



**Figura IV.19.** Gráfico de  $\Delta I$  vs  $[NADH]$  após adições sucessivas de uma solução estoque de NADH  $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$  em PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0 para o eletrodo modificado ECV+MWCNT-QUIT/3,5-ADNB-at. *Gráfico inserido:* região da faixa linear.  $E_{\text{aplicado}} = 50 \text{ mV vs ECS}$ .

#### IV.6 Biossensor para a detecção da glutatona oxidada

Após a caracterização eletroquímica da plataforma nanoestruturada, foi construído o biossensor para a detecção da glutatona oxidada (GSSG), utilizando a enzima glutatona redutase. Para a imobilização da enzima glutatona redutase foi utilizado glutaraldeído, que é um agente bifuncional responsável pela formação de ligação cruzada entre as macromoléculas da proteína, aumentando a sua estabilidade e fixando-a melhor na superfície do eletrodo. A porcentagem de glutaraldeído utilizada no estudo da imobilização se manteve fixa como sendo 0,1%, como utilizado em alguns trabalhos da literatura [151,152].

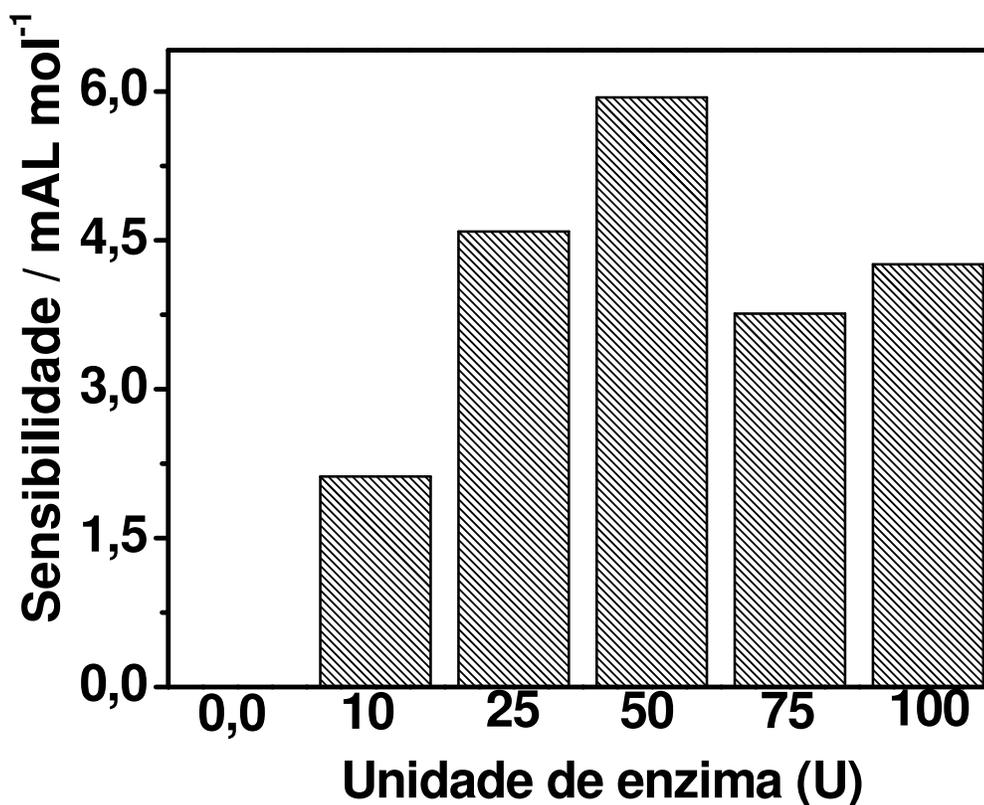
A fim de se obter a melhor condição de preparação e desempenho do biossensor, uma otimização univariada da concentração enzimática, da concentração de QUIT utilizada na preparação da solução enzimática e da

concentração de NADH no eletrólito de suporte foram realizadas. A influência de cada parâmetro foi verificada analisando-se a sensibilidade do biossensor obtida por meio da resposta cronoamperométrica, após adições sucessivas de GSSG (solução padrão) em PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0 e em potencial aplicado de 50 mV vs ECS.

#### IV.6.1 Influência da concentração enzimática

Iniciou-se a avaliação do desempenho do biossensor à base da enzima glutationa redutase (GR), por meio da resposta cronoamperométrica verificando a sensibilidade do biossensor em função da concentração de enzima no processo de imobilização, enquanto os volumes dos outros componentes permaneceram constantes. As concentrações da GR utilizadas 0,00; 13,8; 30,0; 60,0; 90,0; 120,0 g L<sup>-1</sup> foram convertidas em unidade enzimática, correspondendo a 0,00; 10,0; 25,0; 50,0; 75,0; 100,0 unidades (U) de enzima, para um volume de 5,0 µL adicionado no eletrodo.

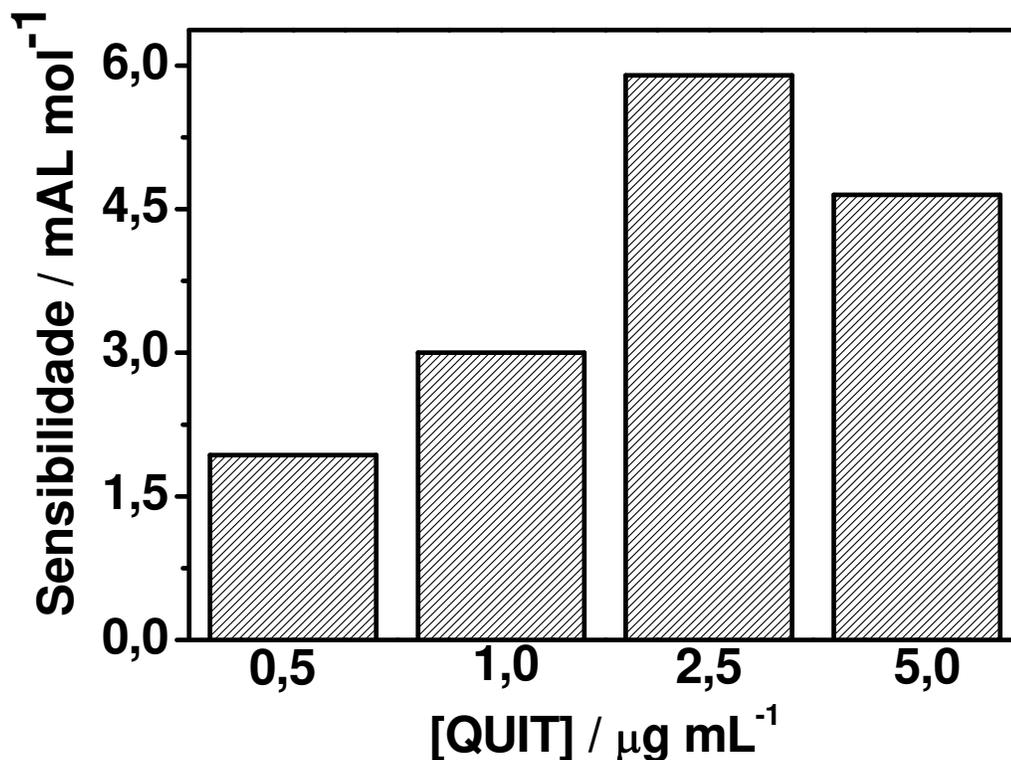
A resposta do biossensor é tipicamente dependente da quantidade de enzima ativa imobilizada [153], de modo que a quantidade de enzima utilizada para construir o biossensor deve ser suficiente para garantir a reação com o substrato, mas uma alta quantidade desse reagente pode causar limitações difusionais diminuindo a resposta do biossensor. A **Figura IV.20** mostra o efeito da quantidade de enzima GR na sensibilidade do biossensor obtida por resposta cronoamperométrica em solução PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0 contendo 600 µmol L<sup>-1</sup> de NADH. É possível observar que a sensibilidade do biossensor aumenta à medida que a quantidade de enzima no eletrodo também aumenta. Este comportamento está de acordo com o esperado já que o aumento na concentração de enzima favorece um aumento na velocidade da reação enzimática. Porém com uma quantidade maior de 50 unidades de enzima a sensibilidade do biossensor começa a diminuir, pois o aumento da quantidade de enzima provavelmente provoca uma limitação difusional do analito. Portanto, optou-se por 50 unidades de enzima para preparar um biossensor com boa sensibilidade.



**Figura IV.20.** Efeito da quantidade de enzima GR preparação do biossensor analisada pela sensibilidade deste obtida pela resposta cronoamperométrica, após adições sucessivas de GSSG (solução padrão) em PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0, contendo 600 µmol L<sup>-1</sup> de NADH, [QUIT] 2,5 µg mL<sup>-1</sup> e E<sub>aplicado</sub> = 50 mV vs ECS.

#### IV.6.2 Concentração de quitosana

A concentração de quitosana utilizada na preparação da solução enzimática foi avaliada, por meio da resposta cronoamperométrica verificando a sensibilidade do biossensor em função da concentração de quitosana. As concentrações de quitosana utilizada na preparação da solução enzimática variaram de 0,5 até 5,0 µg mL<sup>-1</sup>.

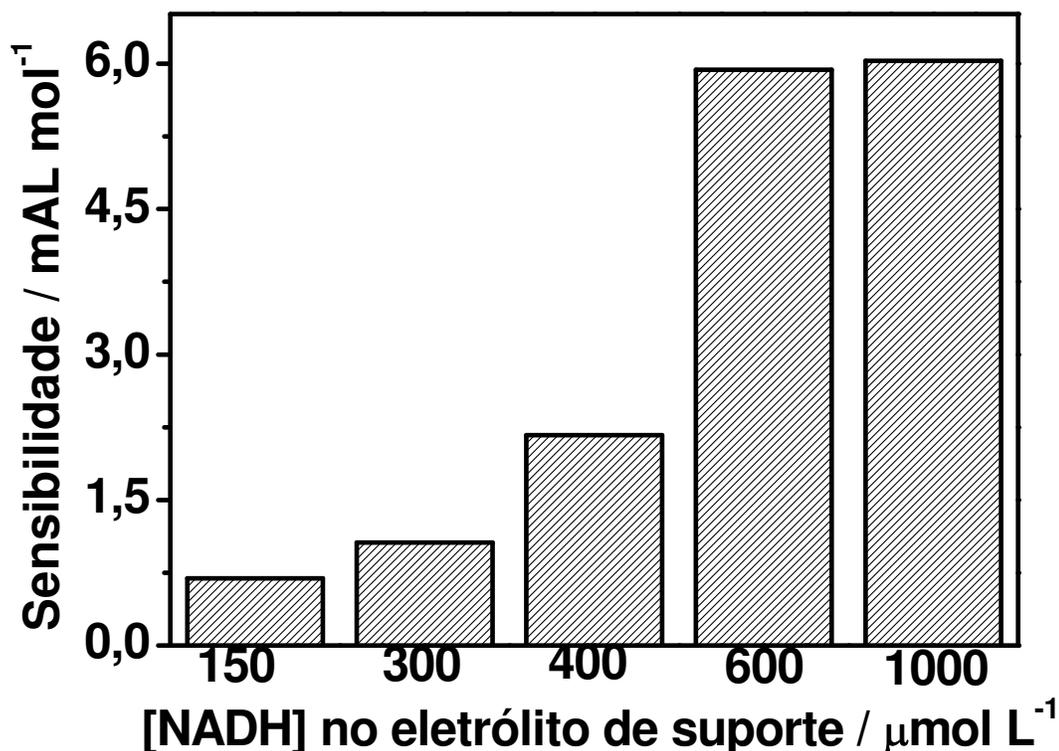


**Figura IV.21.** Efeito da concentração de quitosana na preparação da solução enzimática analisada pela sensibilidade do biossensor obtida pela resposta cronoamperométrica, após adições sucessivas de GSSG em PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0, contendo  $600 \mu\text{mol L}^{-1}$  de NADH, 50 U de GR e  $E_{\text{aplicado}} = 50 \text{ mV vs ECS}$ .

A **Figura IV.21** mostra o efeito da concentração de quitosana na sensibilidade do biossensor obtida por resposta cronamperométrica em solução PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 contendo  $600 \mu\text{mol L}^{-1}$  de NADH. É possível observar que a sensibilidade do biossensor aumenta à medida que aumenta a concentração de quitosana na solução enzimática. Este comportamento é explicado pelo fato da quitosana apresentar uma boa aderência e uma excelente formação de filme [154] sendo possível uma imobilização eficiente da enzima glutationa redutase. Entretanto, com o aumento da concentração de quitosana a sensibilidade do biossensor também aumenta. Já com uma concentração de quitosana maior que  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  a sensibilidade do biossensor começa a diminuir, provavelmente a QUIT está bloqueando a comunicação da enzima com o substrato. Portanto, optou-se pela concentração de quitosana de  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  para preparar a solução enzimática, devido esta ter apresentado a melhor sensibilidade na resposta do biossensor.

### IV.6.3 Concentração de NADH no eletrólito de suporte

Outro parâmetro importante para se avaliar é a concentração de NADH no eletrólito de suporte, pois a detecção da glutatona oxidada é determinada através do consumo de NADH na solução. Esta avaliação foi realizada através da resposta cronoamperométrica verificando a sensibilidade do biossensor em função da concentração de NADH no eletrólito suporte. As concentrações utilizadas de NADH no eletrólito de suporte variaram de 150 até 1000  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .



**Figura IV.22.** Efeito da concentração de NADH no eletrólito de suporte analisada pela sensibilidade do biossensor obtida pela resposta cronoamperométrica, após adições sucessivas de GSSG em PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0, [QUIT] de 2,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 50 U de GR e  $E_{\text{aplicado}} = 50 \text{ mV vs ECS}$ .

A **Figura IV.22** mostra o efeito da concentração de NADH na sensibilidade do biossensor obtida por resposta cronoamperométrica em solução PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0. Pode-se observar que a sensibilidade do biossensor aumenta à medida que aumenta a concentração de NADH no eletrólito de suporte. Isso pode ser explicado porque na presença de NADH a enzima glutatona redutase regenera a glutatona

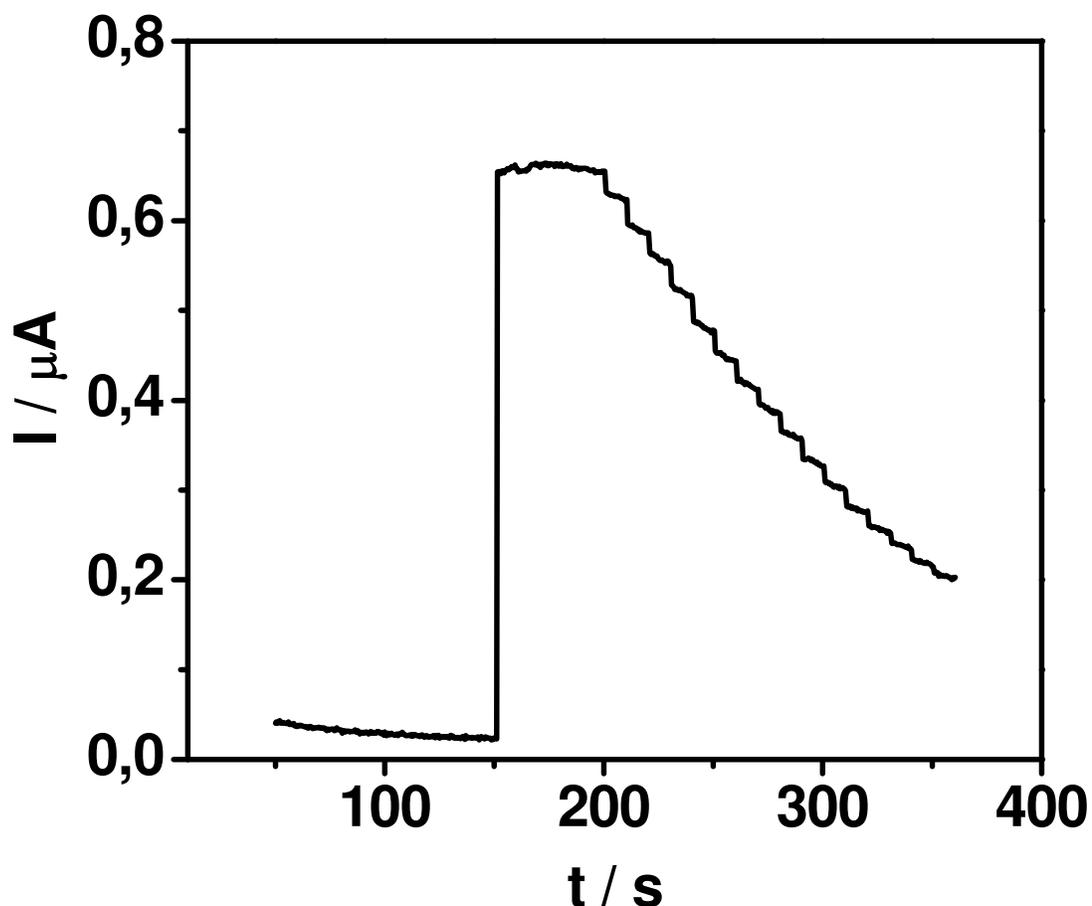
oxidada para sua forma reduzida (GSH)[29] se a concentração de NADH no eletrólito suporte for baixa esse mecanismo pode ocorrer, mas em menor proporção, fazendo com que a sensibilidade do biossensor seja baixa. Como pode ser observado, com o aumento da concentração de NADH no eletrólito de suporte a partir de  $600 \mu\text{mol L}^{-1}$  não há um aumento significativo na sensibilidade do biossensor. Portanto, optou-se pela concentração de  $600 \mu\text{mol L}^{-1}$  de NADH no eletrólito de suporte.

Diante disso, as melhores condições para o emprego do biossensor nos estudos posteriores foram: 50 unidades de enzima,  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de QUIT e  $600 \mu\text{mol L}^{-1}$  de NADH.

#### **IV.6.4 Caracterização analítica do biossensor para a detecção da glutatona oxidada**

Com as melhores condições estabelecidas para a construção do biossensor foi realizada a caracterização analítica através de experimento cronoamperométrico após adições sucessivas de GSSG em PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0, contendo  $600 \mu\text{mol L}^{-1}$  de NADH e potencial aplicado de 50 mV vs ECS.

A **Figura IV.23** ilustra a resposta cronoamperométrica do biossensor em solução PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0. Quando o NADH é adicionado em 150 s, pode ser observado um aumento expressivo da corrente de oxidação de NADH e, após a estabilização dessa corrente, foram efetuadas adições sucessivas de GSSG (solução padrão) à solução. A partir de 200 s pode ser visualizado o funcionamento do biossensor a partir do consumo de NADH em função do aumento da concentração de GSSG.



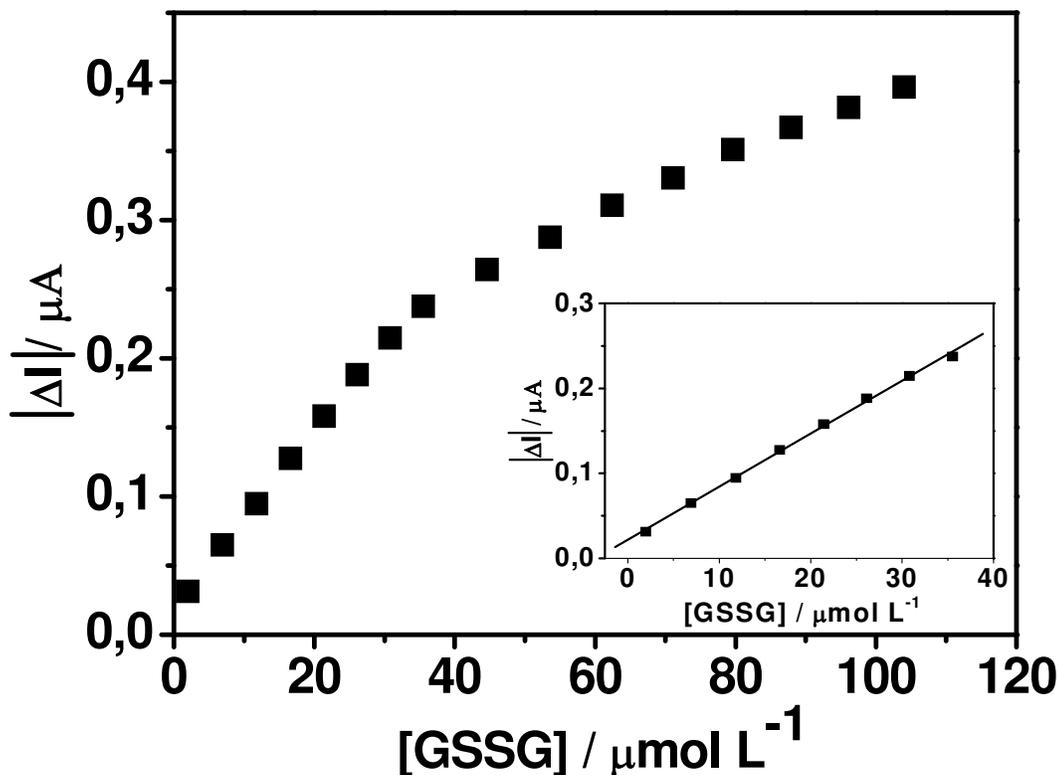
**Figura IV.23.** Resposta cronoamperométrica observada após adições sucessivas de uma solução estoque de GSSG  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  em solução PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 contendo  $600 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  de NADH para o ECV+MWCNT-QUIT/ADNB-at/GR.  $E_{\text{aplicado}} = 50 \text{ mV vs ECS}$ . Velocidade de rotação do EDR de 250 rpm.

Na **Figura IV.24**, pode ser observado que o biossensor proposto apresentou uma faixa linear de  $2,0$  a  $35 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ , podendo ser expressa pela seguinte equação:

$$|\Delta I| (\text{nA}) = 6,24 [\text{GSSG}] (\mu\text{mol L}^{-1}) \quad \text{Equação IV.8}$$

com um coeficiente de correlação de 0,999. O biossensor apresentou um limite de detecção e quantificação de  $0,6$  e  $2,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  respectivamente, calculados seguindo as recomendações da IUPAC [150] e uma sensibilidade de  $6,4 \text{ mA L mol}^{-1}$ . Além disso, o tempo de resposta do biossensor foi menor que 1 s. Essa plataforma é uma alternativa promissora para a detecção de GSSG em amostras de plasma humano, uma vez que a concentração de GSSG no plasma é normalmente na faixa de

micromolar [30,31,32,33], sendo a mesma faixa encontrada para o biossensor proposto.



**Figura IV.24.** Gráfico de  $|\Delta I|$  vs  $[GSSG]$  do biossensor após adições sucessivas de uma solução estoque de GSSG  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  em solução PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 contendo  $600 \mu\text{mol L}^{-1}$  de NADH. *Gráfico inserido:* região da faixa linear.

Para o eletrodo ECV+MWCNT-QUIT/3,5-ADNB-at/GR, calculou-se a constante aparente de Michaelis-Menten ( $K_M^{\text{app}}$ ) com base na curva analítica representada na **Figura IV.24**. Essa constante representa a afinidade da enzima pelo substrato e quanto menor o seu valor, maior a afinidade, refletindo na sensibilidade. A constante  $K_M^{\text{app}}$  para o biossensor proposto foi calculada a partir do método gráfico de Lineweaver-Burk ( $1/|\Delta I|$  vs  $1/[GSSG]$ ) [111,155] que relaciona os valores obtidos de corrente a partir do gráfico  $|\Delta I|$  vs  $[GSSG]$  (**Figura IV.24**). O valor encontrado da  $K_M^{\text{app}}$  foi de  $60 \mu\text{mol L}^{-1}$  este valor de constante está de acordo com o valor encontrado na literatura [156], indicando que a plataforma nanoestruturada fornece um ambiente ideal para a imobilização de enzimas sem mudança na sua conformação.

#### IV.6.5 Estudo de repetibilidade e tempo de vida do biossensor

A repetibilidade das determinações utilizando o biossensor (ECV+MWCNT-QUIT/3,5-ADNB-at/GR) foi obtida monitorando a corrente ( $\Delta I$ ) por cronoamperometria na presença de  $7,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de GSSG para  $n = 4$  e calculado o desvio padrão relativo (DPR), sendo este de 6,0%. A repetibilidade da construção do biossensor foi avaliada empregando-se as mesmas condições descritas acima, usando a resposta obtida com 4 eletrodos diferentes, modificados seguindo o mesmo procedimento e o DPR obtido para a construção do biossensor (ECV+MWCNT-QUIT/3,5-ADNB-at/GR) foi de 7,0%.

A estabilidade do biossensor (ECV+MWCNT-QUIT/3,5-ADNB-at/GR) foi avaliada realizando o máximo de determinações cronoamperométricas para  $7,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de GSSG com o mesmo eletrodo, sendo possível realizar até 20 determinações sem que nenhuma mudança significativa na resposta fosse observada. O tempo de vida do biossensor foi avaliado em solução PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0 fazendo adições sucessivas de GSSG (solução padrão) e monitorando a corrente ( $\Delta I$ ) por cronoamperometria. O biossensor modificado, foi armazenado a  $4^\circ\text{C}$  e imerso em solução PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0, apresentou estabilidade de 3 dias. Depois disso, a enzima perdeu a atividade e com isso o biossensor não apresentou mais resposta.

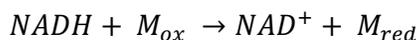
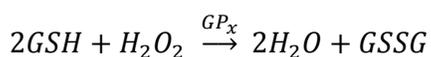
#### IV.7 Biossensor para a detecção da glutatona total (GSH+GSSG)

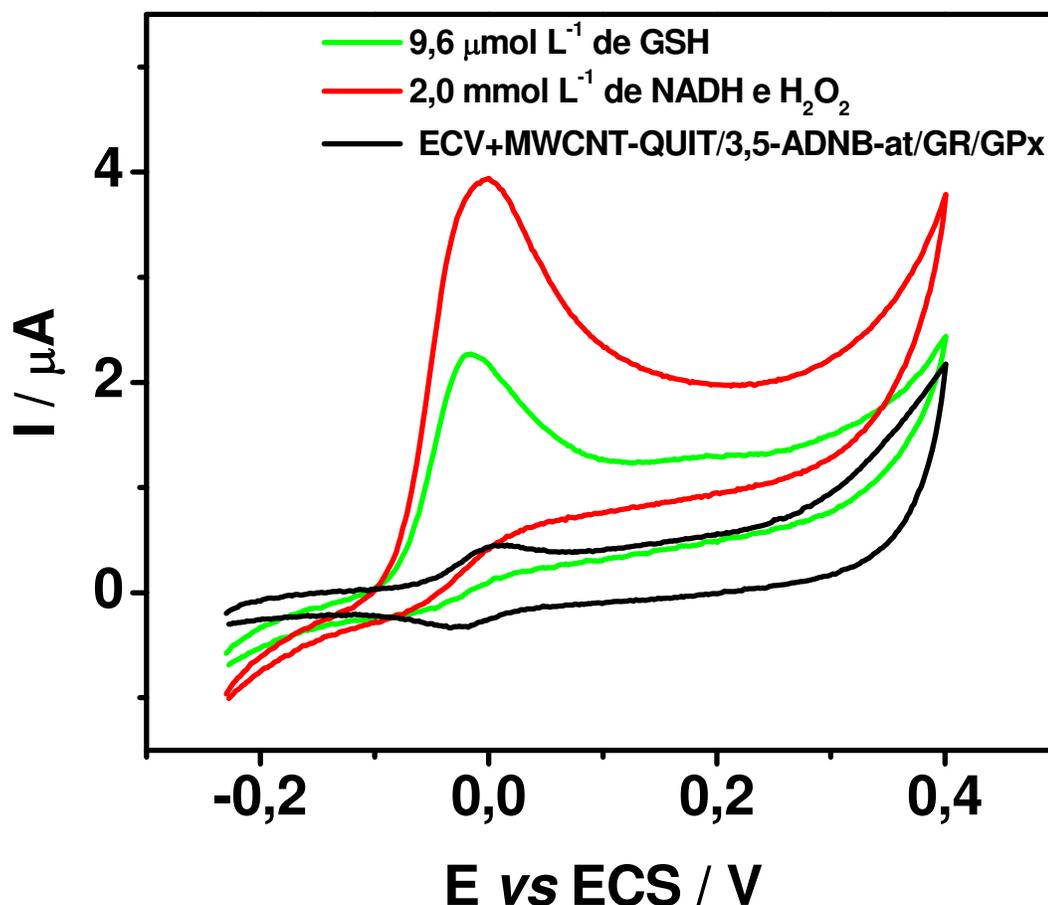
Nesta seção serão apresentados os resultados do biossensor (ECV+MWCNT-QUIT/3,5-ADNB-at/GR/GPx), que será responsável pela detecção da glutatona total (GSH+GSSG). Para a construção deste biossensor, foi utilizada a mesma plataforma nanoestruturada descrita no tópico III.4. Depois do processo de imobilização do mediador e ativação do par redox R-NO/R-NHOH, o biossensor foi construído para a detecção da glutatona total (GSH+GSSG) utilizando as enzimas glutatona redutase e glutatona peroxidase. Para a imobilização das enzimas glutatona redutase e glutatona peroxidase foi utilizado o glutaraldeído, sendo que a porcentagem do mesmo se manteve fixa como sendo 0,1%.

Para a construção desse biossensor as concentrações da enzima e de quitosana foram mantidas, assim como descrito anteriormente.

Portanto, o primeiro experimento realizado com o biossensor possuindo as duas enzimas imobilizadas foi uma voltametria cíclica, esse experimento tinha como objetivo observar se a enzima glutationa peroxidase quando imobilizada não iria perder a sua atividade enzimática. A **Figura IV.25** mostra voltamogramas cíclicos na faixa de potencial de -0,2 a 0,4 V vs ECS em PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0 e velocidade de varredura de 10 mV s<sup>-1</sup> para o biossensor (ECV+MWCNT-QUIT/3,5-ADNB-at/GR/GPx), sendo possível observar os picos referentes ao par redox R-NO/R-NHOH (voltamograma em preto).

Em seguida, foram efetuadas adições de NADH e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ambos com concentração de 0,1 mol L<sup>-1</sup> (solução estoque). Pode ser observado no voltamograma cíclico em vermelho que há um aumento no pico de oxidação, indicando um processo eletrocatalítico (**Equação IV.9**), como já foi estudado anteriormente. Posteriormente, foi efetuada adição de GSH (solução padrão) com concentração de 0,1 mol L<sup>-1</sup> (solução estoque), no qual há uma diminuição do pico de oxidação, isso ocorre por que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> está se reduzindo a água, enquanto a glutationa na forma reduzida (GSH) está sendo oxidada (GSSG) numa reação catalisada pela enzima glutationa peroxidase, como mostrado na **Equação IV.10**. [24].

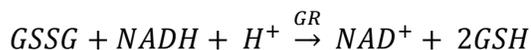
**Equação IV.9****Equação IV.10**



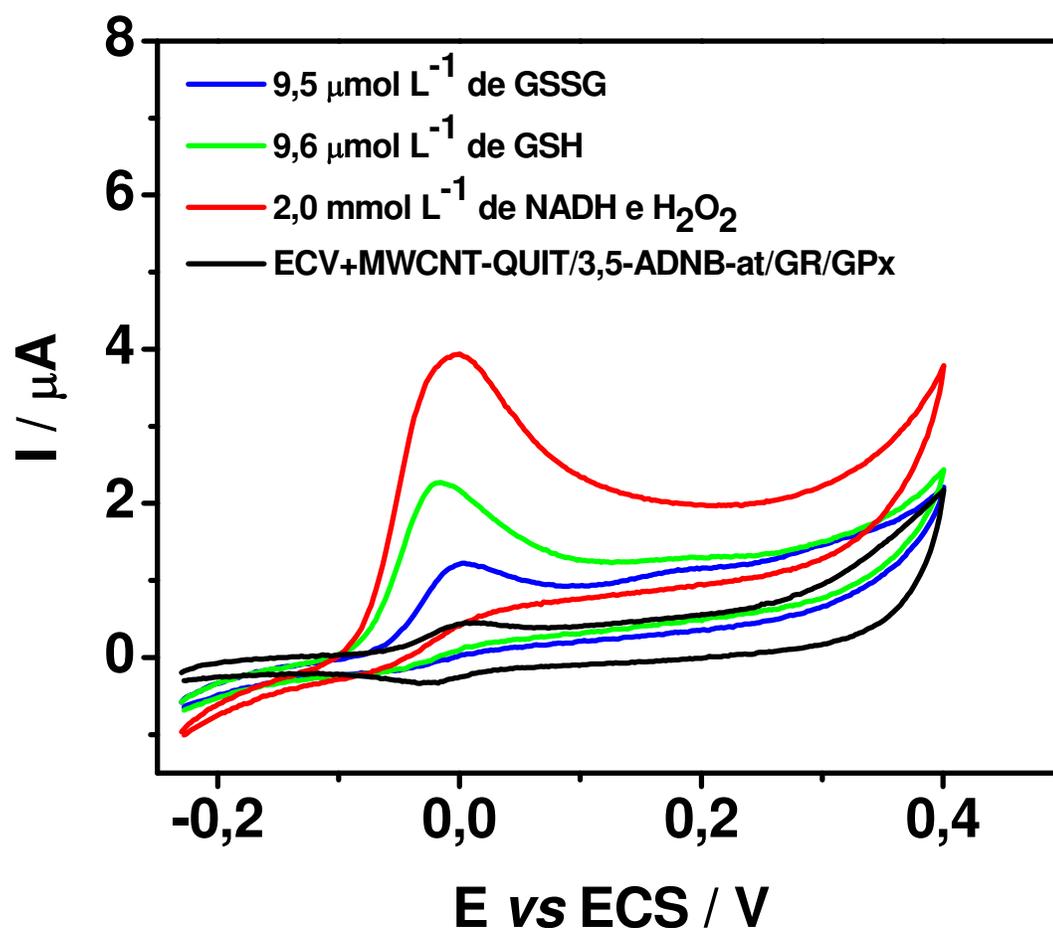
**Figura IV.25.** Voltamograma cíclico obtidos para o biossensor (ECV+MWCNT-QUIT/3,5-ADNB-at/GR/GPx) em PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 com  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$  (preto), na presença dos substratos das enzimas GR e GPx (vermelho) e da GSH (verde). Condições experimentais: 50 U da enzima glutaciona redutase, 25 U da enzima glutaciona peroxidase e [QUIT] de  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

A fim de observar a resposta do biossensor com as duas enzimas imobilizadas e também confirmar o mecanismo em que as duas enzimas participam, novamente foi realizado um experimento de voltametria cíclica. A **Figura IV.26** mostra os voltamogramas cíclicos para o biossensor (ECV+MWCNT-QUIT/3,5-ADNB-at/GR/GPx) somente em PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 e velocidade de varredura de  $10 \text{ mV s}^{-1}$  (voltamograma em preto). Em seguida, foram efetuadas adições de NADH e  $\text{H}_2\text{O}_2$  ambos com concentração de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (solução estoque) (voltamograma em vermelho), onde é possível observar um aumento significativo no pico de oxidação do par redox, indicando que existe um processo catalítico, como mostrado na **Equação IV.9**. Posteriormente, foi efetuada adição de GSH (solução

padrão) com concentração de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (solução estoque), no qual há uma diminuição do pico de oxidação (voltamograma em verde) e quando é adicionado a GSSG (solução padrão) com concentração de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (solução estoque) (voltamograma em azul), o pico de oxidação diminui ainda mais, indicando que os substratos tanto da enzima glutationa redutase quanto o da enzima glutationa peroxidase estão sendo consumidos, como é mostrado nas **Equações IV.10 e IV.11**, respectivamente.



Equação IV.11



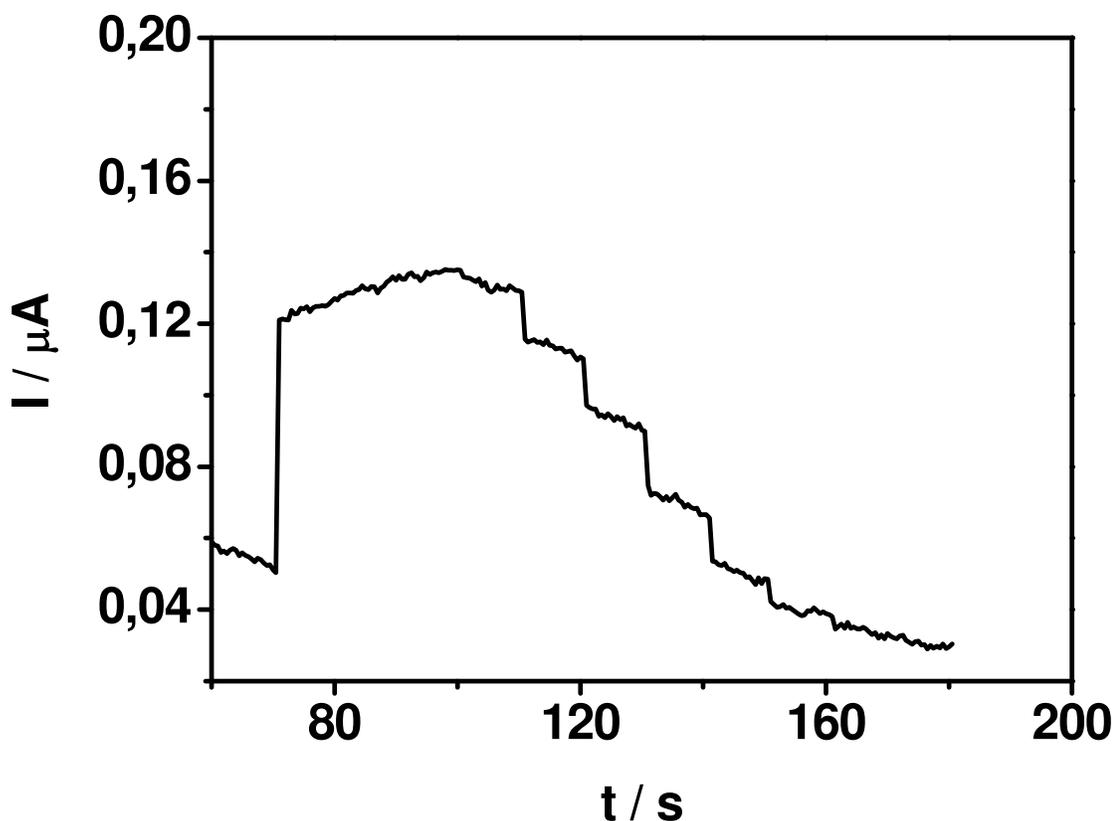
**Figura IV.26.** Voltamograma cíclico obtidos para o biossensor (ECV+MWCNT-QUIT/3,5-ADNB-at/GR/GPx) em PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 com  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$  (preto), na presença dos substratos das enzimas GR e GPx (vermelho), da GSH (verde) e da GSH+GSSG (solução padrão). Condições experimentais: 50 U da enzima glutationa redutase, 25 U da enzima glutationa peroxidase e [QUIT] de  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Isso ocorre, por que as duas enzimas GR e GPx estão agindo em conjunto, ou seja, uma molécula de  $H_2O_2$  é reduzida a duas moléculas de água, enquanto duas moléculas de glutathiona na forma reduzida (GSH) são oxidadas numa reação catalisada pela enzima glutathiona peroxidase. A glutathiona na forma oxidada (GSSG) é regenerada para a sua forma reduzida pela ação da enzima glutathiona redutase na presença de NADH [24]. Logo após esse estudo foi realizada a caracterização analítica do biossensor, a fim de obter a faixa linear, limites de detecção e quantificação e estabilidade do biossensor proposto.

#### **IV.7.1 Caracterização analítica do biossensor para a detecção da glutathiona total (GSH+GSSG)**

Após os experimentos de voltametria cíclica, foi realizado o experimento de cronoamperometria do biossensor desenvolvido, com o objetivo de efetuar uma caracterização analítica. Portanto, foram efetuadas adições sucessivas de uma solução estoque de GSH+GSSG  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  (solução padrão) em PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0, contendo  $600$  e  $300 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  de NADH e  $H_2O_2$ , respectivamente e potencial aplicado de  $50 \text{ mV vs ECS}$ . Para o experimento, o biossensor foi construído com  $50 \text{ U}$  de GR e  $30 \text{ U}$  de GPx.

A **Figura IV.27** ilustra a resposta cronoamperométrica do biossensor em solução PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0. Quando o NADH e o  $H_2O_2$  são adicionados em  $60 \text{ s}$ , pode ser observado um aumento da corrente de oxidação de NADH e, após a corrente permanecer estável, foram efetuadas adições sucessivas de GSH+GSSG (solução padrão) à solução. A partir de  $100 \text{ s}$  pode ser visualizado o funcionamento do biossensor a partir do consumo de NADH e  $H_2O_2$  em função do aumento da concentração de GSH+GSSG. Confirmando novamente o mecanismo e as Equações mostradas na **Figura I.2** e nas **Equações IV.9, IV.10 e IV.11**, respectivamente.



**Figura IV.27.** Resposta cronoamperométrica observada após adições sucessivas de uma solução estoque de GSH+GSSG  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  em solução PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 contendo  $600 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  de NADH e  $300 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e com 50 U da GR e 30 U da GPx para o ECV+MWCNT-QUIT/3,5-ADNB-at/GR/GPx.  $E_{\text{aplicado}} = 50 \text{ mV vs ECS}$ . Velocidade de rotação do EDR de 250 rpm.

A fim de obter informações de como cada enzima contribuía na reposta de corrente ( $\Delta I$ ) do biossensor, foi realizado o experimento de cronoamperometria tendo somente a enzima glutationa redutase (50 U) imobilizada sobre a plataforma e depois somente a enzima glutationa peroxidase (30 U) imobilizada. Esse estudo foi executado monitorando a corrente ( $\Delta I$ ) na presença de  $8,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  de GSH+GSSG (solução padrão) em solução PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 contendo  $600 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  de NADH e  $300 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A **Tabela IV.3** mostra os valores de corrente obtidos para cada enzima imobilizada e para o biossensor com as duas enzimas imobilizadas. Como pode ser observado a soma do  $\Delta I$  dos biossensores referentes a cada enzima imobilizada, não fornece o valor de  $\Delta I$  quando as duas enzimas estão imobilizadas no biossensor. Isso ocorre, pelo fato que a área exposta de enzima

imobilizada para cada biossensor é diferente quando comparando ao biossensor que possui as duas enzimas imobilizadas. Com isso, não foi possível obter exatamente o valor da corrente quando as duas enzimas estão imobilizadas.

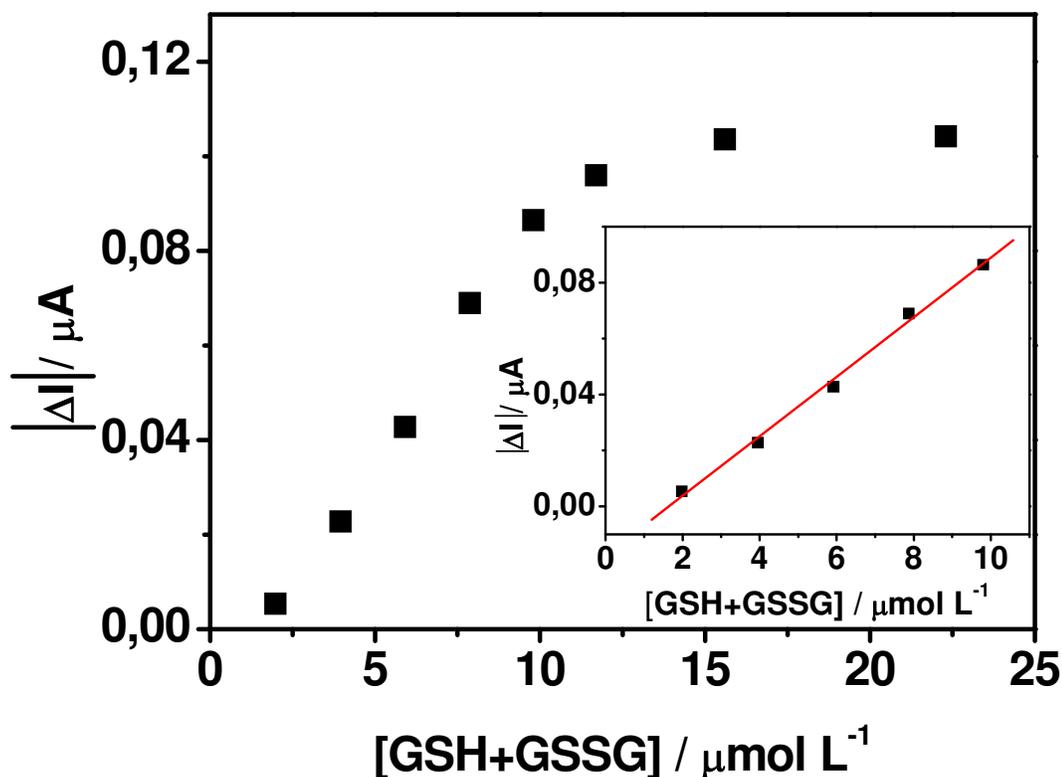
**Tabela IV.3.** Valores de corrente ( $\Delta I$ ) obtido para cada enzima imobilizada e para o biossensor contendo as duas enzimas imobilizadas.

Biossensores	Corrente ( $\Delta I$ ) / $\mu A$
ECV+MWCNT-QUIT/3,5-ADNB-at/GR	0,05
ECV+MWCNT-QUIT/3,5-ADNB-at/GPx	0,04
ECV+MWCNT-QUIT/3,5ADNB-at/GR/GPx	0,07

Na **Figura IV.28** pode ser observado que o biossensor proposto apresentou uma faixa linear de 2,0 a 10  $\mu mol L^{-1}$ , podendo ser expressa pela seguinte equação:

$$|\Delta I|(nA) = 10,65 [GSH + GSSG](\mu mol L^{-1}) \quad \text{Equação IV.12}$$

com um coeficiente de correlação de 0,998. O biossensor apresentou um limite de detecção e quantificação de 0,6 e 2,0  $\mu mol L^{-1}$ , respectivamente, calculados seguindo as recomendações da IUPAC [150] Além disso, o tempo de resposta do biossensor foi de 0,5 s. Portanto, este biossensor é uma alternativa promissora para a detecção da glutatona total (GSH+GSSG) em amostra de plasma humano, sendo que as concentrações da GSH e GSSG no plasma são normalmente na faixa de micromolar [30,31,32,33].



**Figura IV.28.** Gráfico de  $|\Delta I|$  vs  $[\text{GSH}+\text{GSSG}]$  do biossensor. *Gráfico inserido:* região da faixa linear. Medidas realizadas em solução PBS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 contendo  $600 \mu\text{mol L}^{-1}$  de NADH e  $300 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e com 50 U da GR e 30 U da GPx.

#### IV.7.2 Estudo de repetibilidade e tempo de vida do biossensor

A repetibilidade das determinações utilizando o biossensor (ECV+MWCNT-QUIT/3,5-ADNB-at/GR/GPx) foi obtida monitorando a corrente ( $\Delta I$ ) por cronoamperometria na presença de  $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de GSH+GSSG (solução padrão) para  $n = 4$  e calculado o desvio padrão relativo (DPR), sendo este de 7,0%. A repetibilidade da construção do biossensor foi avaliada empregando-se as mesmas condições descritas acima, usando a resposta obtida com 4 eletrodos diferentes, modificados seguindo o mesmo procedimento e o DPR obtido para a construção do biossensor (o ECV+MWCNT/QUIT/3,5-ADNB-at/GR/GPx) foi de 8,0%.

A estabilidade do biossensor (ECV+MWCNT-QUIT/3,5-ADNB-at/GR/GPx) foi avaliada realizando o máximo de determinações cronoamperométricas para  $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de GSH+GSSG (solução padrão) com o mesmo eletrodo, sendo possível

realizar até 15 determinações sem que nenhuma mudança significativa na resposta fosse observada. O tempo de vida do biossensor foi avaliado em solução PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,0 fazendo adições sucessivas de GSH+GSSG (solução padrão) e monitorando a corrente ( $\Delta I$ ) por cronoamperometria. O biossensor modificado foi armazenado a 4 °C e imerso em solução PBS 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,0 e apresentou estabilidade de 3 dias. Depois disso, as enzimas perderam sua atividade e com isso o biossensor não apresentou mais resposta.

## **V. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS**



## V.1 Considerações finais e perspectivas

Este trabalho demonstra que a plataforma nanoestruturada composta por MWCNT e dispersos em QUIT, fornece uma excelente matriz para a imobilização do mediador de elétrons (ácido 3,5-dinitrobenzóico, 3,5-ADNB), e para as enzimas glutatona redutase e peroxidase. Com isso, foi possível a construção de dois biossensores, sendo um para detecção da glutatona oxidada por meio da imobilização da enzima glutatona redutase, e outro para a detecção da glutatona total (GSH+GSSG) através da imobilização das duas enzimas glutatona redutase e glutatona peroxidase.

Após a montagem da plataforma, o mediador de elétrons empregado foi facilmente ativado utilizando voltametria cíclica. Após a ativação, o par redox R-NO/R-NHOH apresentou uma boa definição e um  $E^0$  em sobrepotencial baixo. Além disso, o mediador de elétrons apresentou uma eletrocatalise eficiente para o NADH.

Antes do processo de imobilização da enzima, foi possível caracterizar o par redox empregando a voltametria cíclica onde se obteve alguns parâmetros cinéticos, como o valor de  $n$ ,  $\alpha$ ,  $k_s$  que foram de 2,3, 0,5 e  $14 \text{ s}^{-1}$  respectivamente, referente ao processo redox do mediador. 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 potencial de oxidação do NADH, evidenciando assim, a eficiência do medidor empregado. Os estudos cronoamperométricos foram empregados aplicando baixo potencial para calcular a constante cinética ( $k_{\text{obs}} = 5,1 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) e coeficiente de difusão ( $D = 9,0 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ) para o sensor de NADH.

Após o processo de ativação da superfície nanoestruturada, a enzima glutatona redutase foi facilmente imobilizada na superfície do eletrodo usando QUIT e glutaraldeído. Empregando medidas cronoamperométricas, foi possível analisar a influência de cada parâmetro utilizado na construção do biossensor para detecção de GSSG. As melhores condições para o emprego do biossensor foram: 50 unidades de GR,  $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  de QUIT e  $600 \mu\text{mol L}^{-1}$  de NADH.

A curva analítica obtida para o biossensor (ECV+MWCNT-QUIT/3,5-ADNB-at/GR) apresentou uma faixa linear de 2,0 a  $35 \mu\text{mol L}^{-1}$  para a detecção de GSSG. Já os limites de detecção e quantificação foram  $0,6$  e  $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente.

O biossensor proposto mostrou-se eficiente para a determinação da GSSG, apresentando um tempo de resposta rápido e uma sensibilidade de  $6,24 \text{ m.A.L mol}^{-1}$ . Além disso, o biossensor construído apresentou uma estabilidade para 20 determinações sem que nenhuma mudança significativa na resposta fosse observada e a repetibilidade das medidas e do processo de construção do biossensor apresentaram um desvio padrão relativo de 6,0% e 7,0%, respectivamente.

A constante  $K_M^{GPP}$  para o biossensor para detecção de GSSG foi calculada a partir do método gráfico de Lineweaver-Burk e o valor encontrado foi de  $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ , o qual está de acordo com os valores encontrados na literatura.

Utilizando a mesma plataforma nanoestruturada foi possível imobilizar as duas enzimas (GR e GPx), sendo esse biossensor destinado para a detecção da glutathiona total (GSH+GSSG). O biossensor (ECV+MWCNT-QUIT/3,5-ADNB-at/GR/GPx) apresentou uma faixa linear  $2,0$  a  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  para a detecção da glutathiona total, apresentando um limite de detecção e de quantificação de  $0,6$  e  $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. Em relação à estabilidade foi possível realizar 15 determinações sem observar nenhuma mudança significativa na resposta do biossensor. Já a repetibilidade das medidas e do processo de construção do biossensor apresentou um desvio padrão relativo de 7,0 % e 8,0%, respectivamente.

Diante disso, o trabalho demonstrou que é possível determinar a razão glutathiona reduzida/oxidada, através dos biossensores desenvolvidos, com isso, o estresse oxidativo será avaliado baseado na determinação da razão glutathiona reduzida/oxidada. Portanto, pretende-se dar continuidade aos estudos, tentando construir dispositivos descartáveis, realizar a validação do método e por fim aplicar os biossensores em amostra reais, como o plasma humano, visto que os mesmos apresenta potencial para detecção da glutathiona oxidada e da glutathiona total.

## **VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



- 
- [1] B. Halliwell; J.M.C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4<sup>th</sup> ed.; Oxford University Press: Oxford, (2007).
- [2] A.C. Oliveira; I.B. Valentin; C.A. Silva; E.J.H. Bechara; M.T.S. Trevisan; M.O.F. Goulart, *Química Nova*, 32 (2009) 689.
- [3] A.L.B.S. Barreiros; J.P. David; J.M. David, *Química Nova*, 29 (2006) 113.
- [4] S.R. Husain; J. Cillard; P. Cillard, *Phytochemistry*, 26 (1987) 2489.
- [5] T. Finkel; N. J. Holbrook, *Nature*, 408 (2000) 239.
- [6] P. Pietta, *Journal of Natural Products*, 63 (2000) 1035.
- [7] A. Meister, *Journal of Biological Chemistry*, 263 (1988) 17205.
- [8] A. Meister; M.E. Anderson, *Annual Review of Biochemistry*, 52 (1984) 711.
- [9] A. Meister, *Science*, 220 (1983) 472.
- [10] A.J.L. Cooper; B.S. Kristal, *Biological Chemistry*, 378 (1997) 793.
- [11] A. Meister; A. Larsson, In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. The 6<sup>th</sup> Edition, New York, McGraw-Hill; (1989).
- [12] D.J. Reed, M.W. Fariss, *Pharmacological Reviews*, 36 (1994) 235.
- [13] X.Q. Shan; T.Y. Aw; D.P. Jones, *Pharmacology and Therapeutics*, 47 (1990) 61.
- [14] J.M. Gaullier, P. Lafontant, A. Valla, M. Bazin, , M.Giraud; R. Santus, *Biochemical and Biophysical research communications*, 203 (1994) 1668.
- [15] S. Timur; D. Odaci; A. Dincer; F. Zihnioglu; A. Telefoncu, *Talanta*, 74 (2008) 1492.
- [16] N. Narang; P. Chauhan; C.S. Jain; Pundir, *International Journal Biological Macromolecules*, 50 (2008) 672.
- [17] H.B. Noh; P. Chandra; J.O. Monn; Y.B. Shim, *Biomaterials*, 33 (2012) 2600.
- [18] F. Visioli; J.F. Keaney Jr.; B. Halliwell, *Cardiovascular Research*, 47 (2000) 409.
- [19] T. Finkel; N.J. Holbrook; *Nature*, 408 (2000) 239.
- [20] B. Halliwell, *The Lancet*, 355 (2000) 1179.
- [21] A.G. Flores; J.P. Pardo; J. L. Rendón, *Parasitology International*, 60 (2011) 156.
- [22] B. Can; G.K. Erkmen; O. Dalmizrak; I.H. Ogus; N. Ozer, *The Protein Journal*, 29 (2010) 250.
- [23] P.C. Huber; W.P. Almeida; A. Fátima, *Química Nova*, 31 (2008) 1170.
- [24] L.R. Junior; N.F. Hoehr; A.P. Vellasco; L.T. Kubota, *Química Nova*, 24 (2001) 112.

- [25] A.L.A. Ferreira; L.S. Matsubara, *Revista Associação Médica Brasileira*, 43 (1997) 61.
- [26] L.D. Mello; A. Kisner; M.O.F. Goulart; L.T. Kubota, *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening*, 16 (2013) 109.
- [27] I. Dalle-Donne; R. Rossi; G. Colombo; D. Giustarini; A. Milzani, *Trends Biochemical Science*, 34 (2009) 85.
- [28] P. Monostori; G. Wittman; E. Karg; S. Túri, *Journal of Chromatography B*, 877 (2009) 3331.
- [29] S.M.L. Vasconcelos; M.O.F. Goulart; J.B.F. Moura; V. Manfredini; M.S. Benfato; L.T. Kubota, *Química Nova*, 30 (2007) 1323.
- [30] J.C. Harfield; B.Mc. Christopher; R.G. Compton, *Analyst*, 137 (2012) 2285.
- [31] F. Michelet; R. Gueguen; P. Leroy; M. Wellman; A. Nicolas; G. Siest, *Clinical Chemistry*, 41 (1995) 1509.
- [32] C.S. Yang; S.T. Chou; L. Liu; P.J. Tsai; J.S. Kuo, *Journal Chromatography B*, 674 (1995) 23.
- [33] W.A. Kleinman; J.P. Richie, *Biochemical Pharmacology*, 60 (2000) 19.
- [34] C.C. Yeh; M.F. Hou; S.H. Wu; S.M. Tsai; S.K. Lin; L.A. Hou; H. Ma; L.Y. Tsai, *Cell Biochemistry Function*, 24 (2005) 555.
- [35] W. Maetzler; S. P. Schmid; I. Wurster; I. Liepelt; A. Gaenslen; T. Gasser ; D. Berg, *Movement Disorders*, 26 ( 2011) 176.
- [36] M.A. Mansoor; A.M. Svardal; P.M Ueland, *Analytical Biochemistry*, 200 (1992) 218.
- [37] M.A. Mansoor; A.M. Svardal; J. Scheneede; P.M. Ueland, *Clinical Chemistry*, 38 (1992) 1316.
- [38] K. Fukunaga; N. Nakazono; M. Yoshida, *Chromatography*, 48 (1998) 690.
- [39] C. Parmentier; P. Leroy; M. Wellman; A. Nicolas, *Journal Chromatography B*, 719 (1998) 37.
- [40] X.P. Chen; R.F. Cross; A.G. Clark; W.L. Baker, *Mikrochimica Acta*, 130 (1999) 225.
- [41] A. Besada; N.B. Tadros; Y.A. Gawargious, *Mikrochimica Acta*, 3 (1989) 143.
- [42] M.A. Raggi; L. Nobile; A.G. Giovannini, *Journal Pharmaceutical Biomedical Analysis*, 9 (1991) 1037.
- [43] K. Havel; K. Pritts; T. Wielgos, *Journal Chromatography A*, 215 (1999) 853.

- [44] R.P. Mason; G.H. Cha; G.H. Gorrie; E.E. Babcock; P.P. Antich, *FEBS Lett.* 30 (1993) 318.
- [45] J. Zhang; Z. Hu; X. Chen, *Talanta*, 65 (2005) 986.
- [46] F. Ricci; F. Arduini; C.S. Tuta; U. Sozzo; D. Moscone; A. Amine; G. Palleschi, *Analytical Chimica Acta*, 558 (2006) 164.
- [47] D. Giustarini, I. Dalle-Donne, R. Colombo, A. Milzani, R. Rossi, *Free Radical Biology and Medicine*, 35 (2003) 1365.
- [48] A.K. Sakhi, K.M. Russnes, S. Smeland, R. Blomhoff, T.E. Gundersen, *Journal Chromatography A*, 1104 (2006) 179
- [49] J.P. Steghens, F. Flouri'e, K. Arab, C. Collombel, *J Journal Chromatography B*, 798 (2003) 343.
- [50] S. Wang, H. Ma, J. Li, X. Chen, Z. Bao, S. Sun, *Talanta*, 70 (2006) 518.
- [51] V.H. Cohn, J. Lyle, *Analytical Biochemistry*, 14 (1966) 434.
- [52] F. Tietze, *Analytical Biochemistry*, 27 (1969) 502.
- [53] R. Brigelius, C. Muckel, T.P.M. Akerboom, H. Sies, *Biochemical Pharmacology*, 32 (1983) 2529.
- [54] G.L. Ellman, *Archives Biochemistry and Biophysics*, 82 (1959) 70.
- [55] A.R.T.S. Araujo, M.L.M.F.S. Saraiva; J.L.F.C. Lima, *Talanta*, 74 (2008) 1511.
- [56] C.W.I. Owes; R.V. Belcher, *Biochemical Journal*, 94 (1965) 705.
- [57] R. Brigelius; C. Muckel; T.P. Akerboom; H. Sies, *Biochemical Pharmacology*, 32 (1983) 2529.
- [58] H. Guntherberg, J. Rost, *Analytical Biochemistry*, 15 (1966) 205.
- [59] W.L. Hinze, T.E. Riehl, H.N. Singh, Y. Baba, *Analytical Chemistry*, 56 (1984) 2180.
- [60] F.J. Romero, W. Mueller-Klieser, *Journal Bioluminescence and Chemiluminescence*, 13 (1998) 263.
- [61] P.J. Hissin; R.A. Hilf, *Analytical Biochemistry*, 74 (1976) 214.
- [62] A.R. Ivanov; I.V. Nazimov; L. Baratova; A.P. Lobazov; G.B. Popovich, *Journal Chromatography A*, 913 (2001) 315.
- [63] B. Rezaei, A. Mokhtari, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 66 (2007) 359.
- [64] H.Y. Han, Z.K. He, Y.E. Zeng, *Microchimica Acta*, 155 (2006) 431.
- [65] L. Manna; L. Valvo; P. Betto, *Journal Chromatography A*, 846 (1999) 59.

- [66] R.R. Moore; C.E. Banks; R.G. Compton, *Analyst*, 129 (2004) 755.
- [67] W.R. Lacourse; G.S. Owens, *Analytical Chimica Acta*, 307 (1995) 301.
- [68] S. Zhang; F. Huang; J. Zhao; L. Wen; F. Zhou; P. Yang, *Talanta*, 58 (2002) 451.
- [69] H.W. Kroto; J.R. Heath; C.O. O'Brien; R. F. Curl; R.E. Smalley, *Nature*, 318 (1985) 162.
- [70] S. Iijima, *Nature*, 354 (1991) 56.
- [71] J. Wang; R.P. Deo; M. Musameh, *Electroanalysis*, 15 (2003) 1830.
- [72] B.S. Sherigara; W. Kutner; F.D. Souza, *Electroanalysis*, 15 (2003) 753.
- [73] P.M. Ajayan, *Chemical Reviews*, 99 (1999) 1787.
- [74] M.S. Dresselhaus; G. Dresselhaus; A. Jairo, *Annual Review of Materials Research*, 34 (2004) 247.
- [75] W. Zheng, j. Li, Y.F. Zheng, *Biosensors and Bioelectronics*, 23 (2008) 1562.
- [76] I. Capek. *Advances in Colloid and Interface Science*. 150 (2009) 63.
- [77] M. Valcárcel; B.M. Simonet; S. Cárdenas; B. Suárez, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382 (2005) 1783.
- [78] R.C. Alkire; D.M. Kolb; J. Lipkowski; P.N. Ross, *Chemically modified electrodes*. vol. 11, Wiley-VCH, Weinheim, 2009.
- [79] R.L. McCreery, *Carbon electrodes: Structural effects on electron transfer kinetics in electroanalytical chemistry*. vol. 17, Dekker, New York, 1991.
- [80] C.E. Banks, R.G. Compton, *Analytical Sciences*, 21 (2005) 1263.
- [81] C.E. Banks; R.R. Moore; T.J. Davies; R.G. Compton, *Chemical Communications*, 16 (2004) 1804.
- [82] G.G. Wildgoose; P. Abiman; R.G. Compton, *Journal of Materials Chemistry*, 19 (2009) 4875.
- [83] J. Wang, *Electroanalysis*, 17 (2005) 7.
- [84] A. Merkoçi, *Microchimica Acta*, 152 (2006) 157.
- [85] S.N. Kim, J.F. Rusling, *Advanced Materials*, 19 (2007) 3214.
- [86] A. Hirsch, *Angewandte Chemie International Edition*, 41 (2002) 1853.
- [87] S. Banerjee; T.H. Benny; S.S. Wong, *Advanced Materials*, 17 (2005) 17.
- [88] Y.P. Sun; K. Pu; Y. Lin; W. Huang, *Accounts of Chemical Research*, 35 (2002) 1096.
- [89] A.G.S. Filho; S.B. Fagan, *Química Nova*, 30 (2007) 1695.

- [90] D. Tasis; N. Tagmatarchis; A. Bianco; M. Prato, *Chemical Reviews*, 106 (2006) 1105.
- [91] N. Sahoo; N.G. Ranab; J.W. Chob; L. Li; S.H. Chana, *Progress in Polymer Science*, 35 (2010) 837.
- [92] K. Yurekli; C.A. Mitchel; R. Krishnamootri, *Journal of the American Chemical Society*, 126 (2004) 9902.
- [93] G.A.M. Sáfar; H.B. Ribeiro; L.M. Malard; F.O. Plentz; C. Fantini; A.P. Santos, *Chemical Physics Letters*, 462 (2008) 109.
- [94] Z.J. Guo; P.J. Sadler; S.C. Tsang, *Advanced Materials*, 10 (1998) 701.
- [95] S.E. Moulton; A.L. Minett; R. Murphy; K.P. Ryan, D. McCarthy, *Carbon*, 43 (2005) 1879.
- [96] C. Lynam; N. Gilmartin; Al. Minet; R. O’Kennedy, G. Wallace, *Carbon*, 47 (2009) 2337.
- [97] D. Tasis; N. Tagmatarchis; A. Bianco; M. Prato, *Chemical Reviews*, 106 (2006) 1105.
- [98] H. Park; J. Zhao; J.P. Lu, *Nano Letters*, 6 (2006) 916.
- [99] S. Minnikanti; P. Skeath; N. Peixoto, *Carbon*, 47 (2009) 884 – 893.
- [100] I.I. Suni, *Trends in Analytical Chemistry*, 27 (2008) 604 – 611.
- [101] J.M. Gaullier; P. Lafontant; A. Valla, M. Bazin; M. Giraud; R. Santus, *Biochemical and Biophysical research communication*, 203 (1994) 1668.
- [102] E.V. Ivanova; V.S. Sergeeva; J. Oni; C. Kurzawa; A.D. Ryabov; W. Schuhmann, *Bioelectrochemistry*, 60 (2003) 65.
- [103] L. Stoica; A. Lindgren-Sjolander; T. Ruzgas; L. Gorton, *Analytical Chemistry*, 76 (2004) 4690.
- [104] M.M. Ardakani; P. Rahimi; P.E. Karami; H.R. Zare; H. Naeimi, *Sensors and Actuators B*, 123 (2007) 763 .
- [105] B.K. Jena; C.R. Raj, *Analytical Chemistry*, 78 (2006) 6332.
- [106] H. Heli; M. Hajjizadeh; A. Jabbari; A.A. Moosavi-Movahedi, *Analytical Chemistry*, 388 (2009) 81.
- [107] S. Serban; N. E. Murr, *Biosensors and Bioelectronics*, 20 (2004) 161.
- [108] A. Salimi; R. Hallaj; M.K. Amini, *Analytical Chimica Acta*, 534 (2005) 335.
- [109] D. Yang; H. Liu, *Biosensors and Bioelectronics*, 25 (2009) 733.
- [110] A.A. Ensafi; S. Behyan, *Sensors and Actuators B*, 122 (2007) 282.

- [111] M. Santhiago, P.R. Lima, W.J.R. Santos, A.B. Oliveira, L.T. Kubota, *Electrochimica Acta*, 54 (2009) 6609.
- [112] P.R. Lima; W. J.R. Santos; A.B. Oliveira; M.O.F. Goulart; L.T. Kubota, *Biosensors and Bioelectronics*, 24 (2008) 448.
- [113] M. Zhang; W. Gorski, *Analytical Chemistry*, 77 (2005) 3960.
- [114] L. Gorton; E. Domínguez, *Reviews in Molecular Biotechnology*, 82 (2002) 371.
- [115] F.H. Westheimer; H.F. Fischer; E.E. Conn; B. Vennesland, *Journal of the American Chemical Society*, 73 (1951) 2403.
- [116] C.C. Corrêa, M. santhiago, C.C.C. Silva, A.L.B. Formiga, L.T. Kubota, *Electroanalysis*, 23 (2011) 2562
- [117] C.C.C. Silva, M.C. Breitzkreitz, M. Santhiago, C.C. Corrêa, L.T. Kubota, *Electrochimica Acta*, 71 (2012) 150
- [118] Z. Wu, W. Feng, Y. Feng, Q. Liu, X. Xu, T. Sekino, A. Fuji, M. Ozaki, *Carbon*, 45 (2007) 1212.
- [119] Y.T. Shieh, H.M. Wu, Y.K. Twu, Y.C. Chung, *Colloid Polymer Science*, 288 (2010) 377.
- [120] Y. Wang, W. Wei, X. Liu, X. Zeng, *Materials Science Engineering C*, 29 (2009) 50.
- [121] C. Tang, C. Chen, Q. Zhang, K. Wang, Q. Fu, X. Zhang, *Polymer Degradation and Stability*, 94 (2009) 124.
- [122] J. Tkac, J.W. Whittaker, T. Ruzgas, *Biosensors and Bioelectronics*, 22 (2007) 1820.
- [123] N.V. Majeti, R. Kumar, *Reactive and Functional Polymer*, 46 (2000) 1.
- [124] C.K.S. Pillai, W. Paul, C.P. Sharma, *Progress in Polymer Science*, 34 (2009) 641.
- [125] A.J. Bard; L. Falkner, *Electrochemical methods – Fundamental and Applications*, 2nd, ed. Wiley, New York, 2001.
- [126] Y. Liu; J. Tang; X. Chen; J.H. Xin, *Carbon*, 43 (2005) 3178.
- [127] S. Sam; L. Touahir; J.S. Andresa; P. Allongue; J.N. Chazalviel; A.C. Gouget-Laemmel; C.H. Villeneuve; A. Morailon; F. Ozanam; N. Gabouze; S. Djebbar, *Lagmuir*, 26 (2010) 809.
- [128] P. Chaignon ; S. Cortial; A.P. Ventura; P. Lopes ; F. Halgand ; O. Laprevote; J. Ouazzani, *Enzyme and Microbial Technology*, 39 (2006) 1499.

- [129] R. Pauliukaite, M.E. Ghica, O.F. Fatibello, C.M.A. Brett. *Analytical Chemistry*, 81 (2009) 5364.
- [130] E. Laviron, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 101 (1979) 19.
- [131] N. Mano, A. Kahn. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 477 (1999) 79 .
- [132] E.S. Gil; L.T. Kubota, *Bioelectrochemistry*, 51 (2000) 145.
- [133] S.M. Golabi; H.R. Zar; M. Hamzehloo, *Electroanalysis*, 14 (2002) 611.
- [134] H.R. Zare; N. Nasirizadeh; M.M. Ardakani, *Journal of electroanalytical Chemistry*, 577 (2005) 25.
- [135] P.R. Lima, “*Eletrodo modificado à base de 4-nitroftalonitrila: sensor amperométrico para a quantificação de alguns antioxidantes de relevância biológica*”, (Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas), 97, 2009.
- [136] L. Zhu, J. Zhai, R. Yang, C. Tian, L. Guo, *Biosensors and Bioelectronics*, 22 (2007) 2768 – 2773.
- [137] C.P. Andrieux, J.M. Saveant, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 93 (1978) 163.
- [138] A.M.A. Senaidy, *European Journal of Scientific Research*, 48 (2010) 142.
- [139] C. Deng, J. Chen, X. Chen, M. Wang, Z. Nie, S. Yao. *Electrochimica Acta*, 54 (2009) 3298.
- [140] Z. Galus. *Fundamentals of Electrochemical Analysis*, Ellis Horwood Press, New York, 1976.
- [141] F.A.S. Silva; C.B. Lopes; E.O. Costa; P.R. Lima; L.T. Kubota; M.O.F. Goulart, *Electrochemistry Communications*, 12 (2010) 450.
- [142] R. Antiochia; I. Lavagnini; F. Magno, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381 (2005) 1355.
- [143] A.D. Santos; L. Gorton; L.T. Kubota, *Electroanalysis*, 14 (2002) 805.
- [144] V.S. Vasantha; S. M. Chen, *Electrochimica Acta*, 52 (2006) 665.
- [145] F.D. Munteanu. D. Dicu; I.C. Popescu; L. Gorton, *Electroanalysis*, 15 (2003) 386.
- [146] P.R. Lima, P.R.B. Miranda, A.B. Oliveira, M.O.F. Goulart, L.T. Kubota, *Electroanalysis*, 21 (2009) 2311.
- [147] A. U. Pereira, A. D. Santos, L. T. Kubota, *Electrochimica Acta*, 48 (2003) 3541.
- [148] N. Mano, A. Kuhn *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 477 (1999) 79.

- 
- [149] H.M. Nassef, A.E. Radi, C.K. O'Sullivan, *Electrochemistry Communications*. 8 (2006) 1719.
- [150] Analytical Methods Committee. *Analyst*, 112 (1987) 199.
- [151] A.C. Pereira; M.R. Aguiar; A. Kisner; D.V. Macedo; L.T. Kubota, *Sensors and Actuators B*. 124 (2007) 269.
- [152] S.S. Rosatto; L.T. Kubota; G.O. Neto, *Analytica Chimica Acta*, 390 (1999) 65.
- [153] A. Chaubey; B.D. Malhotra, *Biosensors and Bioelectronics*, 1 (2002) 441.
- [154] B. C. Janegitz; L.H.J. Marcolino; O.J. Fatibello, *Química Nova*, 30 (2007) 1673.
- [155] M. Santhiago, I.C. Vieira, *Sensors and Actuators B*, 128 (2007) 279.
- [156] S.M. Griffith, T.G. Brewster, J.J. Steiner, *Annals of Botany*, 87 (2001) 599.