

---

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



**UNICAMP**

## **TESE DE DOUTORADO**

**ELETRODO MODIFICADO À BASE DE  
4-NITROFTALONITRILA: SENSOR AMPEROMÉTRICO  
PARA QUANTIFICAÇÃO DE ALGUNS ANTIOXIDANTES  
DE RELEVÂNCIA BIOLÓGICA**

**Phabyanno Rodrigues Lima**

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

**Co-Orientadora:** Profa. Dra. Marília O. F. Goulart

**Campinas - SP  
Julho/2009**

---

---

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

L628e	<p>Lima, Phabyanno Rodrigues. Eletrodo modificado à base de 4-nitroftalônitrila: sensor amperométrico para quantificação de alguns antioxidantes de relevância biológica / Phabyanno Rodrigues Lima. -- Campinas, SP: [s.n], 2009.</p> <p style="text-align: center;">Orientador: Lauro Tatsuo Kubota. Co-orientadora: Marília Oliveira Fonseca Goulart.</p> <p style="text-align: center;">Tese - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.</p> <p style="text-align: center;">1. Sensor amperométrico. 2. 4-nitroftalônitrila. 3. Antioxidante. 4. Eletrodos quimicamente modificados. I. Kubota, Lauro Tatsuo. II. Goulart, Marília Oliveira Fonseca. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. IV. Título.</p>
-------	---

**Título em inglês:** Modified electrode based on 4-nitrophthalonitrile: amperometric sensor for quantification of some antioxidants of biological relevance

**Palavras-chaves em inglês:** Amperometric sensor, 4-nitrophthalonitrile, Antioxidant, Chemically modified electrodes

**Área de concentração:** Química Analítica

**Titulação:** Doutor em Ciências

**Banca examinadora:** Lauro Tatsuo Kubota (orientador), Zeki Naal (FCF-USP-Ribeirão Preto), Maria Del Pilar Taboada Sotomayor (IQ-UNESP), André Luiz Barboza Formiga (IQ-UNICAMP), José Alberto Fracassi da Silva (IQ-UNICAMP)

**Data de defesa:** 16/07/2009

**A OPORTUNIDADE DESTE TRABALHO**

---

*Este trabalho só foi possível graças ao surgimento do “Projeto: Desenvolvimento de Sensores a Base de Polinitrilas”, que de forma inovadora intercambiou as relações entre alunos e professores de Universidades de destacado reconhecimento pela comunidade científica e tecnológica.*

*Neste contexto, o Laboratório de Eletroquímica, Eletroanalítica e Desenvolvimento de Sensores – LEEDS, alocado no Departamento de Analítica do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e o Grupo de Eletroquímica do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) proporcionaram investimentos na qualificação de estudantes. Este relacionamento possibilitou aos alunos conhecerem de perto a rotina dos laboratórios de ambas as Universidades, bem como seus problemas e deficiências acadêmico-tecnológicas.*

*Estas atividades desenvolvidas tanto na UNICAMP quanto na UFAL foram coordenadas pelos Professores Lauro T. Kubota e Marília O. F. Goulart, respectivamente, de forma segura, simples, prazerosa, inovadora, motivadora, agregando, portanto, um ambiente descontraído para o desenvolvimento das atividades ao longo de vários anos.*

*O desenvolvimento dessas atividades contou também com a colaboração do Dr. Adriano Oliveira, lotado até pouco tempo atrás no Instituto de Química Inorgânica da Universidade de Bonn, Alemanha, o qual foi responsável pela síntese de derivados de polinitrila. Estas pesquisas foram incentivadas por meio de várias agências de fomento, tais como CNPq, CAPES/PROCAD, FAPESP.*

**DEDICATÓRIA**

---

---

*Agradeço e Dedico, de forma muito especial, este trabalho a DEUS:*

*“Tu que abençoaste as nossas vidas e que nos guiaste nessa jornada, apontando-nos o caminho, a Ti humildemente agradeço e peço que nos ilumine nas horas de indecisão”;*

*“... Se um dia, já homem feito e realizado, sentires que a terra cede a teus pés, que tuas obras se desmoronam, que não há ninguém a tua volta para te estender a mão, esquece a tua maturidade, passa pela tua mocidade, volta a tua infância e balbucia entre lágrimas e esperanças as últimas palavras que sempre te restarão na alma: Minha Mãe (Valdice R. Lima), Meu Pai (Manoel B. Lima), Meus Irmãos (Brunno R. Lima, Rosana Guersa R. Lima e Ana Paula R. Lima), Meu cunhado irmão Sandro Wilson e Meus lindos sobrinhos Bielzinho (Gabriel) e Guguinha (Gustavo) e minha linda noiva (Edvânia Pontes).”*

*À minha família.*

*“Nada do que foi será, de novo do jeito que já foi um dia.”*  
*L. Santos e N. Motta*

**A FRATERNIDADE**

---

---

*A meus amigos do LEEDS, Wilney Santos (“Hum, hum, hum... Povo cinzento”), Murilo Santhiago (“Issaaaaaaaaaaa, é nois”) e Caio Nakavaki de Oliveira (“Como assim?” “Like How”) pelas “noitadas”, “cervejadas”, brincadeiras, zelo, vontade e dedicação árdua durante 24 horas por dia aos trabalhos experimentais realizados ao longo do doutorado.*

*“Chegamos ao final de mais uma caminhada. Durante os longos anos de convívio, tornamo-nos amigos, enfrentamos juntos todos os obstáculos do caminho. Compartilhamos o nervosismo das vésperas das provas, trocamos olhares tensos, na tentativa de encontrar uma solução para as dificuldades. Lamentamos os erros cometidos, mas, vibramos intensamente a cada vitória. Agora seguiremos caminhos “diferentes” em busca de novas conquistas. No entanto, estamos certos de que esta partida jamais se tornará um adeus, mas, sim um até breve.”*

*“Não importa onde você parou, em que momento da vida você cansou. Recomeçar é dar uma nova chance a si mesmo, é renovar as esperanças na vida e o mais importante, acreditar em você de novo...”*

***Carlos Drummond de Andrade***

---

**AO PROCAD/CAPES**

---

*Neste tópico, gostaria de destacar a importância das atividades em cooperação entre as universidades UFAL e UNICAMP incentivadas pelo Governo Federal. Particularmente, nestes três anos de doutorado foi possível orientar diversos alunos provenientes da UFAL, trocar conhecimentos e o mais importante, fazer novos amigos, o qual destacaria o **José Rui Reys, Paulo Rogério, Fabrícia Ferreira** e os mais recentes membros do LEQUI/UFAL, **Francisco Silva e Cleylton Lopes**. Estes proporcionaram um ambiente familiar, descontraído, prazeroso, amenizando as saudades de outrora e aumentando, portanto, a entropia do macroambiente. Obrigado galera e viva o PROCAD/CAPES!*

---

**AGRADECIMENTOS**

---

*Ao Prof. Dr. Lauro T. Kubota (UNICAMP), valeu o período de convívio, ensinamentos de forma segura, grato pela dedicação, oportunidade, conselhos, incentivo durante minha vida acadêmica e pela paciência demonstrada durante os 3 anos de doutorado;*

*À Profa. Dra. Marília O. F. Goulart (UFAL), por acreditar tanto na minha pessoa quanto no projeto, pelo constante incentivo e ensinamentos durante minha vida acadêmica. A Ti meus sinceros agradecimentos;*

*Ao Prof. Dr. Christian Amatore (ENS, Paris), pelas valiosas discussões do início do trabalho, as quais foram importantíssimas para o bom andamento das atividades;*

*Ao Dr. Adriano Bof de Oliveira (Universidade de Bonn, Alemanha) pela amizade e materiais enviados durante o doutorado;*

*Ao Prof. Dr. Flávio Damos (UFVJM) e Profa. Dra. Rita Luz (UFVJM), pelo intercâmbio de conhecimento proporcionado no início das atividades, meus sinceros agradecimentos;*

*Aos ex- e atuais colegas, companheiros e amigos do LEEDS com os quais foram divididos os últimos anos de aprendizado;*

*Ao Prof. Dr. Josealdo Tonholo (UFAL) e Dr. Almir Mirapalheta (UFAL) por acreditarem minha pessoa e por me ensinarem os passos mais importantes e valiosos de minha vida acadêmica;*

*À Profa. Selma Souza da Silva (CEFET-AL), maior incentivadora da minha profissão, quando ainda estudava no curso técnico de química industrial (CEFET-AL);*

*A meus amigos de Alagoas, Tenyson, Mycon, Rodrigo, Chico (CEFET-AL), Cícero, Paulo, Aristides, Écio, Antônio, Alan Mirapalheta, Livinha, Silvia Uchoa, Fabiane, Francine, Almir, Aline, Rui, Jonathan, Sandra (MST), Adriana Ribeiro, Sandra (Nutrição), Amaro, Clariane, pela luta diária e brincadeiras durante anos de convívio;*

*À Coordenadora da CPG/IQ/UNICAMP, Profa. Dra. Solange Cadore e ao Prof. Dr. Ivo Milton Raimundo Júnior pela compreensão no momento mais importante durante o curso de doutorado;*

*Aos colegas do Laboratório de Quimiometria em Química Analítica – LQQA;*

*Aos funcionários do Instituto de Química da UNICAMP, em especial a Izabel Aquino Calasso, Izabel Ribeiro Filippi e Miguel da Silva Morel (CPG) e Mário (mecânica fina) pela atenciosa e amigável forma com que sempre se dirigem aos alunos;*

*À FAPESP pela bolsa e auxílio concedidos;*

*Enfim, a todos, que de uma forma direta ou indireta colaboraram com este projeto, os nossos mais sinceros agradecimentos.*

## CURRICULUM VITAE

---

---

**Nome:** Phabyanno Rodrigues Lima   **Naturalidade:** Pão de Açúcar-AL

**Data de nascimento:** 19/03/1981

### I. Formação Acadêmica

#### I.1. Graduação

##### **Química**

Universidade Federal de Alagoas - UFAL, Maceió-AL

Início: 2000/Conclusão: 2003. Local: Maceió – AL

Título da monografia: *Clorato: duplo vilão para os processos de cloro e soda*

**Orientador:** Josealdo Tonholo

#### I.2. Pós-Graduação

##### **Mestrado em Química e Biotecnologia**

Universidade Federal de Alagoas – UFAL, Maceió-AL

Título da Dissertação: *Investigação da Formação e Efeitos do Clorato sobre a Reação de Desprendimento de Hidrogênio no Processo de Cloro-Soda com Tecnologia de Diafragma.*

**Orientador:** Prof. Dr. Josealdo Tonholo

Início: 2004/Conclusão: 2006. Local: Maceió-AL

##### **Doutorado em Ciências**

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas-SP

Título da Tese: *Eletrodo modificado à base de 4-nitroftalonitrila: Sensor amperométrico para quantificação de alguns antioxidantes de relevância biológica.*

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

**Co-Orientadora:** Profa. Dra. Marília O.F. Goulart

Início: 2006/Conclusão: 2009. Local: Campinas, São Paulo

### II. Produção Científica

#### **Artigos Publicados Durante o Doutorado**

II.1.1. LIMA, P. R.; SANTOS, W. J. R.; OLIVEIRA, LUZ, R. C. S.; DAMOS, F. S.; OLIVEIRA, A. B.; GOULART, M. O. F.; KUBOTA, L. T. An amperometric sensor based on electrochemically triggered reaction:

Redox-active Ar-NO/Ar-NHOH from 4-nitrophthalonitrile-modified electrode for the low voltage cysteine detection. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 612, 2008, 87-96.

II.1.2. LIMA, P. R.; SANTOS, W. J. R.; OLIVEIRA, A. B.; GOULART, M. O. F.; KUBOTA, L. T. Electrocatalytic activity of 4-nitrophthalonitrile-modified electrode for the *L*-glutathione detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47, 2008, 758-764.

II.1.3. LIMA, P. R.; SANTOS, W. J. R.; OLIVEIRA, A. B.; GOULART, M. O. F.; KUBOTA, L. T. Electrochemical investigations of the reaction mechanism and kinetics between NADH and redox-active (NC)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>-NHOH/(NC)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>-NO from 4-nitrophthalonitrile-(NC)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>-NO<sub>2</sub>-modified electrode. *Biosensor and Bioelectronics*, 24, 2008, 448-454.

II.1.4. LIMA, P. R.; SANTOS, W. J. R.; GOULART, M. O. F.; TANAKA, A. A.; TANAKA, S. C. N.; KUBOTA, L. T. Alternating Layers of Iron(III) Tetra(N-methyl-4-pyridyl)-porphyrin and copper tetrasulfonated phthalocyanine for amperometric detection of 4-nitrophenol in nanomolar levels. *Electroanalysis*, 20, 2008, 2333-2339.

II.1.5. REYS, J. R. M.; LIMA, P. R.; CIOLETTI, A. G.; RIBEIRO, A. S.; ABREU, F. C.; GOULART, M. O. F., KUBOTA, L. T., An amperometric sensor based on hemin adsorbed on silica gel modified with titanium oxide for electrocatalytic reduction and quantification of artemisinin. *Talanta*, 77, 2008, 909-914.

II.1.6. SANTOS, W. J. R.; LIMA, P. R.; TARLEY, C. R. T.; KUBOTA, L. T. A catalytically active molecularly imprinted polymer that mimics peroxidase based on hemin: application to the determination of *p*-aminophenol. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 389, 2007, 1919-1929.

II.1.7. SANTOS, W. J. R.; LIMA, P. R.; TANAKA, A. A.; TANAKA, S. C. N.; KUBOTA, L. T. Determination of nitrite in food samples by anodic voltammetry using a modified electrode. *Food Chemistry*, 113, 2009, 1206-1211.

II.1.8. SANTOS, W. J. R.; LIMA, P. R.; TARLEY, C. R. T.; HÖEHR, N. F.; KUBOTA, L. T. Synthesis and application of a peroxidase-like molecularly

imprinted polymer based on hemin for selective determination of serotonin in blood serum. *Analytica Chimica Acta*, 631, 2009, 170-176.

II.1.9. SANTOS, W. J. R.; LIMA, P. R.; TARLEY, C. R. T.; KUBOTA, L. T. Synthesis, characterization and kinetics of catalytically active molecularly imprinted polymers for the selective recognition of 4-aminophenol. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20, 2009, 820-825.

II.1.10. SANTHIAGO, M., LIMA, P. R., SANTOS, W. J. R., KUBOTA, L.T. In situ activated 3,5-dinitrobenzoic acid covalent attached on nanostructured platform for NADH electrooxidation. *Electrochimica Acta*, 2009, *in press* (aceito).

II.1.11. LIMA, P. R., MIRANDA, P. R. B., OLIVEIRA, A. B., GOULART, M. O. F., Kubota, L.T. Modified carbon paste electrode for kinetic investigation and simultaneous determination of ascorbic and uric acids. *Electroanalysis*, 2009 (aceito).

#### **Artigo Submetido Durante o Doutorado**

II.1.12. SANTOS, W. J. R., LIMA, P. R., Tarley, C.R.T, Kubota, L.T. MIP-based nanoreactor biomimetic to peroxidase: Synthesis, characterization and kinetic Studies. *Journal of Molecular Catalysis. A, Chemical.*, 2009.

#### **Patente**

LIMA, P. R., REYS, J.R.M., ABREU, F.C., GOULART, M. O. F., KUBOTA, L.T. DISPOSITIVO SENSOR, PROCESSO DE PREPARAÇÃO DO DISPOSITIVO, MÉTODO PARA DETECÇÃO DE ARTEMISININA EM AMOSTRAS MULTICOMPONENTES, E USO (PI0900203-0), 2009.

#### **II. 2. Participação em Eventos Técnico-Científicos durante o doutorado**

II. 2. 1. LIMA, P. R., SANTOS, W. J. R., SANTHIAGO, M., OLIVEIRA, A. B., ERNSTHAUSER, D., GOULART, M. O. F. E KUBOTA, L. T. Configuração de uma plataforma a base de nanotubos de carbono com TCNP para oxidação eletrocatalítica de NADH. XVII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – XVII SIBEE. Fortaleza, Ceará, Brasil,2009.

II. 2. 2. SANTHIAGO, M., LIMA, P. R., SANTOS, W. J. R. KUBOTA, L. T. Detecção eletrocatalítica de *L*-cisteína empregando sistema multicomponente nanoestruturado a base de MWCNT/PEI/NPAu. XVII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – XVII SIBEE. Fortaleza, Ceará, Brasil, 2009.

II. 2. 3. SANTHIAGO, M., LIMA, P. R., SANTOS, W. J. R. E KUBOTA, L. T. Desenvolvimento de uma interface nanoestruturada para detecção eletrocatalítica de NADH. XVII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – XVII SIBEE. Fortaleza, Ceará, Brasil, 2009.

II. 2. 4. SANTOS, W. J. R., LIMA, P. R., TARLEY, C. R. T., KUBOTA, L. T. Estudo cinético de polímeros biomiméticos a peroxidase com impressão molecular de substratos fenólicos. XVII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, Fortaleza, Ceará, Brasil, 2009.

II. 2. 5. SANTOS, V. S., SANTOS, W. J. R., LIMA, P. R., KUBOTA, L. T., TARLEY, C. R. T. Emprego de eletrodo de pasta de nanotubo de carbono para determinação de antimônio (III) por redissolução potenciométrica. XVII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – XVII SIBEE. Fortaleza, Ceará, Brasil, 2009.

II. 2. 6. LIMA, P. R., REYS, J. R. M., CIOLETTIA, A. G., RIBEIRO, A. S., GOULART, M. O. F. E KUBOTA, L. T. Sensor amperométrico a base de hemina imobilizada em sílica gel modificada com óxido de titânio para determinação eletrocatalítica de artemisinina. XVII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – XVII SIBEE. Fortaleza, Ceará, Brasil, 2009.

II. 2. 7. OLIVEIRA, C. N., LIMA, P. R., SANTHIAGO, M., KUBOTA, L.T. Determinação dos parâmetros cinéticos do sistema 1,2-NQ/MWCNT imobilizada sobre ouro para oxidação eletrocatalítica de NADH. XVII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – XVII SIBEE. Fortaleza, Ceará, Brasil, 2009.

II. 2. 8. GOULART, M. O. F., SILVA, F., LOPES, C., LIMA, P. R. E KUBOTA, L.T. Xanthurenic Acid: a New Mediator for the Electroanalysis of NADH. 60<sup>th</sup> Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry - 60<sup>th</sup> ISE. Beijing, China, 2009.

II. 2. 9. TANAKA, A. A., SANTOS, W. J. R., LIMA, P. R., TANAKA, S. M. C. N. E KUBOTA, L. T. Amperometric determination of 4-aminophenol with a catalytically Active Molecularly Imprinted Polymer. 60<sup>th</sup> Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry - 60<sup>th</sup> ISE. Beijing, China, 2009.

II. 2. 10. LIMA, P. R., SANTOS, W. J. R., LUZ, R. C. S., DAMOS, F. S., OLIVEIRA, A. B., GOULART, M. O. F. E KUBOTA, L. T. Sensor amperométrico a base de camadas alternadas de FeT<sub>4</sub>MPyP e CuTSPc para determinação de 4-nitrofenol em níveis nanomolar. XVI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – XVI SIBEE. Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil, 2007.

II. 2. 11. LIMA, P. R., SANTOS, W. J. R., LUZ, R. C. S., DAMOS, F. S., OLIVEIRA, A. B., GOULART, M. O. F. E KUBOTA, L. T. Sensor amperométrico a base de pasta de carbono modificada com 4-nitroftalonnitrila para quantificação de cisteína (CySH). XVI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – XVI SIBEE. Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil, 2007.

II. 2. 12. LIMA, P. R., SANTOS, W. J. R., LUZ, R. C. S., DAMOS, F. S., OLIVEIRA, A. B., GOULART, M. O. F., KUBOTA, L. T. Determinação amperométrica de L-glutationa (GSH) com eletrodo de pasta de carbono modificada com 4-nitroftalonnitrila. XVI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – XVI SIBEE. Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil, 2007.

II. 2. 13. DUARTE, J. C., LUZ, R. C. S., DAMOS, F. S., SANTOS, W. J. R., LIMA, P. R., TANAKA, A. A., KUBOTA, L. T. Sensor amperométrico altamente sensível para O<sub>2</sub> empregando os complexos FeTSPc/FeT<sub>4</sub>MPyP imobilizados por LBL. XVI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – XVI SIBEE. Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil, 2007.

II. 2. 14. DAMOS, F. S., LUZ, R. C. S., LIMA, P. R., SANTOS, W. J. R., KUBOTA, L. T. Comportamento eletroquímico e supramolecular entre SAM de mono-(6-deoxi-6-mercaptop)-β-ciclodextrina e antidepressivos tricíclicos. XVI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – XVI SIBEE. Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil, 2007.

II. 2. 15. SANTOS, W. J. R., LIMA, P. R., LUZ, R. C. S., DAMOS, F. S., TANAKA, A. A., TANAKA, S. M. C. N., KUBOTA, L. T. Desenvolvimento

de um sensor amperométrico para determinação de  $\text{NO}_2^-$  usando eletrodo de carbono vítreo modificado com camadas alternadas de  $\text{FeT}_4\text{MPyP}$  e  $\text{CuTSPc}$ . XVI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – XVI SIBEE. Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil, 2007.

II. 2. 16. SANTOS, W. J. R., LIMA, P. R., TARLEY, C. R. T., KUBOTA, L. T. Um polímero com impressão molecular (MIP) a base de ferriprotoporfirina para mimetizar a peroxidase. XVI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – XVI SIBEE. Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil, 2007.

II. 2. 17. LIMA, P. R., SILVA, A. R., SOLETTI, J. I., CARVALHO, S. H. V. Tratamento de efluente sintético da indústria de processamento do coco utilizando a técnica de eletroflotação. XXXII Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados - XXXII ENEMP. Maringá – Paraná, Brasil, 2008.

II. 2. 18. LIMA, P. R., SANTOS, W. J. R., OLIVEIRA, A. B., GOULART, M. O. F., KUBOTA, L. T. Determinação de L-Glutationa (GSH) em extratos de levedura com sensor amperométrico a base de 4-nitroftalonitrila. 31<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - 31<sup>a</sup> SBQ. Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil, 2008.

II. 2. 19. SANTOS, W. J. R., LIMA, P. R., TARLEY, C. R. T., KUBOTA, L. T. Síntese, caracterização e cinética de um polímero com impressão molecular a base de hemina para o reconhecimento seletivo do 4-APh. 31<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - 31<sup>a</sup> SBQ. Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil, 2008.

II. 2. 20. SANTOS, W. J. R., LIMA, P. R., TARLEY, C. R. T., KUBOTA, L. T. Desenvolvimento de um MIP-hemina cataliticamente ativo capaz de mimetizar o sítio ativo da HRP para o reconhecimento da serotonina. 31<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - 31<sup>a</sup> SBQ. Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil, 2008.

II. 2. 21. SANTOS, W. J. R., LIMA, P. R., TANAKA, A. A.; TANAKA, S. M. C. N., KUBOTA, L. T. Detecção de nitrito em amostra de alimento com eletrodo de carbono vítreo modificado com camadas alternadas de  $\text{FeT}_4\text{MPyP}/\text{CuTsPc}$ . 31<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - 31<sup>a</sup> SBQ. Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil, 2008.

II. 2. 22. BETA, B. E. L., SANTOS, V. S., SANTOS, W. J. R., LIMA, P. R., TARLEY, C. R. T. E KUBOTA, L. T. Emprego de eletrodo de pasta de nanotubo de carbono (NTC) para determinação simultânea de Zn(II), Cd(II) e Pb(II) por potenciometria de redissolução. 31<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - 31<sup>a</sup> SBQ. Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil, 2008.

II. 2. 23. LIMA, P. R., MIRANDA, P. R. B., GOULART, M. O. F., KUBOTA, L. T. E OLIVEIRA, A. B. Eletrodo de pasta de carbono dopada com 4-nitroftalonitrila para oxidação eletrocatalítica de ácido ascórbico. 31<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - 31<sup>a</sup> SBQ. Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil, 2008.

II. 2. 24. OLIVEIRA, C. N., LIMA, P. R., DAMOS, F. S., KUBOTA, L. T. Atividade Eletrocatalítica de nanotubos de carbono modificados com 1,2-naftoquinona para oxidação eletroquímica da  $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleotídeo. 31<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - 31<sup>a</sup> SBQ. Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil, 2008.

II. 2. 25. LIMA, P. R., GASPARETO, D. O., KUBOTA, L. T. Electrocatalytic activity of DDQ immobilized on multi-wall carbon-nanotube for NADH oxidation. VII Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais – VII SBPMat. Guarujá, São Paulo, Brasil, 2008.

II. 2. 26. SANTHIAGO, M., LIMA, P. R., KUBOTA, L. T. CNTs Modified with polyethylenimine and gold nanoparticle with DTNB-SAM to NADH electrooxidation. VII Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais – VII SBPMat. Guarujá, São Paulo, Brasil, 2008.

II. 2. 27. LIMA, P. R., REYS, J. R. M., CIOLETTIA, A. G., KUBOTA, L. T., GOULART, M. O. F. Antimalarial Activity by Hemin Interaction: Attempts to Correlate Electrochemical Techniques and Spectrophometric Analysis. The 4rd Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry – BrazMedChem. Porto de Galinhas, Pernambuco, Brasil, 2008.

II. 2. 28. OLIVEIRA, C. N., LIMA, P. R., KUBOTA, L. T. Desenvolvimento de um sensor amperométrico para NADH a base de nanotubos de carbono. XVI Congresso Interno de Iniciação Científica. Campinas, São Paulo, Brasil.

II. 2. 29. SANTOS, V. S., NACANO, L. R., SANTOS, W. J. R., LIMA, P. R., KUBOTA, L. T., TARLEY, C. R. T. Especificação de Sb (III) e Sb (V) por redissolução potenciométrica em medicamento empregando eletrodo de pasta de nanotubo de carbono. 1 Encontro Brasileiro sobre Especificação Química – 1 EspeQBrail. São Pedro, São Paulo, Brasil, 2008.

II. 2. 30. LIMA, P. R., MIRANDA, P. R. B., OLIVEIRA, A. B., GOULART, M. O. F. E KUBOTA, L. T., Eletrodo modificado com 4-nitroftalonitrila para detecção eletrocatalítica de ácido ascórbico na presença de ácido úrico. 14º Encontro Nacional de Química Analítica - 14º ENQA. João Pessoa, Paraíba, Brasil, 2008.

II. 2. 31. SANTOS, W. J. R., LIMA, P. R., TARLEY, C. R. T. E KUBOTA, L. T., Polímero com impressão molecular (MIP) a base de ferriprotoporfirina para mimetizar a peroxidase: Aplicação na determinação de serotonina. 14º Encontro Nacional de Química Analítica - 14º ENQA. João Pessoa, Paraíba, Brasil, 2008.

II. 2. 32. LIMA, P. R., SANTOS, W. J. R., GOULART, M. O. F., KUBOTA, L. T., Catalytic investigations of the reaction mechanism and kinetics between NADH and Ar-NO/Ar-NHOH redox-active couple from 4-nitrophthalonitrile-modified electrode. VI Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais – VI SBPMat. Natal, Rio Grande do Norte, 2008.

II. 2. 33. SANTOS, W. J. R., LIMA, P. R., SANTOS, TARLEY, C. R. T., KUBOTA, L. T., Molecularly imprinted polymer catalytically active based on hemin to mimic peroxidase: application for the p-aminophenol determination. VI Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais – VI SBPMat. Natal, Rio Grande do Norte, 2008.

### **II. 3. Prêmios resultantes de Atividade Científica.**

II. 3. 1. PRÊMIO FINEP de INOVAÇÃO TECNOLÓGICA - CATEGORIA PROCESSOS - UFAL/Trikem - 2 lugar NE, FINEP.

II. 3. 2. Comunicação Premiada apresentada no 1 Encontro Brasileiro sobre Especificação Química - EspeQ-Brasil-2008. Título da comunicação: Especificação de Sb (III) e Sb (V) por redissolução potenciométrica em medicamento empregando eletrodo de pasta de nanotubo de carbono.

II. 3. 3. Comunicação Premiada apresentada no VII Semana de Química-2008.  
Título da comunicação: Atividade eletrocatalítica de nanotubos de carbono modificados com 1,2-NQ para oxidação eletrocatalítica de NADH.

**RESUMO**

**Título:** “Eletrodo modificado à base de 4-nitroftalonitrila: sensor amperométrico para quantificação de alguns antioxidantes de relevância biológica”.

**Autor:** Phabyanno Rodrigues Lima

**Orientador:** Lauro Tatsuo Kubota

**Co-orientadora:** Marília Oliveira Fonseca Goulart

**Palavras-chave:** Sensor amperométrico, 4-nitroftalonitrila, antioxidante, eletrodos quimicamente modificados.

Neste trabalho descreve-se o desenvolvimento de sensores amperométricos à base de um simples eletrodo de pasta de carbono modificado com um novo mediador redox, a 4-nitroftalonitrila (4-NO<sub>2</sub>FN), para a determinação de alguns antioxidantes de relevância biológica [*L*-cisteína (*L*-CySH), *L*-glutathiona (*L*-GSH), ácido *L*-ascórbico (*L*-AscH<sub>2</sub>), ácido úrico (AU) e nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida) (NADH)]. Com este propósito, inicialmente, a 4-NO<sub>2</sub>FN foi ativada *in situ*, gerando o par redox nitroso/hidroxilamina (4-NOFN/4-NHOHFN) estável na superfície eletródica, o qual apresentou atividade electrocatalítica na oxidação dos analitos estudados. As técnicas empregadas para a realização deste trabalho foram voltametria cíclica e cronoamperometria, as quais foram utilizadas para estudar o comportamento dos eletrodos modificados, para otimização dos parâmetros experimentais, obtenção dos parâmetros cinéticos e caracterização analítica dos sensores. Além disso, os estudos hidrodinâmicos e cronoamperométricos foram realizados com o objetivo de se obter maiores informações sobre os processos de oxidação entre *L*-AscH<sub>2</sub>, NADH e os eletrodos modificados. Assim, por meio dos gráficos e equações de Koutech-Levich e Cottrell foi possível obter os valores para o coeficiente de difusão (*D*) e constante de velocidade da reação (*k*<sub>obs</sub>) para *L*-AscH<sub>2</sub> e NADH. Os valores do *D* e de *k*<sub>obs</sub>, determinados para *L*-AscH<sub>2</sub> e NADH, foram de 9,0x10<sup>-6</sup> cm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> e 2,4x10<sup>-6</sup> cm<sup>2</sup>s<sup>-1</sup>, 6,0x10<sup>6</sup> mol<sup>-1</sup>L s<sup>-1</sup> e 1,0x10<sup>4</sup> mol<sup>-1</sup>L s<sup>-1</sup>, respectivamente. O aumento na velocidade de reação, tanto para o *L*-AscH<sub>2</sub> quanto para o NADH, foi atribuído à eficiente transferência de elétrons entre estas espécies e o par redox 4-NOFN/4-NHOHFN eletrogerado *in situ*. Sob condições otimizadas, o sensor amperométrico apresentou uma faixa de resposta linear (μmol L<sup>-1</sup>), limite de detecção (μmol L<sup>-1</sup>), quantificação (μmol L<sup>-1</sup>) e sensibilidade (nA L μmol<sup>-1</sup>) para *L*-CySH (a), *L*-GSH (b), *L*-AscH<sub>2</sub> (c), AU (d) e NADH (e), os quais apresentaram os valores de (a) 0,8-13,2, 0,25,

0,8, 37,0; (b) 8,0-83,0, 2,7, 8,0, 54,0; (c) 5,0-120,0, 1,6, 5,5, 108,0; (d) 5,0-120,0, 1,3, 4,5, 121,6 e (e) 0,8-8,5, 0,25, 0,82, 500,0, respectivamente. Após a aplicação destes sensores em amostras de interesse, estudos de adição e recuperação dos analitos foram realizados para avaliar a exatidão dos métodos e verificou-se que foi possível uma percentagem de recuperação entre 98,5 e 102,0% para *L*-CySH, *L*-GSH, *L*-AscH<sub>2</sub> e AU.

**ABSTRACT**

**Title:** “Modified electrode based on 4-nitrophthalonitrile: amperometric sensor for quantification of some antioxidants of biological relevance”.

**Author:** Phabyanno Rodrigues Lima

**Adviser:** Lauro Tatsuo Kubota

**Co-adviser:** Marília Oliveira Fonseca Goulart

**Keywords:** Amperometric sensor, 4-nitrophthalonitrile, antioxidant, chemically modified electrodes.

In this work, the development of amperometric sensors based on a simple carbon paste electrode modified with a new redox “mediator”, 4-nitrophthalonitrile (4-NO<sub>2</sub>PH), for quantification of some antioxidants of biological relevance (*L*-cystein (*L*-CySH), *L*-glutathione (*L*-GSH), *L*-ascorbic acid (*L*-AscH<sub>2</sub>), uric acid (UA) and  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)), is described. For this purpose, initially, 4-NO<sub>2</sub>PH was activated *in situ*, generating a stable redox-active nitroso/hydroxylamine system (4-NOPH/4-NHOHPH) on the electrodic surface, which presented electrocatalytic activity towards the oxidation of studied analytes. The techniques used in this work were cyclic voltammetry and chronoamperometry, to study the behavior of the modified electrodes, for the experimental parameters optimization, for the attainment of the kinetic parameters and analytical characterization of the sensors. Hydrodynamic and chronoamperometric studies were carried out with the aim to get information on the reduction processes and oxidation of *L*-AscH<sub>2</sub> and NADH, respectively, on the modified electrodes. Through the Koutech-Levich and Cottrell plots it was possible to obtain the values for the diffusion coefficient (*D*) and kinetic constant of the reaction (*k<sub>obs</sub>*) for the analytes in study. The values of the diffusion coefficient and *k<sub>obs</sub>*, determined for *L*-AscH<sub>2</sub> and NADH were 9.0x10<sup>-6</sup> cm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> and 2.4x10<sup>-6</sup> cm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>, 6.0x10<sup>6</sup> mol<sup>-1</sup>L s<sup>-1</sup> and 1.0x10<sup>4</sup> mol<sup>-1</sup>L s<sup>-1</sup>, respectively. The increase of the reaction rate for *L*-AscH<sub>2</sub> and NADH was attributed to the efficient electron transfer between the studied species and immobilized electroactive species on the surface of the carbon paste electrode. After optimizing conditions, the sensor provided a linear response range (μmol L<sup>-1</sup>), limit of detection (LOD) (μmol L<sup>-1</sup>), limit of quantification (LOQ) (μmol L<sup>-1</sup>) and sensitivity (nA L μmol<sup>-1</sup>) for *L*-CySH (a), *L*-GSH (b), *L*-AscH<sub>2</sub> (c), UA (d) e NADH (e) of (a) 0.8-13.2, 0.25, 0.8, 37.0; (b) 8.0-83.0, 2.7, 8.0, 54.0; (c) 5.0-120.0, 1.6, 5.5, 108.0; (d) 5.0-120.0, 1.3, 4.5, 121.6 and (e) 0.8-8.5, 0.25, 0.82, 500.0, respectively. After the application of these sensors in

samples of interest, studies of addition and recovery of the analytes were carried out to evaluate the error of the methods and it was verified recovery percentages between 98.5 and 102.0% for *L*-CySH, *L*-GSH, *L*-AscH<sub>2</sub> and AU, were obtained.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<i>L</i> -CySH	<i>L</i> -Cisteína (forma reduzida)
<i>v</i>	Viscosidade cinemática
$\alpha$	Coefficiente de transferência de elétrons
$\omega$	Velocidade de rotação
$\Delta E_p$	Separação de potencial de pico
$\Delta E_p$	Diferença de potencial de pico de oxidação
4-NHOHFN	4-hidroxilaminaftalonitrila
4-NO <sub>2</sub> FN	4-nitroftalonitrila
4-NOFN	4-nitrosoftalonitrila
A	Área geométrica do eletrodo
Ag/AgCl	Eletrodo de prata cloreto de prata
AU	Ácido úrico
<i>b</i>	Coefficiente angular
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<i>C</i> <sub>o</sub>	Concentração do analito
<i>D</i>	Coefficiente de difusão
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
DPV	Desvio padrão relativo
DTNB	ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico)
<i>E</i> <sup>0'</sup>	Potencial formal
ECS	Eletrodo de calomelano saturado
ECV	Eletrodo de carbono vítreo
EDR	Eletrodo de Disco Rotatório
<i>E</i> <sub>p</sub>	Potencial de pico
<i>E</i> <sub>p/2</sub>	Potencial de corrente de pico a meia altura
EPC	Eletrodo de pasta de carbono
EQM	Eletrodo quimicamente modificado
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
ETR	Electrochemically Triggered Reaction
<i>F</i>	Constante de Faraday
FIA	Flow injection analysis
HEPES	[N-(2-hidroxietil(piperazina))-N,N'-bis(2-ácido etanosulfônico)]
<i>I</i>	Corrente
<i>I</i> <sub>d(L)</sub>	Corrente limitada pelo transporte de massa

---

$I_{kin}$	Corrente limitada cineticamente
$j$	Densidade de corrente
$K_M$	Constante de Michaelis-Menten
$k_{obs}$	Constante de velocidade da reação
$L\text{-AscH}_2$	Ácido <i>L</i> -ascórbico (forma reduzida)
LD	Limite de detecção
$L\text{-GSH}$	<i>L</i> -Glutationa (forma reduzida)
LQ	Limite de quantificação
$n$	Número total de elétrons
$n_a$	Número de elétrons da etapa determinante
$\text{NAD}^+$	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
$n_e$	Número de elétrons
$n_p$	Número de prótons
PIPES	Piperazina- <i>N,N'</i> -bis-(2-ácido etanossulfônico)
Q	Carga
R	Constante universal dos gases
r	Coefficiente de correlação
SAM	Self Assembled Monolayers
T	Temperatura
TRIS	Tris [(hidroximetil)aminometano]
$\nu$	Velocidade de varredura de potencial
VC	Voltametria cíclica
VOQ	Voltametria de onda quadrada
VPD	Voltametria de pulso diferencial
VPN	Voltametria de pulso normal
$F$	Cobertura aparente de superfície

---

**ÍNDICE**

<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>XXXVI</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>XXXVIII</b>
<b>CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>I. Introdução Geral</b>	<b>3</b>
<b>I. 1. A importância das substâncias químicas selecionadas</b>	<b>4</b>
<b>I. 1.1. A <i>L</i>-cisteína</b>	<b>4</b>
<b>I. 1.2. A <i>L</i>-glutathiona</b>	<b>5</b>
<b>I. 1.3. O ácido úrico</b>	<b>6</b>
<b>I. 1.4. O ácido <i>L</i>-ascórbico</b>	<b>7</b>
<b>I. 1.5. A nicotinamida adenina dinucleotídeo</b>	<b>8</b>
<b>I. 2. Dispositivos utilizados para a determinação de <i>L</i>-CySH, <i>L</i>-GSH, <i>L</i>-AscH<sub>2</sub>, AU e NADH</b>	<b>9</b>
<b>I. 2.1 O emprego dos EQMs para determinação de <i>L</i>-CySH, <i>L</i>-GSH, <i>L</i>-AscH<sub>2</sub>, AU e NADH</b>	<b>11</b>
<b>CAPÍTULO II. OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
<b>II. Objetivos</b>	<b>35</b>
<b>II.1. Geral</b>	<b>35</b>
<b>II.2. Específicos</b>	<b>35</b>
<b>CAPÍTULO III. PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>37</b>
<b>III. Parte Experimental</b>	<b>39</b>
<b>III.1. Reagentes e soluções</b>	<b>39</b>
<b>III.2. Construção do sensor</b>	<b>40</b>
<b>III.3. Medidas eletroquímicas e espectrofotométricas</b>	<b>42</b>
<b>III.4. Otimização dos parâmetros experimentais</b>	<b>43</b>
<b>III.5. Procedimento para o preparo das amostras</b>	<b>44</b>
<b>III.5.1. Determinação amperométrica</b>	<b>44</b>
<b>III.5.2. Determinação espectrofotométrica</b>	<b>45</b>
<b>III.6. Estudo da estabilidade e tempo de vida do sensor</b>	<b>45</b>
<b>III.7. Estudo de repetibilidade da medida e do preparo do sensor</b>	<b>46</b>
<b>CAPÍTULO IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>47</b>

---

<b>IV. Resultados e Discussão</b>	<b>49</b>
<b>IV.1. Sensor Amperométrico à Base de Pasta de Carbono Modificado com 4-NO<sub>2</sub>FN</b>	<b>49</b>
IV.1.1. Características cinéticas do EPC/4-NHOHFN/4-NOFN	49
<b>IV.2. Sensor amperométrico para L-CySH</b>	<b>56</b>
IV.2.1. A oxidação eletrocatalítica da L-CySH pelo EPC/4-NHOHFN/4-NOFN	56
IV.2.2. Influência do pH da solução, natureza e concentração do tampão	65
IV.2.3. Estudos de caracterização analítica do sensor para a L-CySH	70
IV.2.4. Estabilidade da 4-NO <sub>2</sub> FN na pasta de carbono	73
IV.2.5. Aplicação do sensor desenvolvido em amostras e testes de recuperação	74
<b>IV.3. Sensor amperométrico para L-GSH</b>	<b>77</b>
IV.3.1. A oxidação eletrocatalítica de L-GSH pelo EPC/4-NOFN/4-NHOHFN	77
IV.3.2. Influência do pH da solução, natureza e concentração do tampão	83
IV.3.3. Estudos de caracterização analítica do sensor para a L-GSH	86
IV.3.4. Estudos de inteferentes da L-GSH	90
IV.3.5. Estabilidade da resposta do sensor na presença de L-GSH	91
IV.3.6. Aplicação do sensor desenvolvido em amostras e testes de recuperação	92
<b>IV.4. Sensor Amperométrico para L-AscH<sub>2</sub> e AU</b>	<b>95</b>
IV.4.1. A oxidação eletrocatalítica de L-AscH <sub>2</sub> pelo EPC/4-NOFN/4-NHOHFN	95
IV.4.2. Estudos Cronoamperométricos	100
IV.4.3. Estudos com Eletrodo de Disco Rotatório	103
IV.4.4. Comportamento Eletroquímico do L-AscH <sub>2</sub> na presença de AU no EPC/4-NOFN/4-NHOHFN	107
IV.4.5. Efeito da quantidade do mediador, pH, tipo de tampão e concentração de tampão na Resposta do Sensor	110
IV.4.6. Caracterização Analítica	113

---

---

<b>IV.4.7. Estabilidade do EPC/4-NOFN/4-NHOHFN</b>	<b>116</b>
<b>IV.4.8. Aplicação do Sensor em Amostras e Testes de Recuperação</b>	<b>117</b>
<b>IV.5. Sensor Amperométrico para NADH</b>	<b>119</b>
<b>IV.5.1. A oxidação eletrocatalítica de NADH pelo EPC/4-NOFN/4-NHOHFN</b>	<b>119</b>
<b>IV.5.2 – Parâmetros cinéticos para a eletrooxidação de NADH no EPC/4-NOFN/4-NHOHFN</b>	<b>124</b>
<b>IV.5.3 – Detecção amperométrica de NADH</b>	<b>135</b>
<b>IV.5.4 – Estabilidade do 4-nitroftalonnitrila ativado no eletrodo modificado</b>	<b>138</b>
<b>CAPÍTULO V. CONCLUSÕES</b>	<b>139</b>
<b>V. Conclusões Gerais</b>	<b>141</b>
<b>CAPÍTULO VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>145</b>
<b>VI. Referências Bibliográficas</b>	<b>147</b>
<b>CAPÍTULO VII. PERSPECTIVAS</b>	<b>155</b>
<b>VII. Perspectivas</b>	<b>157</b>

## LISTA DE TABELAS

### I. INTRODUÇÃO

<i>Tabela I.1</i>	<i>Sensores, condições experimentais e parâmetros analíticos para a determinação de L-CySH.</i>	<b>14</b>
<i>Tabela I.2</i>	<i>Sensores, condições experimentais e parâmetros analíticos para a determinação de L-GSH.</i>	<b>19</b>
<i>Tabela I.3</i>	<i>Sensores e parâmetros analíticos para determinação simultânea de L-AscH<sub>2</sub> e AU sobre vários eletrodos.</i>	<b>24</b>
<i>Tabela I.4</i>	<i>Comparação do desempenho de alguns eletrodos modificados usados na eletrocatalise de NADH.</i>	<b>30</b>

### IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

<i>Tabela IV.1</i>	<i>Parâmetros eletroquímicos e cinéticos de alguns eletrodos modificados.</i>	<b>56</b>
<i>Tabela IV.2</i>	<i>Determinação de L-CySH em amostras de suplemento alimentar em triplicata..</i>	<b>75</b>
<i>Tabela IV.3</i>	<i>Dados de recuperação de L-CySH em amostras de suplemento alimentar (n=3) obtidos com o sensor desenvolvido.</i>	<b>76</b>
<i>Tabela IV.4</i>	<i>Valores de Recuperação (%) obtidos para L-GSH 50 <math>\mu\text{mol L}^{-1}</math> na presença de 10 <math>\mu\text{mol L}^{-1}</math> dos compostos interferentes.</i>	<b>91</b>
<i>Tabela IV.5</i>	<i>Determinação de L-GSH em amostras de extrato de levedura em triplicata.</i>	<b>93</b>
<i>Tabela IV.6</i>	<i>Dados de recuperação de L-GSH em amostras de extrato de levedura (n=3) obtidos com o sensor desenvolvido.</i>	<b>94</b>
<i>Tabela IV.7</i>	<i>Determinação de L-AscH<sub>2</sub> e AU em amostras de urina.</i>	<b>118</b>

*Tabela IV.8 Parâmetros eletroquímicos e cinéticos de alguns 134  
eletrodos modificados para eletrooxidação de  
NADH.*

## LISTA DE FIGURAS

### I INTRODUÇÃO

<i>Figura I.1</i>	<i>Estrutura química da L-cisteína.</i>	5
<i>Figura I.2</i>	<i>Estrutura química da L-glutationa.</i>	6
<i>Figura I.3</i>	<i>Estrutura química do ácido úrico.</i>	7
<i>Figura I.4</i>	<i>Estrutura química do ácido L-ascórbico.</i>	8
<i>Figura I.5</i>	<i>Estrutura química da NADH.</i>	8

### III PARTE EXPERIMENTAL

<i>Figura III.1</i>	<i>Estrutura química da 4-nitroftalonitrila.</i>	39
<i>Figura III.2</i>	<i>(A)Esquema construção do sensor. (B) Modelo esquemático da célula eletroquímica.</i>	41
<i>Figura III.3</i>	<i>Aparelho de rotação controlado, modelo 101 Industrial da Pine Instrumental Company empregado nos estudos cinéticos.</i>	42
<i>Figura III.4</i>	<i>Fotografia de um potenciostato, modelo PGSTAT-30 da Autolab Eco Chemie.</i>	43

### IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

<i>Figura IV.1</i>	<i>Voltamogramas cíclicos obtidos na primeira varredura para um EPC/4-NO<sub>2</sub>FN e <math>v = 0,02 \text{ V s}^{-1}</math>. <math>E_{inicial} = 1,0 \text{ V}</math> e <math>E_{\lambda} = -0,5 \text{ V}</math>, varredura no sentido catódico. Condições empregadas: solução tampão fosfato <math>0,1 \text{ mol L}^{-1}</math>, pH 7,0.</i>	50
<i>Figura IV.2</i>	<i>Modelo mecanístico para a ativação in situ do eletrodo de pasta de carbono modificado com 4-NO<sub>2</sub>FN.</i>	51
<i>Figura IV.3</i>	<i>(A) Voltamogramas cíclicos para o EPC/4-NOFN/4-NHOHFN em solução tampão fosfato <math>0,1 \text{ mol L}^{-1}</math>, pH 7,0 em velocidades de varredura de (a) 40, (b) 60, (c)</i>	53

- 80, (d) 100, (e) 150, (f) 200, (g) 250, (h) 300 e (h) 400  $mV s^{-1}$ . (B) gráfico de  $I_p$  vs.  $v$ . (C) gráfico de  $E_p$  vs.  $\log v$ .
- Figura IV.4** Voltamogramas cíclicos para o EPC/4-NHOHFN/4-NOFN, na presença (a) e ausência (b) de  $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$  de L-CySH; EPC não modificada na presença (c) e ausência (d) de  $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$  de L-CySH. Condições empregadas: solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 e  $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$ . 58
- Figura IV.5** Modelos esquemáticos do processo de oxidação eletrocatalítico entre o EPC/4-NOFN/4-NHOHFN e a L-CySH (a,b). 59
- Figura IV.6** Variação da corrente de pico anódica  $j_{pa}$  vs.  $v^{1/2}$  no EPC/4-NOFN/4-NHOHFN em solução contendo  $0,02 \text{ mmol L}^{-1}$  de L-CySH. Medidas realizadas em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 e  $v: 0,01-0,3 \text{ V s}^{-1}$ . 61
- Figura IV.7** Variação da corrente de pico anódica normalizada  $j_{pa}/v^{1/2}$  vs.  $v^{1/2}$  no EPC/4-NOFN/4-NHOHFN em solução contendo  $0,02 \text{ mmol L}^{-1}$  de L-CySH. Medidas realizadas em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 e  $v: 0,01-0,3 \text{ V s}^{-1}$ . 62
- Figura IV.8** Variação do potencial de pico  $E_{pa}$  vs.  $\log v$  para a L-CySH no eletrodo modificado. Medidas realizadas em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 e  $v: 0,01-0,3 \text{ V s}^{-1}$ . 65
- Figura IV.9** Potencial formal ( $E^{0'}$ ) do EPC/4-NOFN/4-NHOHFN em função do pH e ausência de L-CySH. Cobertura de superfície aparente ( $\Gamma$ ) em função do pH, na ausência de L-CySH. Condições empregadas: solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 e  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . 67
- Figura IV.10** A influência do pH da solução na  $j_p$  (a), potencial de pico (b) e efeito da natureza da solução tampão na  $j_p$  69

- (c) obtida por VC em  $60,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de L-CySH. Condições empregadas: solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 e  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .
- Figura IV.11** (A) Medidas amperométricas para a eletrooxidação de L-CySH no EPC/4-NOFN/4-NHOHFN. Condições empregadas: solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0,  $E_{\text{aplicado}} = 0,330 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  e [L-CySH]: (1)  $0,8 - (10) 13,20 \mu\text{mol L}^{-1}$ . (B) Curva analítica. 72
- Figura IV.12** Voltamogramas cíclicos para o EPC/4-NOFN/4-NHOHFN, na presença (a) e ausência (b) de  $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$  de L-GSH; EPC não modificada na presença (c) e ausência (d) de  $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$  de L-GSH. Condições empregadas: solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH = 7,0 e  $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$ . 78
- Figura IV.13** Mecanismo proposto para a reação entre o eletrodo modificado com a 4-NOFN/4-NHOHFN e L-GSH. 79
- Figura IV.14** (a) Variação da corrente de pico anódica  $I_{pa}$  vs.  $v^{1/2}$  no EPC/4-NOFN/4-NHOHFN em solução contendo  $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$  de L-GSH e (b)  $I_p/v^{1/2}$  vs.  $v$ . Medidas realizadas em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 e  $v$ :  $0,01-0,45 \text{ V s}^{-1}$ . 81
- Figura IV.15** A influência do pH da solução na  $I_p$  (a), potencial de pico (b) e efeito da natureza da solução tampão na  $I_p$  (c) obtida por VC em  $60,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de L-GSH. Condições empregadas: solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 e  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ . 85
- Figura IV.16** (A) Medidas amperométricas para a eletrooxidação de L-GSH no EPC/4-NHOHFN/4-NOFN. Condições empregadas: solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0,  $E_{\text{aplicado}} = 0,4 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  e [L-GSH]: (1)  $8,0 - (10) 83,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ . (B) Curva analítica. 88
- Figura IV.17** Voltamogramas cíclicos para o EPC/4-NOFN/4-NHOHFN, na presença (a) e na ausência (c) de L-AscH<sub>2</sub>  $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ ; Eletrodo de pasta de carbono não modificado na ausência (d) e na presença (b) de  $0,2$  96

- mmol L<sup>-1</sup> de L-AscH<sub>2</sub>. Velocidade de varredura (v): 2,0 mV s<sup>-1</sup>. Estudos realizados em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH 7,0.*
- Figura IV.18** *Mecanismo proposto para a reação entre o eletrodo modificado com a 4-NOFN/4-NHOHFN e L-AscH<sub>2</sub>.* 97
- Figura IV.19** *(A) Voltamogramas cíclicos para o EPC/4-NOFN/4-NHOHFN em várias velocidades de varredura (v): (a) 2, (b)4, (c) 6, (d) 8 e (e) 10 mV s<sup>-1</sup>, (B) gráfico de j<sub>p</sub> vs. v<sup>1/2</sup> e (C) variação de j<sub>p</sub>/v<sup>1/2</sup> vs. v. Todos os estudos foram realizados em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH 7,0.* 99
- Figura IV.20** *(A) Cronoamperogramas obtidos no EPC/4-NOFN/4-NHOHFN em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7 na ausência (a) e presença de 3,0 (b); 5,0 (c); 7,0 (d) e 12,0 (e) μmol L<sup>-1</sup> de L-AscH<sub>2</sub>, E<sub>inicial</sub> = 0,10 e E<sub>final</sub> = 0,05 vs. Ag/AgCl, respectivamente. (B) gráfico de j vs. t<sup>1/2</sup> obtidos a partir dos cronoamperogramas. (C) gráfico do slope da linha reta contra a concentração de L-AscH<sub>2</sub> e (D) dependência de I<sub>cat</sub>/I<sub>L</sub> vs. t<sup>1/2</sup> derivado dos dados dos cronoamperogramas de (a) e (e) no painel principal.* 101
- Figura IV.21** *(A) Curvas de polarização obtidas para oxidação eletrocatalítica de L-AscH<sub>2</sub> no EPC/4-NOFN/4-NHOHFN. Velocidade de rotação: (1) 1,57; (2) 3,14; (3) 5,23; (4) 7,33; (5) 10,47; (6) 31,41; (7) 52,35 e (8)73,29 rad s<sup>-1</sup>. v=2,0 mVs<sup>-1</sup>. (B) Gráfico de Levich para a resposta eletrocatalítica de estado-estacionário para um EDR de EPC/4-NOFN/4-NHOHFN em diferentes [L-AscH<sub>2</sub>]. Estudos realizados em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH 7,0 e Γ = 6,5 x 10<sup>-10</sup> mol cm<sup>-2</sup>.* 104
- Figura IV.22** *Gráficos de Koutecky-Levich dos dados experimentais mostrados na Figura IV.21 B. Estudos realizados em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH 7,0 e Γ = 6,5 x 10<sup>-10</sup> mol cm<sup>-2</sup>.* 107

- Figura IV.23** (A) Voltamogramas cíclicos para um EPC/4-NOFN/4-NHOHFN, na ausência (a) e presença (b) de L-AscH<sub>2</sub> e AU 20 μmol L<sup>-1</sup>. Eletrodo de pasta de carbono não modificada na presença de L-AscH<sub>2</sub> (c), L-AscH<sub>2</sub> e AU (d) de 20 μmol L<sup>-1</sup>, respectivamente, e ausência (e) de L-AscH<sub>2</sub> e/ou L-AscH<sub>2</sub> e AU, em solução tampão fosfato em pH 7.  $v = 2 \text{ mV s}^{-1}$ . (B) Voltamogramas cíclicos para um eletrodo de pasta de carbono modificado com 4-nitroftalonitrila ativada, na presença (a) e ausência (b) de AU 50 μmol L<sup>-1</sup>. 109
- Figura IV.24** Influência da % (m/m) de 4-nitroftalonitrila (a) e pH no  $\Delta E_p$  (b). Medidas realizadas na presença de L-AscH<sub>2</sub> e UA 50 μmol L<sup>-1</sup> em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH 7,0. 112
- Figura IV.25** Medidas amperométricas combinadas com potencial pulsado para determinação simultânea de L-AscH<sub>2</sub> e AU em  $E_1 = 0,150 \text{ V}$  (a) e  $E_2 = 0,400 \text{ V}$  (b) vs. Ag/AgCl, respectivamente, no EPC/4-NOFN/4-NHOHFN obtida em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH 7,0. Inserção: curva analítica. 116
- Figura IV.26** (A) Voltamogramas cíclicos para o EPC/4-NOFN/4-NHOHFN, na ausência (a) e na presença de NADH/mmol L<sup>-1</sup>: (b) 0,1, (c) 0,3; eletrodo de pasta de carbono não modificado na ausência (d) e na presença (e) de 0,3 mmol L<sup>-1</sup> de NADH. Velocidade de varredura ( $v$ ): 2,0 mV s<sup>-1</sup>. Estudos realizados em tampão TRIS 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH 7,0. 120
- Figura IV.27** (A) Voltamogramas cíclicos para o EPC/4-NOFN/4-NHOHFN em várias velocidade de varredura( $v$ ): (a) 2, (b)15, (c) 30, (d) 50 e (e) 70 mV s<sup>-1</sup>, (B) gráfico de  $I_p$  vs.  $v^{1/2}$  e (C) variação de  $I_p/v^{1/2}$  vs.  $v$ . Estudos realizados em solução tampão TRIS 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH 7,0. 122
- Figura IV.28** Modelo mecanístico do processo de oxidação eletrocatalítica da NADH pelo EPC/4-NOFN/4- 123

*NHOHFN.*

- Figura IV.29** (A) Curvas de polarização obtidas em diferentes velocidades de rotação do eletrodo para oxidação eletrocatalítica de NADH no EPC/4-NOFN/4-NHOHFN, na ausência (Aa) e presença de NADH: (Ab) 0,1 mmol L<sup>-1</sup>. Velocidade de rotação: (1) 1,62; (2) 2,29; (3) 3,24; (4) 4,58; (5) 5,59; (6) 6,47 e (7) 7,24 rad s<sup>-1</sup>.  $v = 2,0 \text{ mVs}^{-1}$ . Estudos realizados em tampão TRIS 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH 7,0 e  $\Gamma = 6,5 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ . 125
- Figura IV.30** Gráfico de Levich para a resposta eletrocatalítica de estado-estacionário para um EDR de PC/4-NOFN/4-NHOHFN em diferentes [NADH]. Estudos realizados em tampão TRIS 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH 7,0 e  $\Gamma = 6,5 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ . 128
- Figura IV.31** Gráficos de Koutecky-Levich dos dados experimentais mostrados em (B). Estudos realizados em tampão TRIS 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH 7,0 e  $\Gamma = 6,5 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ . 130
- Figura IV.32** (D(a)) Variação de  $\kappa_{\text{obs}}$  vs. [NADH] obtidos para o eletrodo modificado com o 4-nitroftalonitrila ativado e (D(b)) Variação de  $1/\kappa_{\text{obs}}$  vs. [NADH]. Estudos realizados em tampão TRIS 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH 7,0 e  $\Gamma = 6,5 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ . 133
- Figura IV.33** (A) Medidas amperométricas para a eletrooxidação de NADH no EPC/4-NOFN/4-NHOHFN obtidas em tampão TRIS 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH 7,0 e [NADH]: (1)0,8 - (17)17,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (B) Curva analítica.  $E_{\text{ap}} = 100 \text{ mV}$  vs. Ag/AgCl. 136

# **CAPÍTULO I**

# **INTRODUÇÃO**

## **I. Introdução Geral**

O oxigênio, indispensável à vida dos seres vivos, tem sido foco de inúmeros estudos ao longo de décadas, tanto relacionados aos seus benefícios quanto no que diz respeito às suas ações deletérias. A molécula diatômica de oxigênio possui dois elétrons desemparelhados no orbital molecular, e pode sofrer redução, reagir com outras espécies neutras, gerando novos radicais e diferentes metabólitos, conhecidos pelo nome coletivo de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), as quais podem também reagir com outras espécies. No organismo, as ERO encontram-se envolvidas na produção de energia, regulação do crescimento celular e síntese de substâncias biológicas importantes, entre outras atividades. Por outro lado, quando sua produção é exacerbada, o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio. Assim, o estresse oxidativo, ou desbalanço redox, resulta do desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante, com predomínio dos oxidantes, com danos conseqüentes a moléculas endobióticas (Vasconcelos *et al.*, 2007; Halliwell & Gutteridge, 2007).

Há fortes evidências de que o estresse oxidativo tem importância capital nos processos de envelhecimento, transformação e morte celular, com conseqüências 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 auto-imunes, cardiopatias, câncer, doenças do pulmão, intoxicação por xenobióticos e muitas outras. Por outro lado, é também fato reconhecido que ERO e ERN (Espécies Reativas de Nitrogênio) desempenham papéis fisiológicos importantes como o controle da pressão sangüínea, na sinalização

celular, na apoptose, na fagocitose de agentes patogênicos, na fertilização de ovos e no amadurecimento de frutos. O reconhecimento dessa relação estimulou o desenvolvimento de estudos de marcadores de dano oxidativo e de substâncias antioxidantes em sistemas biológicos (Halliwell & Gutteridge, 2007).

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.

O presente trabalho descreve um dispositivo simples e sensível para detectar e quantificar alguns antioxidantes de relevância biológica. A seguir, descreve-se o campo de atuação de alguns desses antioxidantes, bem como alguns sensores eletroquímicos empregados para sua detecção e quantificação.

## **I. 1. A importância das substâncias químicas selecionadas**

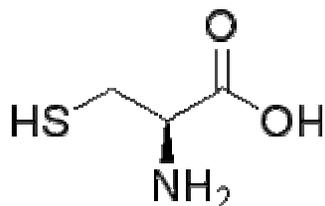
### **I. 1.1. A *L*-cisteína**

A *L*-cisteína (ácido 2-amino-3-mercaptopropanóico, *L*-CySH) (Figura I.1.) é um aminoácido com papel importante nos sistemas biológicos e usada, frequentemente, em vários setores, tais como na medicina e química de alimentos (Chen & Li, 1999; Zhang *et al.*, 1999).

O grupo sulfidríla (-SH) da *L*-CySH é determinante para a atividade biológica das proteínas e enzimas (Nelson & Cox, 2000; Bridavari, 1989; Osipov *et al.*, 2005). A *L*-CySH é considerada um aminoácido não essencial, quando, em condições fisiológicas normais, quantidades suficientes do mesmo são originadas da dieta e do metabolismo do aminoácido essencial metionina e

do aminoácido não essencial serina pela via de trans-sulfuração (Handbook of Amino Acid Analysis, 1988). Entretanto, a *L*-CySH é estabelecida como condicionalmente essencial, em certas circunstâncias, por exemplo, em casos de neonatos prematuros (Shew *et al.*, 2005)

*L*-CySH está presente em vários cosméticos e preparações farmacêuticas, por exemplo, é usada na formulação de alguns antibióticos e tratamento de danos à pele (Wring *et al.*, 1989). As propriedades antioxidantes da *L*-CySH são reconhecidas, quando da regulação de numerosos processos bioquímicos e são essenciais à manutenção da saúde (De Viries & De Flora, 1993) como, por exemplo, na inibição de danos oxidativos causados por ERO, formadas durante estresse oxidativo (Dröge, 2002; Halliwell, 1994; McBride & Kraemer, 1999).



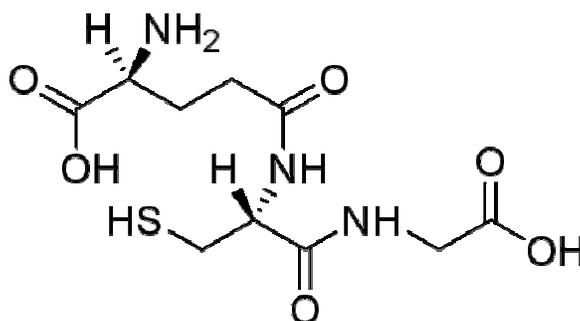
*Figura I.1. Estrutura química da L-cisteína.*

## I. 1.2. A *L*-glutationa

A *L*-glutationa é um tripeptídeo (*L*-glutamil-*L*-cisteinilglicina, *L*-GSH) composto de três aminoácidos: *L*-cisteína, glicina e ácido glutâmico, ligados peptidicamente ( $\gamma$ -*L*-glutamil-*L*-cisteinil-glicina) (Figura I.2). Sua capacidade redutora é determinada pelo grupo -SH presente na *L*-cisteína (Meister & Anderson, 1984). Exerce funções essenciais na célula, destacando-se sua

função como cofator da família de enzimas glutathiona peroxidases (GPx), em que desempenha papel protetor contra o estresse oxidativo, com sua oxidação a dissulfeto (GSSG).

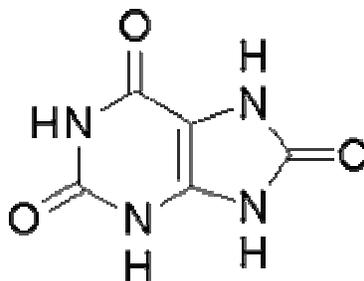
A L-GSH é o único tiol não protéico de baixo peso molecular presente em espécies aeróbias, e seu papel antioxidante intracelular inclui a desintoxicação de xenobióticos e de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Vasconcelos *et al.*, 2007). Representa o principal composto tiólico presente em extratos de leveduras (Penninckx, 2000).



*Figura I.2. Estrutura química da L-glutathiona.*

### I. 1.3. O ácido úrico

O ácido úrico (AU) (Figura I.3.) deriva do metabolismo das purinas e é produzido pela oxidação de hipoxantina e xantina pela xantina oxidase e xantina desidrogenase. O AU apresenta atividade antioxidante significativa e sua concentração no plasma é maior que a de outros antioxidantes, tais como as vitaminas C e E (Ghiselli *et al.*, 2000).

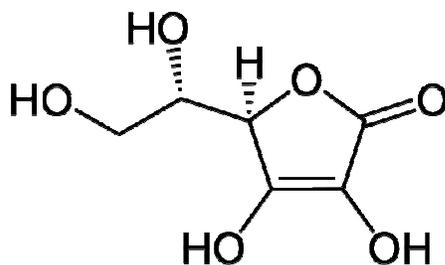


*Figura I.3. Estrutura química do ácido úrico.*

### **I. 1.4. O ácido *L*-ascórbico**

O ácido *L*-ascórbico (*L*-AscH<sub>2</sub>) ou vitamina C (Figura I.4.) é essencial ao homem, pois não pode ser sintetizado a partir da glicose que é seu precursor, como ocorre em plantas e na maioria dos animais. Em sistemas biológicos, em pH fisiológico (7,4), 99,95 % da vitamina C (*L*-AscH<sub>2</sub>) encontra-se na forma de ascorbato (AscH<sup>-</sup>), que é a forma que atua como antioxidante, ao doar um H• ou [H<sup>+</sup> + e<sup>-</sup>] para um radical [Vasconcelos *et al.*, 2007].

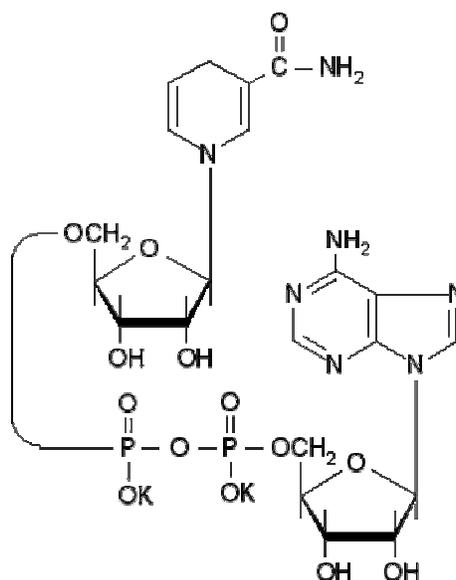
O ascorbato (AscH<sup>-</sup>), atua como antioxidante sobre ERO e ERN, em ambiente biológico aquoso, resultando na formação do ânion radical semidesidroascorbato (Asc•), ou ascorbila, pouco reativo. Atua eficientemente sobre o ânion-radical superóxido (O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>), o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), o hipoclorito (ClO<sup>-</sup>) e os radicais hidroxila (•OH) e peroxila (•OOH). O ascorbato pode atuar diretamente nas membranas celulares, por impedir a iniciação da peroxidação lipídica ou, indiretamente, por regenerar a vitamina E, que atua como antioxidante na face lipofílica da membrana (Barreiros *et al.*, 2006).



*Figura I.4. Estrutura química do L-ácido ascórbico.*

### I. 1.5. A nicotinamida adenina dinucleotídeo

A nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) (Figura I.5.) é um cofator muito estudado devido à grande quantidade de enzimas desidrogenases dependentes de seu processo redox, e devido a sua importância como transportador de elétrons em células vivas. Atualmente, sabe-se que existem mais de 250 enzimas que dependem de NADH e 150 de NADPH (Gorton & Domínguez, 2002).



*Figura I.5. Estrutura química da NADH.*

## **I. 2. Dispositivos utilizados para a determinação de *L*-CySH, *L*-GSH, *L*-AscH<sub>2</sub>, AU e NADH**

Devido às inúmeras razões discutidas anteriormente é de suma importância a determinação destas espécies, portanto, estudos com propósitos distintos têm sido realizados empregando várias técnicas para detecção e quantificação de *L*-CySH, *L*-GSH, *L*-AscH<sub>2</sub> e AU como espectrofluorimetria (Liang *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 1999), cromatografia líquida de alta eficiência (Liang *et al.*, 2005), método colorimétrico (Wyngaarden, 1974) ou métodos eletroquímicos (Shahrokhian & Ghalkhani, 2006), os quais têm sido também utilizados para a determinação da cinética e do mecanismo reacional em relação ao NADH (Santos *et al.*, 2002a,b).

Entretanto, os métodos cromatográficos apresentam alguns inconvenientes com o preparo de amostras, a necessidade de derivatização de moléculas ou baixa sensibilidade, limitando sua aplicação. Alternativamente, os métodos eletroquímicos têm apresentado algumas vantagens no tocante à simplicidade e a alta sensibilidade.

Por outro lado, os maiores problemas relacionados à detecção eletroquímica de tióis ou NADH, por exemplo, têm sido o emprego de eletrodos convencionais (eletrodos não modificados), os quais apresentam altos sobrepotenciais e velocidade de transferência de elétrons lenta.

A detecção eletroquímica e simultânea de *L*-AscH<sub>2</sub> e AU apresenta problemas relacionados aos potenciais de oxidação próximos, bem como pelo bloqueio da superfície eletródica pelos produtos de oxidação, comprometendo

a seletividade e, portanto, inviabilizando o emprego desses sistemas durante o processo de detecção dessas espécies nos diferentes meios.

Alternativamente, uma área que vem contribuindo para o desenvolvimento de métodos inovadores está centrada no campo da eletroanalítica. Particularmente, os sensores químicos têm sido uma alternativa viável para detecção e quantificação de vários analitos em diferentes matrizes, seja de origem biológica, farmacológica, alimentícia, entre outras, com rapidez, seletividade e sensibilidade inerentes a estes dispositivos. Além disso, um dos pontos críticos observados e bastante explorados durante a configuração dos sensores químicos diz respeito à fase sensora, a qual está relacionada diretamente com o processo de detecção da espécie de interesse.

O processo de acoplar o reagente ao transdutor, geralmente denominado de imobilização, tem como objetivo: pré-estabelecer e controlar a natureza físicoquímica da interface eletrodo-solução, sendo, portanto, uma forma de impor e controlar sua reatividade e/ou seletividade, possibilitando o desenvolvimento de sensores químicos para vários propósitos e aplicações, com ótimo desempenho para detecção e quantificação de inúmeros analitos nos diferentes meios.

Assim sendo, o grande interesse no desenvolvimento de sensores é o emprego de mediadores, que são agentes para facilitar a transferência de elétrons. O mediador geralmente é um composto com baixa massa molecular, cujo par redox que catalisa reações facilitando seletivamente a transferência de elétrons de analitos com o eletrodo (Lima *et al.*, 2008a; Lima *et al.*, 2008b; Lima *et al.*, 2008c).

Este mediador geralmente deve possuir um potencial redox mais baixo (menos negativo ou menos positivo, dependendo se o processo é redução ou

oxidação, respectivamente) que os interferentes eletroquimicamente ativos na amostra, apresentando como vantagens, medidas com menor dependência ou completa independência da concentração do oxigênio e de outras substâncias presentes nas amostras (Rosatto *et al.*, 2001). Contemplando este campo, vários estudos vêm sendo conduzidos com intuito de melhorar o desempenho dos eletrodos quimicamente modificados (EQMs) para determinação dos analitos estudados no presente trabalho. Neste sentido, a seguir são descritos alguns destes sistemas enfatizando seus resultados analíticos.

### **I. 2.1 O emprego dos EQMs para determinação de *L*-CySH, *L*-GSH, *L*-AscH<sub>2</sub>, AU e NADH**

A capacidade de manipular a arquitetura molecular do corpo da matriz do eletrodo e sua superfície, em particular tem conduzido a uma ampla extensão de aplicações analíticas dos EQMs e criado poderosas oportunidades para o campo da eletrólise. Por essa razão, muitos pesquisadores têm utilizado vários compostos para modificar superfícies de eletrodos de diferentes maneiras, os quais têm apresentado atividade eletrocatalítica para a oxidação da *L*-CySH, *L*-GSH, NADH, *L*-AscH<sub>2</sub> e AU, permitindo a diminuição dos altos potenciais de oxidação dos mesmos.

Zhang *et al.* (1999) desenvolveram um detector a base de um eletrodo modificado com hexacianoferrato de índio/náfion acoplado à cromatografia de íons para detecção amperométrica de *L*-CySH. Sob condições otimizadas (solução tampão fosfato, pH 3,0), o sistema de detecção apresentou potencial de detecção, faixa linear de resposta, limite de detecção (LD) e sensibilidade

de 0,6 V *vs.* ECS, 1-1000  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , 1,6  $\text{pmol L}^{-1}$  e 3,09 nA L  $\mu\text{mol}^{-1}$ , respectivamente.

Zhao *et al.* (2003) também desenvolveram um sensor amperométrico a base de nanotubos de carbono (NTC) para detecção eletrocatalítica de *L*-CySH. Os autores verificaram que os NTC apresentaram ganho considerável na resposta analítica em relação ao eletrodo convencional, demonstrando efeito eletrocatalítico frente a *L*-CySH. Assim, sob condições otimizadas ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,2 mol  $\text{L}^{-1}$ ) o dispositivo apresentou potencial de detecção, faixa linear de resposta e limite de detecção (LD) de 0,57 V *vs.* ECS, 2-2800  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e 2,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente.

Fei *et al.* (2005), visando o desenvolvimento de novos dispositivos com melhor desempenho, modificaram um eletrodo de grafite com NTC, no qual Platina (Pt) foi depositada eletroquimicamente. Os autores observaram um efeito sinérgico do compósito formado, o qual apresentou propriedade eletrocatalítica frente à oxidação de *L*-CySH. Sob condições otimizadas (solução tampão fosfato, pH 7,4), o dispositivo voltamétrico apresentou potencial de detecção, faixa linear de resposta, LD (sinal/ruído =3) e sensibilidade de 0,46 V *vs.* ECS, 0,5-100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , 0,3  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e 0,8 nA L  $\mu\text{mol}^{-1}$ , respectivamente.

Ozoemena *et al.* (2001), visando um maior controle das propriedades interfaciais ou alto grau de organização, desenvolveram um sensor químico a base de uma monocamada auto-organizada (SAM “*self-assembled monolayer*”) de octabutiltalocianinato-cobalto (II) para detecção eletrocatalítica de *L*-CySH. Sob condições otimizadas (solução tampão, pH

4,0), o sistema de detecção apresentou potencial de detecção e LD de 0,40 V vs. Ag/AgCl e  $0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente.

Com intuito de comparar vários sensores químicos empregados para detecção e quantificação de *L*-CySH, na Tabela I.1. são apresentados os resultados analíticos obtidos nos artigos publicados e citados no presente trabalho.

**Tabela I.1.** Sensores e condições experimentais e parâmetros analíticos para a determinação de L-CySH.

Referência	Sensor	Método	$E_p$ (V)	LD ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Faixa linear ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Sens. ( $\text{nA L}$ $\mu\text{mol}^{-1}$ )
(Zhang <i>et al.</i> ,1999)	Eletrodo modificado com hexacianoferrato de índio/náfion	CLAE com detecção eletroquímica	0,600 <i>vs.</i> ECS	0,016	1-1000	3,09
(Zhao <i>et al.</i> ,2003)	Eletrodo de grafite/NTC	Amperometria	0,570 <i>vs.</i> ECS	2	2-2800	-
(Fei <i>et al.</i> ,2005)	Eletrodo de grafite/NTC/Pt	Voltametria	0,460 <i>vs.</i> ECS	0,3	0,5-100	0,8
(Shahrokhian & Karimia, 2004)	Eletrodo de pasta de carbono modificado com complexo de salofeno-Co(II)	VPD e Amperometria	0,600 <i>vs.</i> Ag/AgCl	0,5	3-770	~22
(Inoue & Kirchhoff, 2000)	Eletrodo de CV modificado PQQ/polipirrol	Amperometria	0,500 <i>vs.</i> Ag/AgCl	0,0006	-	4,71

---

(Shahrokhian & Karimia, 2005)	Eletrodo de pasta de carbono modificado com 4-metilsalofeno-Co(II)	VC, VPD	0,500 vs. Ag/AgCl	0,2	0,5-100	0,036
(Tan <i>et al.</i> , 2003)	Eletrodo de CV/fullereno-C60	VC	0,580 vs. Ag/AgCl	-	200-1200	15,5
(Teixeira <i>et al.</i> , 2005)	Complexo de saleno-Oxovanádio(IV)	Amperometria	0,650 vs. ECS	170	240-2300	4,7
(Salimi & Pourbeyram, 2003)	Carbono modificado com complexo de rutênio	VC	0,800 vs. Ag/AgCl	1	5-685	5
(Ozoemena <i>et al.</i> , 2001)	Eletrodo de ouro modificado octabutylftalocianinato-Co (II)	VC	0,400 vs. Ag/AgCl	0,31	0,1-10	-
(Filanovsky, 1999)	Eletrodo de carbono modificado com ftalocianina-Co	Amperometria	0,400 vs. Ag/AgCl	0,2	1-12	8,89

---

(Spătaru <i>et al.</i> , 2001)	Eletrodo de diamante dopado com boro	Voltametria - FIA	0,570 vs. ECS	0,9	1-200	12
(Lima <i>et al.</i> , 2008a)/ esta tese	Eletrodo de pasta de carbono modificado com 4-nitroftalonitrila	Amperometria	0,33 vs. Ag/AgCl	0,25	0,8-13,2	37

---

*VC: Voltametria Cíclica; CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência; VPD: Voltametria de Pulso Diferencial; VPN: Voltametria de Pulso Normal. Ag/AgCl vs. ECS = -0,045 V.*

Além dos dispositivos desenvolvidos para detecção e quantificação de *L*-CySH e apresentados na Tabela I.1., vários grupos de pesquisas também utilizaram EQMs para determinação de *L*-GSH.

Assim, contemplando esta linha de pesquisa, pode-se encontrar o trabalho reportado por Halbert *et al.*(1985), que prepararam um eletrodo misturando ftalocianina de cobalto tetrassulfonada com grafite em pó e nujol. O eletrodo apresentou resposta eletrocatalítica para muitos tióis na faixa de potencial de 0,75 a 0,85 V *vs.* Ag/AgCl, esta faixa de potencial foi similar àquelas observadas para a oxidação da ftalocianina de cobalto em solução após a adição desta na pasta de grafite. Devido ao alto potencial e à falta de seletividade, o eletrodo foi aplicado como detector eletroquímico acoplado à cromatografia líquida.

Por outro lado, Wring *et al.* (1989) também reportaram um estudo utilizando a ftalocianina de cobalto na construção de eletrodos a base de grafite e resina epóxi, para o monitoramento de *L*-GSH. A determinação de *L*-GSH foi realizada por técnica amperométrica aplicando-se um potencial de 0,45 V *vs.* Ag/AgCl, encontrando uma faixa de trabalho de 0,1-550  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , com um LD de 32,5  $\text{nmol L}^{-1}$ .

Seguindo com o uso da ftalocianina de cobalto, encontramos o trabalho descrito por Griveau *et al.* (2003), os quais usaram tetraaminoftalocianina de cobalto adsorvida na forma do monômero e eletropolimerizada como politetra-aminoftalocianina sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo. A atividade eletrocatalítica na oxidação dos tióis aumenta ligeiramente com a espessura do filme, mas esta atividade foi similar à do eletrodo com o monômero adsorvido. A determinação de *L*-GSH foi realizada por técnica

amperométrica, aplicando-se um potencial de -0,13 V *vs.* ECS, com uma sensibilidade de  $0,12 \mu\text{A mol}^{-1} \text{ L}$  e LD de  $1,6 \text{ mmol L}^{-1}$ .

Outros compostos a base de cobalto foram também estudados. Assim, Shankaran *et al.* (2002) utilizaram o hexacianoferrato de cobalto como mediador e imobilizaram este composto com parafina sobre um eletrodo de grafite. O eletrodo assim construído apresentou resposta eletrocatalítica para *L*-GSH num potencial de 750 mV *vs.* Ag/AgCl, encontrado-se resposta na faixa de 40 a  $520 \mu\text{mol L}^{-1}$ , com um LD de  $2,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

Além dos compostos a base de cobalto reportados na literatura, Calvo-Marzal *et al.* (2006) lançaram mão de um sensor amperométrico, na forma de um eletrodo de pasta de carbono modificado com TTF-TCNQ para detecção e quantificação de *L*-GSH. Este dispositivo apresentou atividade eletrocatalítica frente a *L*-GSH, apresentando um potencial de oxidação de 0,2 *vs.* ECS. Além disso, sob condições otimizadas o sensor apresentou LD, faixa linear de resposta e sensibilidade de  $0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $5,0\text{-}340,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $11,0 \text{ nA L } \mu\text{mol}^{-1}$ , respectivamente. Com intuito de comparar outros sensores químicos empregados para determinação de *L*-GSH, na Tabela I.2. são apresentados os resultados analíticos obtidos nos artigos publicados.

**Tabela I.2.** Sensores e condições experimentais e parâmetros analíticos para a determinação de L-GSH.

<b>Referência</b>	<b>Eletrodo</b>	<b>Método</b>	$E_p$ (V)	<b>LD</b> ( $\mu\text{molL}^{-1}$ )	<b>Faixa linear</b> ( $\mu\text{molL}^{-1}$ )	<b>Sensibilidade</b> ( $\text{nA L}\mu\text{mol}^{-1}$ )
(Marzal <i>et al.</i> , 2006)	EPC/ TTF-TCNQ	Amperometria	0,200 vs. ECS	0,3	5,0-340,0	11,0
(Salimi & Pourbeyram, 2003)	Eletrodo carbono modificado com complexo-Ru	Amperometria	0,800 vs. Ag/AgCl	1,0	5,0-700,0	7,8
(Xu <i>et al.</i> , 2002)	Eletrodo modificado- Pd-IrO <sub>2</sub>	Amperometria -CLAE	0,850 vs. Ag/AgCl	2,0	10,0 – 800,0	-
(Abiman <i>et al.</i> , 2007)	Eletrodo modificado-ArNO <sub>2</sub>	VOQ	-0,100 vs. ECS	8,1	-	51,0
(Moore <i>et al.</i> , 2004)	Eletrodo de grafite pirolítico	VC	0,650 vs. ECS	2,7	10,0 – 80,0	39,0

(Nekrassova <i>et al.</i> , 2003)	Eletrodo de diamante dopado com boro	Amperometria	0,850 vs. ECS	5,8	10,0 – 100,0	22,9
(Nalini & Narayanan, 1998)	Difenilcarbamato-Ru(III)	Amperometria	0,360 vs. ECS	15,2	-	-
(Rover <i>et al.</i> , 2001)	Biosensor a base de glutationa peroxidase	Amperometria	0,650 vs. ECS	-	20,0-140,0	2,45
(Lima <i>et al.</i> , 2008b)/ esta tese	EPC/ 4-nitroftalonitrila	Amperometria	0,400 vs. Ag/AgCl	2,7	8,0 – 83,0	54,0

*VC: Voltametria Cíclica; CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência; VOQ: Voltametria de Onda Quadrada. Ag/AgCl vs. ECS = -0,045 V.*

Estudos têm sido também realizados com foco no desenvolvimento de sensores químicos para detecção e quantificação de *L*-AscH<sub>2</sub> e AU. Neste contexto, vários grupos de pesquisa vêm contribuindo estrategicamente para configuração de novas interfaces que possibilitem melhores desempenhos aos dispositivos.

Assim, Strochkova *et al.*, (1997) reportam a utilização de um EDR para detecção simultânea de *L*-AscH<sub>2</sub> e AU, em urina. Segundo os autores, a análise de AU foi feita em condições de diluição da amostra, para evitar a interferência do *L*-AscH<sub>2</sub> durante o processo de quantificação de AU; nestas condições, o dispositivo apresentou LD para o *L*-AscH<sub>2</sub> de 3,0 μmol L<sup>-1</sup>.

Um conjunto de microeletrodos de ouro modificados pela eletrodeposição de metais nobres como paládio e platina acoplados a um sistema FIA foram explorados e utilizados para determinação amperométrica simultânea de *L*-AscH<sub>2</sub> e AU (Matos *et al.*, 2000). Nesse trabalho, os autores não observaram efeitos de envenenamento e, após a deposição do metal, houve aumento da área superficial dos microeletrodos, justificando os bons limites de detecção dos analitos obtido pelos autores. Matos *et al.*, (2000) quantificaram ainda o teor de *L*-AscH<sub>2</sub> e AU em amostras de urina, utilizando amperometria diferencial, para tanto, foram realizadas medidas em solução de padrão contendo uma alíquota de amostra, medidas em amostras puras e amostras tratadas enzimaticamente com uricase e peroxidase para AU, e com ascorbato oxidase para *L*-AscH<sub>2</sub>. Para determinação dos analitos foi realizado o método de adição de padrão com subtração dos valores de correntes obtidos com a amostra tratada enzimaticamente.

Eletrodos de carbono modificados covalentemente com ácido glutâmico foram eletroquimicamente oxidados (Zhang & Lin, 2001) e aplicados na

oxidação catalítica de AU e *L*-AscH<sub>2</sub>. A modificação efetuada proporcionou diminuição do sobrepotencial de oxidação dos analitos e a separação dos dois picos de oxidação, seja usando VPD ou VC, permitindo a determinação simultânea de *L*-AscH<sub>2</sub> e AU.

Polímeros de *N,N*-dimetilalanina foram eletroquimicamente depositados (Roy *et al.*, 2004) sobre eletrodos de pasta de carbono, formando filmes positivamente carregados devido ao grupo amônio quaternário presente no polímero. Com esta característica catiônica, o filme pré-concentrou *L*-AscH<sub>2</sub> e AU, que em pH 7,0, encontram-se carregados negativamente, facilitando o processo de oxidação observado pelo deslocamento de ambos os potenciais de oxidação para regiões menos positivas de potencial. Concomitantemente, foram observados maiores níveis de corrente, ausência de envenenamento, sendo o efeito mais pronunciado para AU. A determinação deste último foi efetuada com boa reprodutibilidade e sensibilidade. Em sistema FIA, com detecção amperométrica, a presença de *L*-AscH<sub>2</sub> não causou efeitos superficiais indesejáveis, porém foi necessário descontar a corrente de oxidação do *L*-AscH<sub>2</sub> da corrente total lida, pois esta corresponde à corrente de oxidação de ambos os analitos.

A quantificação de *L*-AscH<sub>2</sub> (Gao *et al.*, 1997) em presença de AU também foi realizada usando sistema similar e eletrodo de pasta de carbono modificado com um filme polimérico de 3,4-di-hidroxibenzaldeído. Boa sensibilidade associada à diminuição de sobrepotencial para a oxidação de *L*-AscH<sub>2</sub>, foram igualmente observadas.

Diante do exposto, foi possível discutir alguns trabalhos reportados na literatura, que de alguma maneira, contribuíram para o desenvolvimento de

novas interfaces. A Tabela I.3. lista outros trabalhos, já descritos na literatura, nos quais foram realizadas determinações simultâneas de *L*-AscH<sub>2</sub> e AU.

**Tabela I.3.** Sensores e parâmetros analíticos para determinação simultânea de *L*-AscH<sub>2</sub> e AU sobre vários eletrodos.

Referência	Eletrodo	Método	$\Delta E_{p,a}$ (mV vs. Ag/AgCl)	Analito	LD ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Faixa Linear ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Sens. ( $\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$ )
(Zare <i>et al.</i> , 2005)	EPC/tetrabromo- <i>p</i> -benzoquinona	VPD	~300	<i>L</i> -AscH <sub>2</sub> AU	0,6 --	10,0-600,0 10,0-100,0	0,003 0,002
(Premkumar & Khoo, 2005)	ECV ativado	VVL	~300	<i>L</i> -AscH <sub>2</sub> AU	100,0 0,2	100,0-7000,0 0,2-60,0	-- --
(Hua <i>et al.</i> , 2008)	ECV / nanopartículas de ouro	VPD	~300	<i>L</i> -AscH <sub>2</sub> AU	3,0 --	8,0-550,0 0,6-850,0	0,021 0,769
(O'Connell <i>et al.</i> , 2001)	ECV/polianilina	Amp.- FIA	---	<i>L</i> -AscH <sub>2</sub> AU	2,5 --	5,0-100,0 --	-- --
(Roy <i>et al.</i> , 2004)	ECV/ <i>N,N</i> -dimetilanilina	Amp.	---	<i>L</i> -AscH <sub>2</sub> AU	-- --	25,0-1650,0 --	0,178 --
(Zhang <i>et al.</i> , 2008)	ECV/ácido sulfônico <i>p</i> -aminobenzeno	VPD	~200	<i>L</i> -AscH <sub>2</sub> AU	7,5 12,0	35,0-175,0 22,0-350,0	0,260 0,180
(Argüello <i>et al.</i> , 2008)	EPC/SiO <sub>2</sub> /ZrO <sub>2</sub> /azul de metileno	Amp.	---	<i>L</i> -AscH <sub>2</sub> AU	8,3 3,7	10,0-1600,0 50,0-250,0	0,021 0,120

---

(Lima <i>et al.</i> , 2009)/ esta tese	EPC/4- nitroftalonnitrila	Amp.	~300	<i>L</i> -AscH <sub>2</sub>	1,6	5,0 – 120,0	0,540
				AU	1,3	5,0 – 120,0	0,680

---

VPD: Voltametria de Pulso Diferencial, VVL: Voltametria de Varredura Linear, EPC: Eletrodo de pasta de carbono, ECV: Eletrodo de carbono vítreo.  $\Delta E_{p,a}$ : separação dos potenciais de picos entre o *L*-AscH<sub>2</sub> e AU.

Além dos sensores reportados e discutidos anteriormente, o interesse no desenvolvimento de sensores químicos, particularmente, para detecção de NADH diz respeito a sua importância como cofator de várias enzimas que promovem reações de interesse analítico. Além da sua função de transportador de elétrons em células vivas, o mecanismo envolvendo a eletrooxidação do NADH vem sendo também motivo de inúmeros estudos ao longo das últimas décadas (Gorton, 1986a,b; Lu *et al.*, 2003; Kitani *et al.*, 1981; Chi & Dong, 1996).

Neste sentido, a oxidação do NADH em meio aquoso, sobre a superfície eletródica depende do material do eletrodo utilizado e requer um alto valor de potencial aplicado. Usando a técnica de voltametria cíclica, por exemplo, um único pico de oxidação foi observado em torno de 0,4; 0,7 e 1 V *vs.* ECS, para eletrodos de carbono, platina e ouro, respectivamente (Samec & Elving, 1983; Blaedel & Jenkins, 1975)

Existem duas maneiras de diminuir o sobrepotencial necessário para a eletrooxidação do NADH, uma delas é através do tratamento da superfície do eletrodo e a outra é pela imobilização de mediadores sobre a superfície do eletrodo.

Blaedel & Jenkins (1975) mostraram, portanto, a possibilidade de diminuir o sobrepotencial da eletrooxidação do NADH por meio do pré-tratamento do eletrodo, sendo mais pronunciado quando se utiliza o eletrodo de carbono. Este fato foi atribuído a grupos oxigenados presentes sobre a superfície do eletrodo em uma forma equivalente a quinona, cujo mecanismo foi proposto anos mais tarde por Samec & Elving (1983).

Apesar do potencial aplicado nos eletrodos tratados ser relativamente menor que aqueles aplicados nos eletrodos não tratados, os primeiros

apresentam baixa estabilidade, a qual pode ser resultado do bloqueio e/ou passivação da superfície do eletrodo, devido aos produtos gerados durante a oxidação do NADH.

Por outro lado, foi possível contornar tais problemas efetuando adequadamente os processos de pré-tratamento e condicionamento do eletrodo, os quais apresentaram resultados reprodutíveis (Moiroux & Elving, 1979; Jaegfeldt, 1980; Jaegfeldt *et al.*, 1978), entretanto, este tipo de procedimento não torna o eletrodo seletivo para a oxidação do NADH.

A partir dos estudos reportados por Blaedel & Jenkins (1975), várias quinonas e seus derivados foram imobilizadas em superfícies de eletrodos com o intuito de diminuir o sobrepotencial da oxidação do NADH e melhorar a seletividade do eletrodo.

Neste contexto, o processo de imobilização tem um papel fundamental nas características dos sensores e biossensores. Uma das justificativas diz respeito à orientação e à proximidade das moléculas de mediador à superfície eletródica, podendo favorecer ou não a transferência de elétrons.

Além disso, dependendo da metodologia empregada para a imobilização, esta pode afetar as características da resposta do eletrodo, como por exemplo, constante de ligação do substrato, velocidade máxima da reação, pH ótimo, sensibilidade e estabilidade.

A imobilização deve ser realizada de tal forma que a espécie ativa esteja em contato íntimo com o eletrodo, mantendo sua atividade, proporcionando livre difusão de substratos e produtos na camada biocatalítica.

Do ponto de vista analítico, a vantagem da imobilização da espécie ativa (mediador) é a possibilidade de sua reutilização com diminuição no

custo por análise, maior estabilidade, maior sensibilidade e menor interferência de compostos indesejáveis como reportado anteriormente na literatura científica (Guilbault, 1976).

Problemas como oxidação, substâncias interferentes e envenenamento do eletrodo eram comumente observados em eletrodos contendo enzimas desidrogenases devido à necessidade de aplicação de potenciais elevados. Uma das estratégias usadas para diminuir o potencial aplicado foi a utilização de mediadores redox imobilizados sobre a superfície do eletrodo, já discutida.

Um mediador redox para atuar de forma eficiente deve satisfazer algumas exigências: além de possuir um potencial formal,  $E^0$ , baixo ou compatível ao potencial ótimo na detecção de NADH, o mediador deve exibir elevada velocidade de reação, tanto com o eletrodo quanto com o NADH, e também ser quimicamente estável em qualquer estado de oxidação.

Além disso, a reação do mediador deve envolver, preferencialmente, 2 elétrons e 1 próton, possibilitando uma rápida transferência de elétrons na forma similar de hidreto numa reação homogênea com o NADH (Gorton & Dominguez, 2002).

Estudos com ênfase na oxidação eletrocatalítica de NADH têm atraído considerável atenção em anos recentes. Há um número limitado de mediadores redox (Lobo *et al.*, 1996a,b) como transportadores de elétrons do NADH para o eletrodo, causando, portanto, uma diminuição no sobrepotencial. Estes mediadores incluem catecol (Jaegfeldt *et al.*, 1980), quinonas (Tse & Kuwana, 1978; Yamashita *et al.*, 2003), ferrocenos (Matsue *et al.*, 1987; Ramírez-Molina *et al.*, 2003), fenilendiamina (Ravichandram & Baldwin, 1983; Pereira *et al.*, 2003), fenoxazina (Zaitseva *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2002a,b; Kubota & Gorton, 1999), fenotiazina (Persson, 1990; Kubota

& Gorton, 1999), flavina (Kubota *et al.*, 1998; Kubota & Gorton, 1999) e complexos metálicos (Rivera *et al.*, 1994).

Como pode ser observado, existe na literatura uma ampla variedade de mediadores que, com o desenvolvimento de novos métodos de imobilização, tem possibilitado a construção de novos tipos de configurações de eletrodos modificados para NADH. A Tabela I.4. lista outros trabalhos, já descritos na literatura, nos quais foram realizadas detecção de NADH.

**Tabela I.4.** Comparação do desempenho de alguns eletrodos modificados usados na eletrocatalise de NADH.

Referência	pH	$E_{\text{aplicado}}$ (mV)	Faixa linear ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Sensibilidade ( $\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$ )	LD $\mu\text{mol L}^{-1}$
(Pereira <i>et al.</i> , 2003)	7,0	-50 vs. SCE	40-800	0,02	7,10
(Nassef <i>et al.</i> , 2006)	7,0	+150 vs. Ag/AgCl	1-10	0,01	0,15
(Santos <i>et al.</i> , 2002a,b)	7,0	-200 vs. SCE	10-520	0,05	—
(Vasantha & Chen, 2006)	7,0	+350 vs. Ag/AgCl	10-100	0,05	0,5
(Santos <i>et al.</i> , 2002a,b)	7,0	0 vs. SCE	10-750	0,05	—
(Kumar & Chen, 2007)	6,4	+200 vs. Ag/AgCl	10-300	—	1,0
(Liu <i>et al.</i> , 2005)	7,2	+200 vs. Ag/AgCl	5-1000	—	1,0
(Lima <i>et al.</i> , 2008)/esta tese	7,0	+100 vs. Ag/AgCl	0,8-8,5	0,50	0,25

*Ag/AgCl vs. ECS = -0,045 V.*

Baseado nos aspectos apresentados até o presente momento, esta introdução teve por finalidade e de forma não exaustiva enfatizar a importância dos estudos de vários mediadores em diferentes suportes para detecção e quantificação de *L*-CySH, *L*-GSH, *L*-AscH<sub>2</sub>, AU e NADH buscando mostrar, principalmente, seus desempenhos analíticos.

Além disso, alguns estudos recentes vêm sendo explorados no tocante ao emprego de compostos com grupo nitro com o intuito de desenvolver novas interfaces (Mano & Kuhn, 1999a,b; 2001a,b; Munteanu *et al.*, 2004; Pariente *et al.*, 1995; Abiman *et al.*, 2007; Casero *et al.*, 1999 ). Assim sendo, o grupo nitro em seu estado oxidado, não apresenta atividade catalítica frente a alguns analitos, como por exemplo, tióis (*L*-CySH, *L*-GSH, entre outros) e NADH. Por outro lado, quando o grupo nitro (Ar-NO<sub>2</sub>) é submetido a um processo conhecido como “*electrochemically triggered reaction*” (ETR), ocorre a formação grupo hidroxilamina. Assim, a hidroxilamina resultante pode ser oxidada reversivelmente através de um processo de 2H<sup>+</sup>/2e<sup>-</sup> sobre a superfície eletródica, gerando, portanto, o correspondente grupo nitroso (-NO/-NHOH), o qual tem apresentado atividade frente a tióis e NADH como observado nos trabalhos reportados anteriormente (Mano & Kuhn, 1999a,b; 2001a,b; Munteanu *et al.*, 2004; Pariente *et al.*, 1995; Abiman *et al.*, 2007; Casero *et al.*, 1999).

Por outro lado, alguns desses mediadores discutidos ao longo desta introdução ainda persistem em apresentar uma série de limitações como baixa sensibilidade, reprodutibilidade, instabilidade da fase sensora ou modestas constantes de velocidade, entre outros. Por essa razão, há uma busca contínua por novas interfaces que possibilitem melhores desempenhos, justificando, portanto, o emprego de novos mediadores.

Com intuito de contornar tais problemas, o presente trabalho apresenta como caráter inovador o emprego de um novo mediador redox, a 4-nitroftalonitrila (4-NO<sub>2</sub>FN). Esta molécula foi selecionada para configurar uma fase sensora para oxidação eletroquímica de *L*-CySH, *L*-GSH, *L*-AscH<sub>2</sub>, AU e NADH, com ênfase no desenvolvimento de biossensores.

A razão para estudar a 4-NO<sub>2</sub>FN refere-se à versatilidade do composto polifuncional, que apresenta um grupo nitro, o qual pode ser ativado eletroquimicamente *in situ* pela ETR, por meio de redução irreversível de quatro elétrons de -NO<sub>2</sub> a -NHOH. A hidroxilamina resultante pode ser oxidada reversivelmente ao correspondente composto nitroso, formando, portanto, o par redox NO/NHOH na superfície eletródica, por meio de um processo redox de  $2e^-/2H^+$ .

Além disso, diferentemente dos poucos compostos reportados na literatura com grupo nitro e pensando na necessidade de desenvolver interfaces altamente sensíveis frente aos analitos selecionados, a 4-nitroftanolitrila apresenta estrategicamente, além do grupo nitro, dois grupos ciano. Estes são bons grupos eletroretiradores, configurando, portanto, um caráter mais eletrofílico ao grupo -NO, o qual pode promover um melhor ataque nucleofílico dos analitos, por exemplo, tióis, NADH e *L*-AscH<sub>2</sub>, facilitando, conseqüentemente, aumentando a eficiência catalítica do sistema.

# **CAPÍTULO II**

# **OBJETIVOS**

## **II. Objetivos**

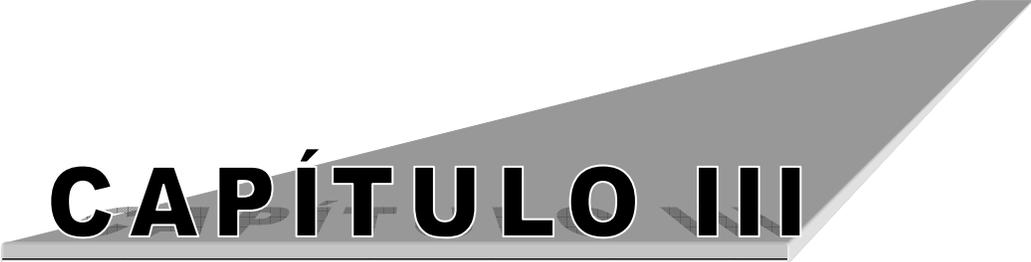
### **II.1. Geral**

Este trabalho visa o desenvolvimento de um sensor amperométrico versátil à base de pasta de carbono modificada com 4-NO<sub>2</sub>FN com alta sensibilidade, ampla faixa de resposta linear e estabilidade para a detecção eletroquímica de alguns antioxidantes de relevância biológica.

### **II.2. Específicos**

- i) Estudar o comportamento do eletrodo modificado com 4-NO<sub>2</sub>FN na ausência e presença individual de *L*-CySH, *L*-GSH, NADH, *L*-AscH<sub>2</sub> e AU;
- ii) Investigar os mecanismos das reações eletroquímicas dos analitos em estudo, usando técnicas eletroquímicas;
- iii) Otimizar os parâmetros experimentais para determinação dos compostos, tais como, pH, tipo de solução tampão e concentração da solução tampão sobre o sinal analítico;
- iv) Construir as curvas analíticas referentes às espécies de interesse;
- v) Aplicar o sensor em amostras reais e realizar estudos de recuperação do analito na amostra;

- v) Realizar estudos de possíveis interferentes, bem como verificar a estabilidade, tempo de vida útil e repetibilidade das medidas e no preparo do sensor;
  
- vi) Comparar os resultados obtidos com outros métodos descritos na literatura, quando possível.



# **CAPÍTULO III**

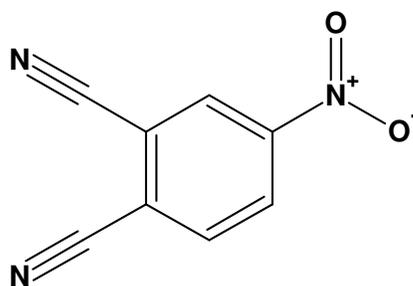


# **PARTE EXPERIMENTAL**

### III. Parte Experimental

#### III.1. Reagentes e soluções

Todas as substâncias empregadas foram de grau analítico. O pó de grafite (99,9%) e o óleo mineral foram adquiridos da Aldrich, Milwaukee-USA. A NADH, *L*-CySH, *L*-GSH, *L*-AscH<sub>2</sub>, AU, ácido cítrico, PIPES [piperazina-*N,N*-bis(2-ácido etanosulfônico)], HEPES [*N*-(2-hidroxietil)piperazina-*N*-[2-ácido etanosulfônico)] e o TRIS [tris(hidroximetil)aminometano] foram adquiridos da Sigma, St. Louis, USA. Diidrogenofosfato de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) e hidrogenofosfato de sódio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) foram adquiridos da Synth, São Paulo, Brasil. A 4-nitroftalonitrila (4-NO<sub>2</sub>FN) (Figura III.1) foi sintetizada pelo método descrito por Young & Onybuago (1990) (pureza ≥ 99%). A síntese da 4-NO<sub>2</sub>FN foi realizada no Instituto de Química Inorgânica da Universidade de Bonn sob responsabilidade do Dr. Adriano Bof de Oliveira.



**Figura III.1.** Estrutura química da 4-nitroftalonitrila.

As amostras tanto de suplementos alimentares quanto de leveduras foram adquiridas no mercado local (Campinas-SP), respectivamente. As soluções foram preparadas usando água purificada em um sistema Milli-Q

Millipore e os valores de pH das soluções tampão foram determinados com um pHmetro da Corning, modelo 350.

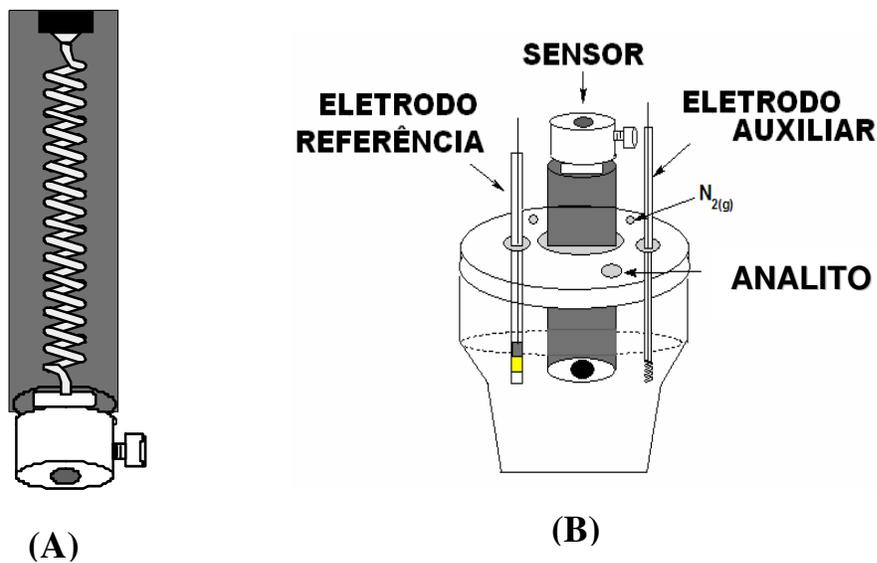
### **III.2. Construção do sensor**

O eletrodo de pasta de carbono modificado (EPC) foi preparado pela mistura de 35 mg de pó de grafite, 5 mg de 4-NO<sub>2</sub>FN e 20 µL de óleo mineral foram adicionados para promover uma melhor consistência à pasta de carbono. Esta pasta foi colocada dentro de uma cavidade na extremidade de um tubo de vidro contendo um fio de platina (área geométrica de 0,2 cm<sup>2</sup>), para o contato elétrico com a pasta, sendo este dispositivo designado como EPC/4-NO<sub>2</sub>FN. A influência da razão entre a 4-nitroftalonitrila e o pó de grafite usado na preparação do eletrodo modificado frente à intensidade da corrente de pico foi investigada nas proporções de 1:13, 1:7, 1:3, 1:1 e 3:1 (m/m).

Para a realização das medidas visando o estudo cinético do processo electrocatalítico da NADH e *L*-AscH<sub>2</sub> envolvendo variação da velocidade de rotação do eletrodo, foi empregado um eletrodo de disco rotatório (EDR).

Este eletrodo foi construído na oficina mecânica do Instituto de Química da UNICAMP, sendo construído a partir de um bastão de Teflon cilíndrico (área geométrica de 0,2 cm<sup>2</sup>) (Figura III.2), contendo uma cavidade na parte inferior com fundo de grafite pirolítico, que por sua vez é ligado internamente à parte superior do tubo por uma mola de metal. Essa parte superior metálica faz contato elétrico e mecânico com o sistema rotatório do aparelho, prendendo-se por um parafuso lateral. Este eletrodo foi acoplado a

um aparelho de rotação controlada, modelo 101 Industrial da Pine Instrumental Company (Figura III.3).



*Figura III.2. (A) Esquema construção do sensor. (B) Modelo esquemático da célula eletroquímica.*



*Figura III.3. Aparelho de rotação controlado, modelo 101 Industrial da Pine Instrumental Company empregado nos estudos cinéticos.*

### **III.3. Medidas eletroquímicas e espectrofotométricas**

As medidas voltamétricas foram realizadas com um potenciostato modelo PGSTAT-30 da Autolab Eco Chemie (Utrecht, The Netherlands) conectado a um PC (Software GPES 4.9) (Figura III.4). Uma célula eletroquímica com três eletrodos foi usada, sendo o eletrodo de referência um Ag/AgCl (KCl saturado), um fio de platina como eletrodo auxiliar e um EPC tanto na ausência quanto na presença de modificação como eletrodo de trabalho e foram usados para todas as medidas.

As medidas foram realizadas usando 5,0 mL de solução tampão. A eliminação de oxigênio dissolvido foi feita pelo borbulhamento de um fluxo de nitrogênio ( $N_{2(g)}$ ) nas soluções durante 10 minutos antes das análises. As medidas espectrofotométricas foram efetuadas em um espectrofotômetro UV/Visível da Pharmacia Biotech, modelo Ultrospec 2000, usando cubetas de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico e 4,5 mL de capacidade total.



*Figura III.4. Fotografia de um potenciostato, modelo PGSTAT-30 da Autolab Eco Chemie.*

### **III.4. Otimização dos parâmetros experimentais**

Inicialmente, variou-se a proporção entre o pó de grafite e o modificador. Em seguida, a proporção que apresentou melhor sinal analítico foi fixada e utilizada nos estudos posteriores. Assim, após alcançar as melhores respostas para a mistura, o efeito do pH da solução tampão foi avaliado entre 6 e 8. A maior densidade de corrente foi escolhida para o estudo da natureza da solução tampão.

Os tampões estudados foram o MacIlvaine, Fosfato, TRIS, PIPES e HEPES. Logo após este estudo, verificou-se qual dessas soluções apresentava melhor resposta e em que concentração do tampão escolhido, avaliando entre 0,025 e 0,2 mol L<sup>-1</sup> para então determinar qual apresentaria melhor resultado.

### **III.5. Procedimento para o preparo das amostras**

#### **III.5.1. Determinação amperométrica**

As amostras de suplemento alimentar [Dietary Supplement *L*-cysteine (500 mg)] foram preparadas, dissolvendo a amostra (uma cápsula de 500 mg) em 1000,00 mL de água e, em seguida a solução foi filtrada através de um papel de filtro quantitativo. Após esta etapa, uma alíquota de 125 µL do filtrado foi diluída para 5,00 mL, com tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH 7. Uma alíquota de 100 µL desta solução foi adicionada à célula eletroquímica contendo 5,00 mL do eletrólito para ser medida.

As amostras de extratos de levedura usadas para determinação de *L*-GSH, foram preparadas dissolvendo a amostra (350 mg) em 5,00 mL de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> e, posteriormente, centrifugada (1000 rpm, 10 min, 25 °C). Após esta etapa, 100 µL do sobrenadante foram adicionados à célula eletroquímica contendo 5,00 mL do eletrólito de suporte para ser efetuada a leitura.

As amostras de tabletes de vitamina C (um tablete de 10 mg) foram dissolvidas em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0). Após etapa de filtração, a solução de *L*-AscH<sub>2</sub> foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e diluído com solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0). Alíquotas de 100 µL da solução da amostra foram adicionadas à célula eletroquímica

(5,00 mL). Para a determinação simultânea de *L*-AscH<sub>2</sub> e AU, as amostras de urina foram diluídas 50 vezes, minimizando, portanto, os prováveis efeitos de matriz.

### **III.5.2. Determinação espectrofotométrica**

Para as medidas espectrofotométricas, as amostras de suplemento alimentar para determinação de *L*-CySH foram diluídas a 1000,00 mL com água deionizada e, então, a solução foi filtrada através de um papel de filtro quantitativo. Outras etapas foram conduzidas de acordo com o procedimento já descrito na literatura (Zaia *et al.*, 1999), sendo que uma alíquota da amostra foi transferida para um tubo teste mais 200 µL de *p*-benzoquinona e o volume ajustado com tampão acetato (pH 3,0).

Para os extratos de levedura, uma alíquota de 50 µL do sobrenadante foi misturada com 2,45 mL de DTNB (ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico). Outras etapas foram realizadas de acordo com o procedimento descrito anteriormente na literatura (Anderson, 1985), que é baseado na reação de *L*-GSH e DTNB (Reagente de Ellman), formando o ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico, sendo este monitorado espectrofotometricamente em 412 nm.

### **III.6. Estudo da estabilidade e tempo de vida do sensor**

Para avaliar a estabilidade do sensor, várias medidas consecutivas foram realizadas com o mesmo eletrodo modificado e as respostas foram comparadas ao longo das medidas. Os valores de resposta obtidos inicialmente foram considerados como 100%. Já para o tempo de vida do eletrodo foram

realizadas medidas com o eletrodo modificado por vários meses. Durante o período de avaliação do tempo de vida do sensor, o mesmo foi armazenado em temperatura ambiente.

### **III.7. Estudo de repetibilidade da medida e do preparo do sensor**

A repetibilidade das medidas obtidas com o sensor foi verificada por meio de 10 medidas voltamétricas e/ou amperométricas sucessivas de *L*-CySH, *L*-GSH, *L*-AscH<sub>2</sub>, AU e NADH realizadas com um mesmo eletrodo modificado nas condições experimentais otimizadas. Logo após, foi calculado o desvio padrão relativo (DPR) para as densidades de correntes obtidas, enquanto que o preparo do sensor foi investigado através da construção de 10 sensores em dias diferentes e, em seguida, o DPR foi calculado para as medidas obtidas com os sensores.

# **CAPÍTULO IV**

# **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

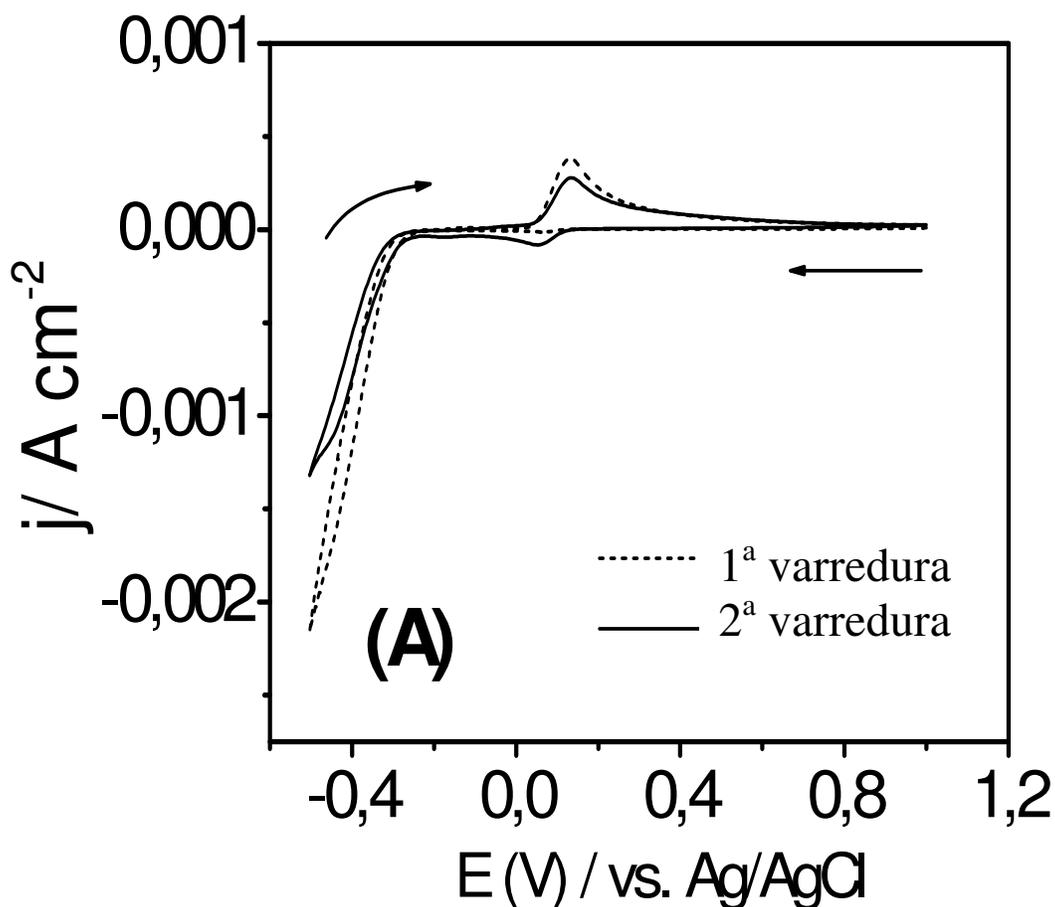
## IV. Resultados e Discussão

### IV.1. Sensor Amperométrico à Base de Pasta de Carbono Modificada com 4-NO<sub>2</sub>FN

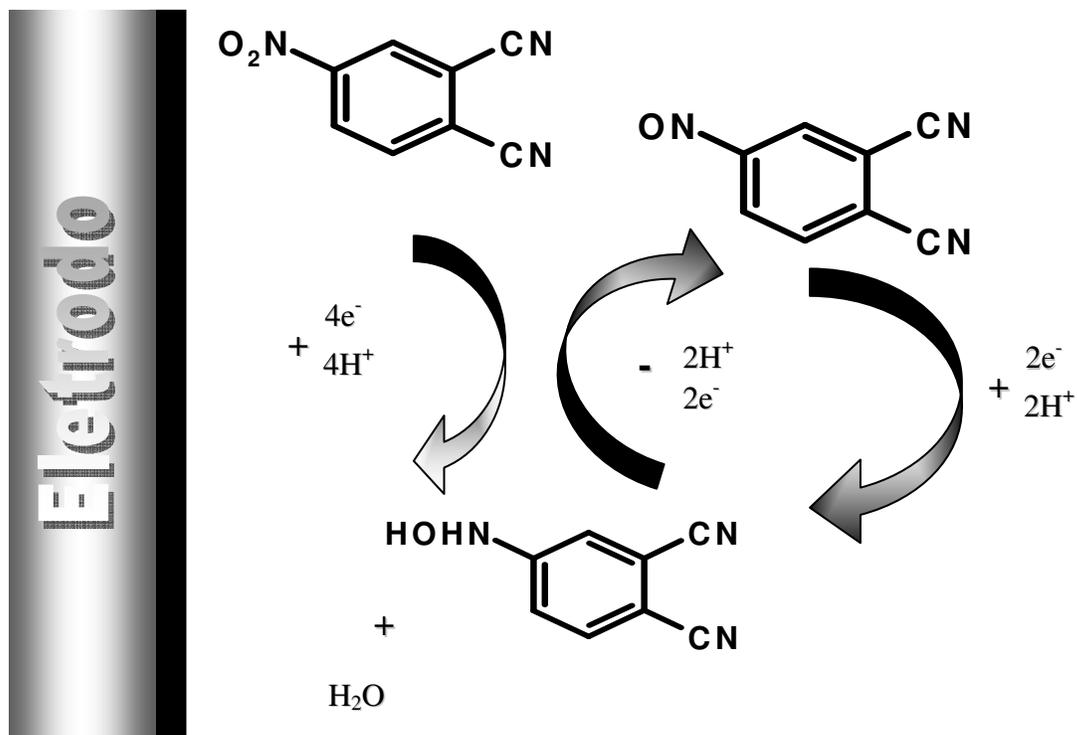
#### IV.1.1. Características cinéticas do EPC/4-NHOHFN/4-NOFN

Inicialmente, vários ensaios foram realizados com o intuito de estudar as propriedades eletroquímicas do EPC/4-NO<sub>2</sub>FN. Assim, a espécie eletroativa, a hidroxilamina ftalonitrila (4-NHOHFN), foi eletrogerada *in situ*, diretamente na superfície do eletrodo modificado, a partir da redução do grupo Ar-NO<sub>2</sub> da 4-nitroftalonitrila (Figura IV. 1), após varredura na faixa de potencial de 1,0 V a -0,5 V *vs.* Ag/AgCl, em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0) e velocidade de varredura de potencial ( $\nu$ ) de 0,02 V s<sup>-1</sup>.

A eletrorredução irreversível do grupo nitro via quatro elétrons e quatro prótons do mediador confinado na superfície, em meio neutro, leva à formação da 4-NHOHFN, que pode ser oxidada reversivelmente ao nitrosoftalonitrila (4-NOFN) correspondente, como observado na Figura IV.2. Este tipo de reação de ativação foi descrito anteriormente para os derivados da nitroflurenona (Mano e Kuhn, 2001a; Munteanu *et al.*, 2004; Mano e Kuhn, 2001b) e para o ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico), na formação de monocamadas auto-organizadas (“SAM- *self assembled monolayers*”) (Casero *et al.*, 1999).



*Figura IV. 1. Voltamogramas cíclicos obtidos na primeira e segunda varreduras para um EPC/4-NO<sub>2</sub>F,  $\nu = 0,02 \text{ V s}^{-1}$ .  $E_{\text{inicial}} = 1,0 \text{ V}$  e  $E_{\lambda} = -0,5 \text{ V}$ , varredura no sentido catódico. Condições empregadas: solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0.*



**Figura IV. 2.** Modelo mecânico proposto para a ativação in situ do eletrodo de pasta de carbono modificado com 4-NO<sub>2</sub>FN.

Após o processo de ativação, uma faixa de potencial foi selecionada usando a mesmas condições do processo de ativação e assim, as características cinéticas do EPC/4-NOFN/4-NHOHFN foram estudadas a partir do uso da voltametria cíclica. Os valores de “cobertura aparente de superfície” ( $\Gamma$ ) do EPC/4-NOFN/4-NHOHFN, dado em mol cm<sup>-2</sup>, foram obtidos integrando a carga ( $Q$ ) do pico anódico (Bard e Faulkner, 2001):

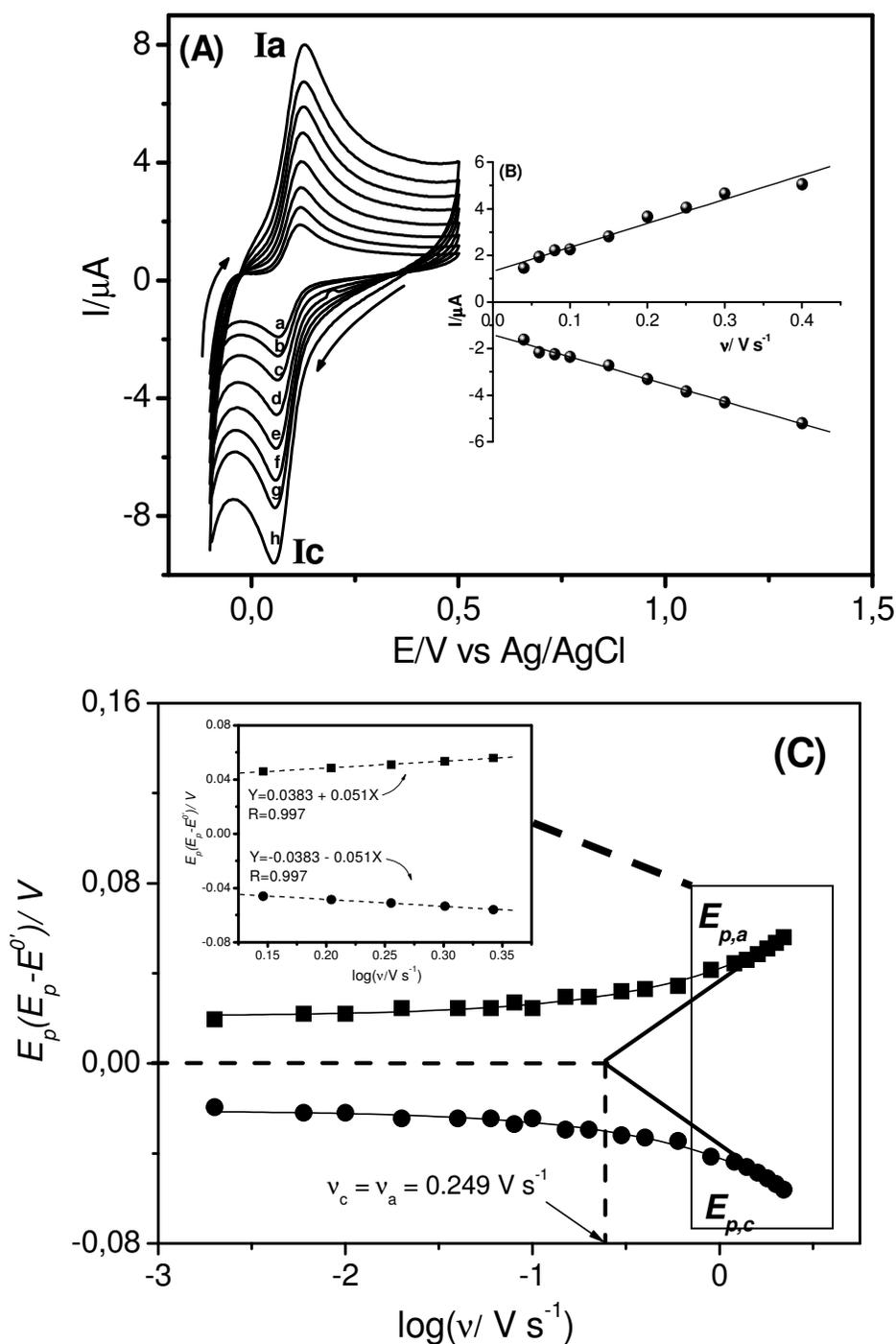
$$\Gamma_{4\text{-NOFN}/4\text{-NHOHFN}} = \frac{Q}{nFA} \quad (\text{Eq.IV.1})$$

Sendo  $A$  a área geométrica,  $n$  o número de elétrons envolvidos na transferência de carga por molécula ( $n = 2$ ) e  $F$  a constante de Faraday.

A partir dos voltamogramas cíclicos,  $Q$  foi calculado e apresentou um valor de  $2,5 \times 10^{-5}$  C após a correção da linha de base. Assim, o  $\Gamma$  do 4-NOFN/4-NHOHFN foi calculado e apresentou um valor de  $6,5 \times 10^{-10}$  mol  $\text{cm}^{-2}$  ( $v = 50 \text{ mVs}^{-1}$ ). Este valor está em concordância com os valores reportados recentemente na literatura (Mano & Kuhn, 2001a).

Os voltamogramas cíclicos representativos obtidos para o eletrodo de pasta de carbono modificado são mostrados na Figura IV.3A para várias velocidades de varredura de potencial (40-400  $\text{mV s}^{-1}$ ). A observação de picos voltamétricos persistentes e bem definidos (Figura IV.3B) indica que o processo redox do par 4-NOFN/4-NHOHFN exibe características de espécies confinadas na superfície do eletrodo.

O potencial formal [ $E^0 = (E_{\text{pa}} + E_{\text{pc}})/2$ ] é quase independente da velocidade de varredura de potencial sugerindo, portanto, uma transferência de carga rápida na faixa de velocidade de varredura estudada 40-900  $\text{mV s}^{-1}$  como observado na Figura IV.3C (Ardakani *et al.*, 2007).



**Figura IV. 3.** (A) Voltamogramas cíclicos para o EPC/4-NOFN/4-NHOHFN em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 em velocidades de varredura de (a) 40, (b) 60, (c) 80, (d) 100, (e) 150, (f) 200, (g) 250, (h) 300 e (h) 400  $\text{mV s}^{-1}$ . (B) gráfico de  $I_p$  vs.  $v$ . (C) gráfico de  $E_p$  vs.  $\log v$ .

Por outro lado, para velocidades de varredura acima de  $900 \text{ mV s}^{-1}$ , a separação dos picos começa a aumentar, indicando uma limitação de cinética de transferência de carga (Figura IV.3C). A partir das expressões gerais derivadas por Laviron para respostas voltamétricas de varredura de potencial para o caso de espécies eletroativas confinadas na superfície (Laviron, 1979):

$$E_{pa} = E^0 + A \ln \left[ \frac{1 - \alpha}{m} \right] \quad (\text{Eq. IV.2})$$

$$E_{pc} = E^0 + B \ln \left[ \frac{\alpha}{m} \right] \quad (\text{Eq. IV.3})$$

Para  $E_{pa} - E_{pc} = \Delta E_p > 200/n \text{ mV}$ :

$$\log k_s = \alpha \log(1 - \alpha) + (1 - \alpha) \log \alpha - \log \left( \frac{RT}{nFv} \right) - \frac{\alpha(1 - \alpha)nF\Delta E_p}{2,3RT} \quad (\text{Eq. IV.4})$$

Sendo a  $A = RT/(1 - \alpha)nF$ ,  $B = RT/\alpha nF$  e  $m = (RT/F) (\kappa_s / n\alpha)$ . A partir dessas expressões e considerando  $n=2e^-(4\text{-NOFN}/4\text{-NHOHFN})$ , foi possível determinar o coeficiente de transferência de carga ( $\alpha$ ), pela medida da variação do potencial de pico com a velocidade de varredura de potencial ( $v$ ), bem como a constante de velocidade de transferência de carga ( $\kappa_s$ ) para a transferência de elétrons entre o eletrodo e a camada eletrogerada *in situ*.

A partir do gráfico de  $E_p = f(\log v)$  verificam-se duas linhas retas com inclinações iguais a  $-2,3RT/\alpha nF$  e  $2,3RT/(1 - \alpha)nF$  para os picos catódico e anódico, respectivamente. Para velocidade de varredura acima de  $900 \text{ mV s}^{-1}$ , os valores de  $\Delta E = (E_p - E^0)$  foram proporcionais ao logaritmo da velocidade de varredura como indicado por Laviron. Os gráficos são mostrados na inserção da Figura IV.3C. Usando o gráfico e a Eq. IV.4, os valores de  $\alpha$  e  $\kappa_s$

foram 0,5 e 10,0 s<sup>-1</sup>, respectivamente. O  $\kappa_s$  também pode ser calculado a partir dos valores de  $\nu_a$  e  $\nu_b$ , sendo  $E_p - E^{0'} = 0$  (Laviron, 1979):

$$\kappa_s = \frac{\alpha n F \nu_c}{RT} = \frac{(1 - \alpha) n F \nu_a}{RT} \quad (\text{Eq.IV. 5})$$

Baseado na expressão simplificada, o valor de  $\kappa_s$  foi calculado e apresentou um valor de 9,7 s<sup>-1</sup>. Assim, os valores de  $\kappa_s$  obtidos a partir de ambas as equações foram muito próximos. O valor obtido para  $\kappa_s$  foi maior do que aqueles obtidos em alguns trabalhos reportados previamente na literatura para outros mediadores como listados na Tabela IV.1, indicando, portanto, uma alta habilidade do 4-NOFN/4-NHOHFN em promover a transferência de elétrons na superfície do eletrodo.

Além disso, a partir das inclinações para o processo catódico e anódico,  $n=2,3$  foi deduzido para o sistema eletroquímico, sugerindo uma transferência de 2 elétrons para o eletrodo modificado com 4-NOFN/4-NHOHFN, imerso em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> e pH =7. Os resultados obtidos para  $\alpha$  e  $n$  estão em concordância com os resultados reportados na literatura (Mano & Kuhn, 1999a). Neste sentido, para diagnosticar melhor o sistema e explorar sua versatilidade para a detecção dos analitos propostos, alguns ensaios foram conduzidos e os resultados são apresentados a seguir.

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

Referência	$\alpha$	$n$	$\kappa_s(\text{s}^{-1})$
(Zhu <i>et al.</i> , 2007)	0,51	—	5,1
(Zare <i>et al.</i> , 2005)	0,55	2,0	3,8
(Duarte <i>et al.</i> , 2008)	0,50	—	3,8
(Zare & Golabi, 1999)	0,44	2,0	8,6
(Ardakani <i>et al.</i> , 2007)	0,66	—	4,5
(Golabi <i>et al.</i> , 2002)	0,49	—	5,3
(Munteanu <i>et al.</i> , 2004)	—	—	4,5
(Munteanu <i>et al.</i> , 2003)	—	2,0	1,1
Este trabalho	0,50	2,3	9,7

## IV.2. Sensor Amperométrico para *L*-CySH

### IV.2.1. A oxidação eletrocatalítica da *L*-CySH pelo EPC/4-NOFN/4-NHOHFN

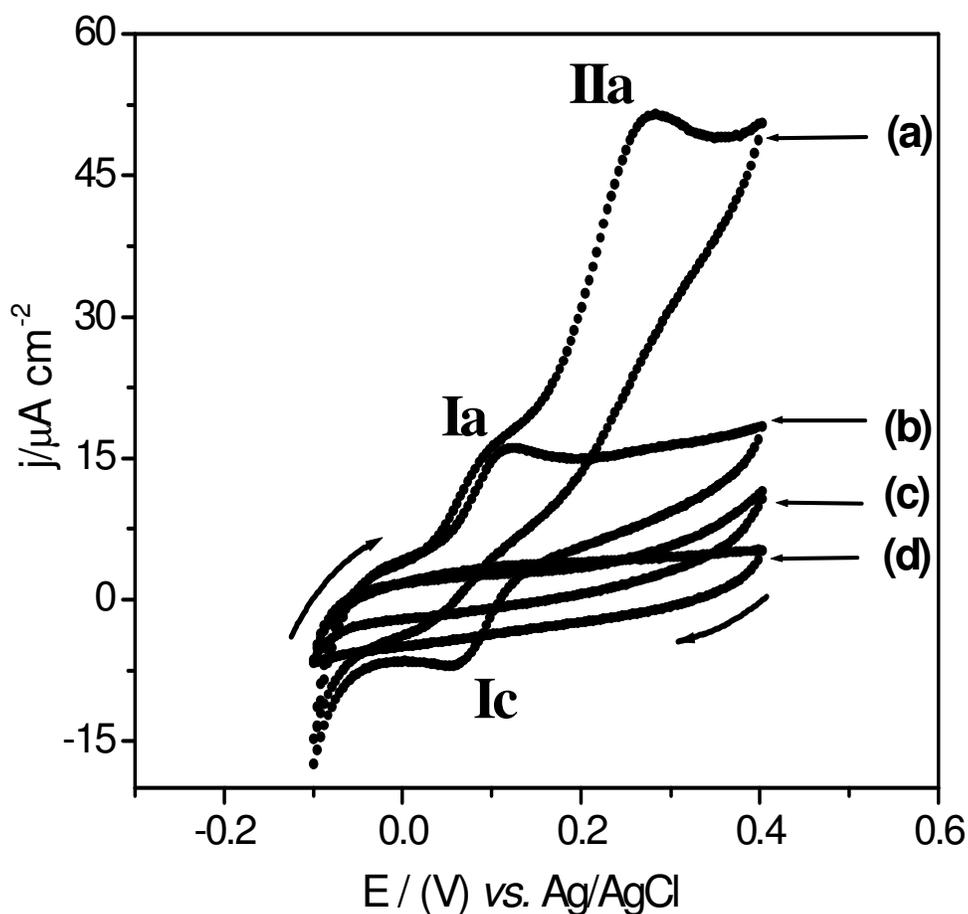
A atividade eletrocatalítica do par redox 4-NOFN/4-NHOHFN foi estudada na presença de *L*-CySH. Assim, a Figura IV.4 mostra os voltamogramas cíclicos para um EPC/4-NOFN/4-NHOHFN em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>(pH=7,0), usando uma varredura no sentido anódico, com  $E_{\text{inicial}} = -0,1$  V e  $E_{\lambda} = 0,4$  V vs. Ag/AgCl, na presença (a) e ausência de *L*-CySH (b).

Para a análise comparativa dos dados, voltamogramas com EPC não modificado na presença (c) e ausência de *L*-CySH (d) são também apresentados. Nesses voltamogramas (Figs. IV. 4c e d), não há evidência de picos, indicando que a oxidação direta de *L*-CySH ocorre fora destes limites ( $E_{pa} > 0,4 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ ). Na Figura IV. 4b, como já mostrado na Figura IV.3, o sistema redox  $I_{pa}/I_{pc}$ , relativo ao par redox 4-NOFN/4-NHOHFN está presente em potenciais de  $E_{pla} = 0,100 \text{ V}$  e  $E_{plc} = 0,050 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ .

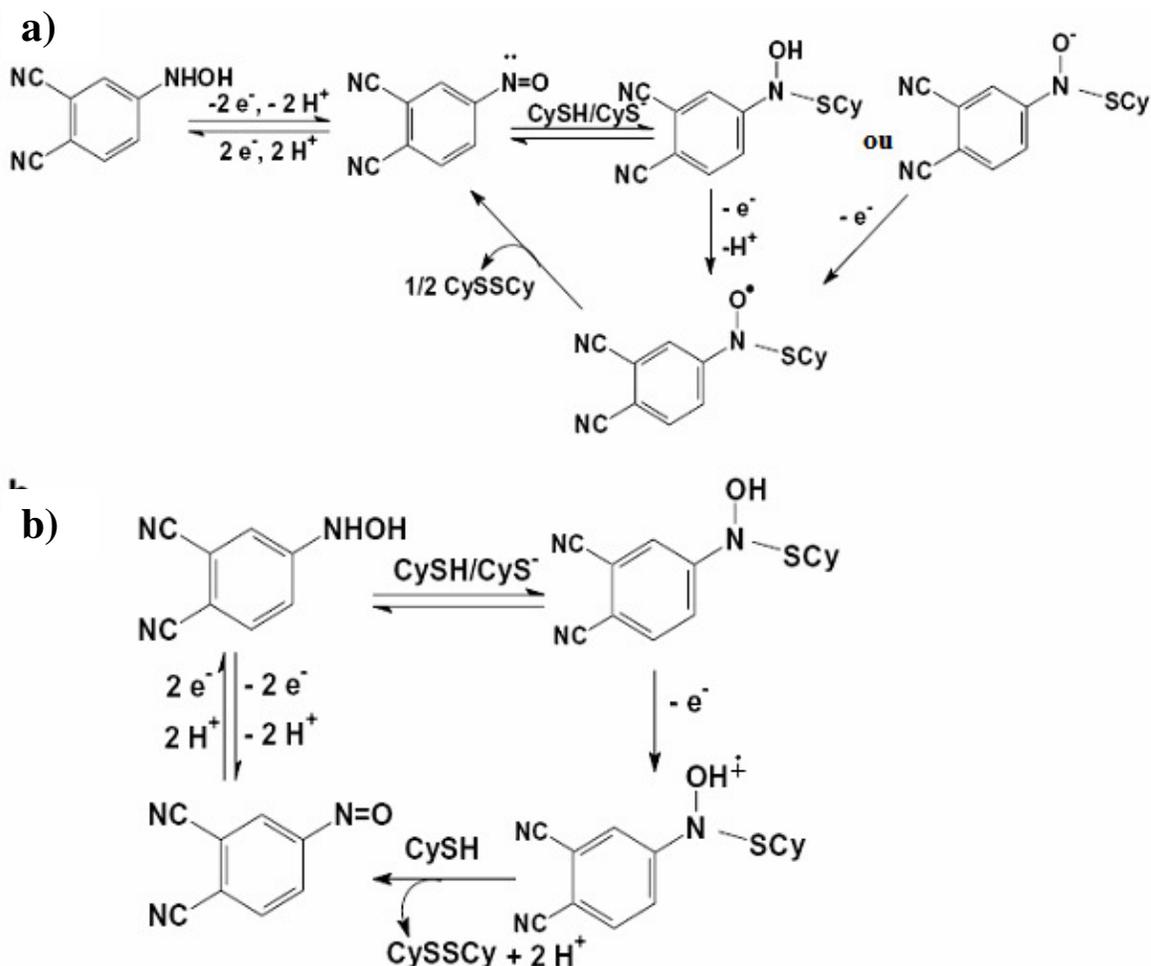
Na Figura IV.4a, após adição de *L*-CySH à solução, observa-se, na primeira varredura, que o pico  $I_a$  (relativo à oxidação de 4-NHOHFN) ainda está presente, com um pequeno aumento, ao passo que um novo pico ( $I_{pa}$ ) aparece, com uma corrente de pico significativamente maior, em um potencial de  $0,300 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ . Na varredura reversa, o pico  $I_c$  ainda é observado. Este fato sugere que *L*-CySH/ $CyS^-$  ( $pK_a=8,37$ ) reage com o derivado nitroso eletrogerado na superfície, formando um aduto, que sofre uma reação química sequencial, gerando um composto oxidável, como mostrado anteriormente por Komiyama & Fujimori (1997) (Figura IV.5).

A Figura IV.5.a apresenta o ataque nucleofílico  $-SH/S^-$  ao nitroso, formando o  $RN(OH)SCy/RN(O^-)SCy$  (aduto nitrosotiol), que é oxidado, pela perda de um elétron (com ou sem a liberação de  $H^+$ ), neste potencial, que após dissociação, gera a cistina ( $CyS-SCy$ ) e RNO (Figura IV.5a). Este mecanismo pode explicar o alto valor de corrente observado. Por outro lado, alguns trabalhos publicados propõem que o aduto  $RN(OH)SCy$  pode reagir com outra *L*-CySH gerando a  $CyS-SCy$  e o derivado hidroxilamina, que se oxida em  $0,300 \text{ V}$  (Figura IV.5b) (Abiman *et al.*,2007). Assim, se esta hipótese for correta, o pico de redução do nitroso a hidroxilamina deve desaparecer, mas o pico  $I_c$  é sempre observado. Neste sentido, o primeiro mecanismo pode

explicar o comportamento eletroquímico observado. Por outro lado, o mecanismo (Figura IV.5b) não pode ser totalmente rejeitado.



**Figura IV.4.** Voltamogramas cíclicos para o EPC/4-NOFN/4-NHOHFN, na presença (a) e ausência (b) de  $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$  de L-CySH; EPC não modificada na presença (c) e ausência (d) de  $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$  de L-CySH. Condições empregadas: solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 e  $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$ .



**Figura IV.5.** Modelos esquemáticos processo de oxidação eletrocatalítico entre o EPC/4-NOFN/4-NHOHFN e a L-CySH (a,b).

Estudos mais detalhados a respeito da corrente de pico de oxidação da L-CySH na superfície do EPC/4-NOFN/4-NHOHFN foram realizados por voltametria cíclica em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  ( $\text{pH}=7,0$ ). Assim, de acordo com o modelo teórico de Andrieux & Savèant (1978), a corrente de pico catalítica  $I_p$  depende da velocidade de varredura de potencial  $v$  como verificado na Equação IV.6 seguinte:

$$I_p = 0,496FAC_s D_o^{1/2} \left( \frac{Fv}{RT} \right)^{1/2} \quad (\text{Eq.IV.6})$$

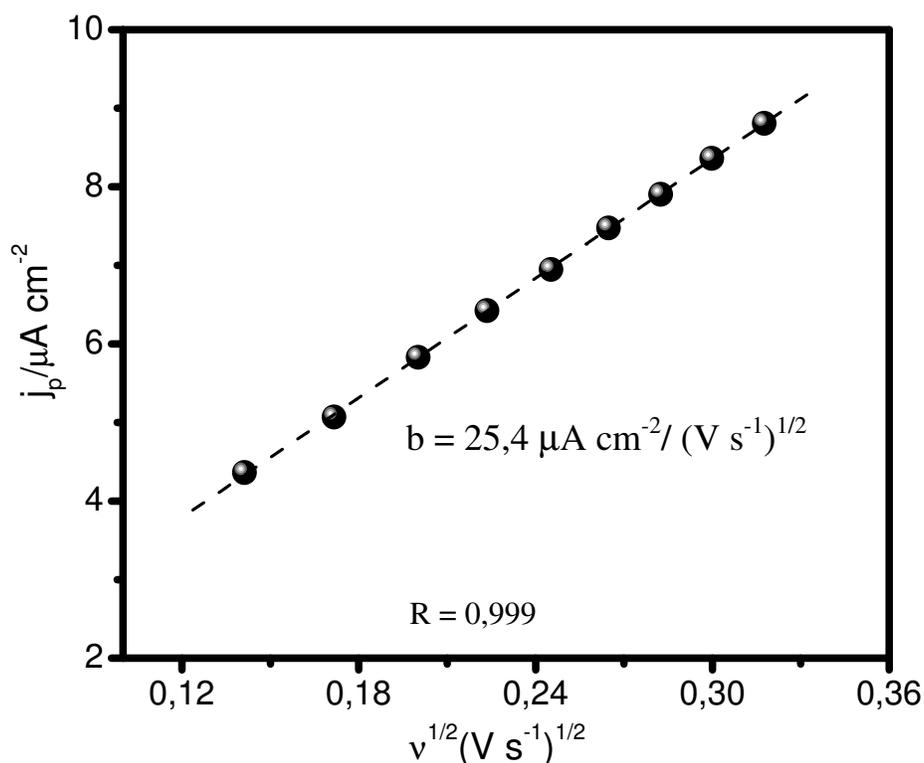
sendo o  $C_s$  a concentração do substrato,  $D_o$  representa o coeficiente de difusão do substrato,  $F$  a constante de Faraday e  $R$  e  $T$  são a constante dos gases e temperatura Kelvin, respectivamente.

Além disso, um sistema catalítico se comporta como um sistema totalmente irreversível eletroquimicamente controlado por difusão para grandes valores de parâmetros cinéticos (ex. grandes valores de  $k$ ), que representa a constante da velocidade da reação (Andrieux & Savèant, 1978).

Assim, um gráfico da densidade de corrente catalítica  $j_p$  *versus* a raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial ( $v^{1/2}$ ) na faixa de velocidade de 0,020 a 0,300  $V s^{-1}$  foi construído e resultou numa dependência linear (Figura IV.7), expressa pela seguinte equação:

$$j_p(\mu A cm^{-2}) = 0,75 + 25,4 v^{1/2} (V s^{-1})^{1/2} \quad (\text{Eq.IV.7})$$

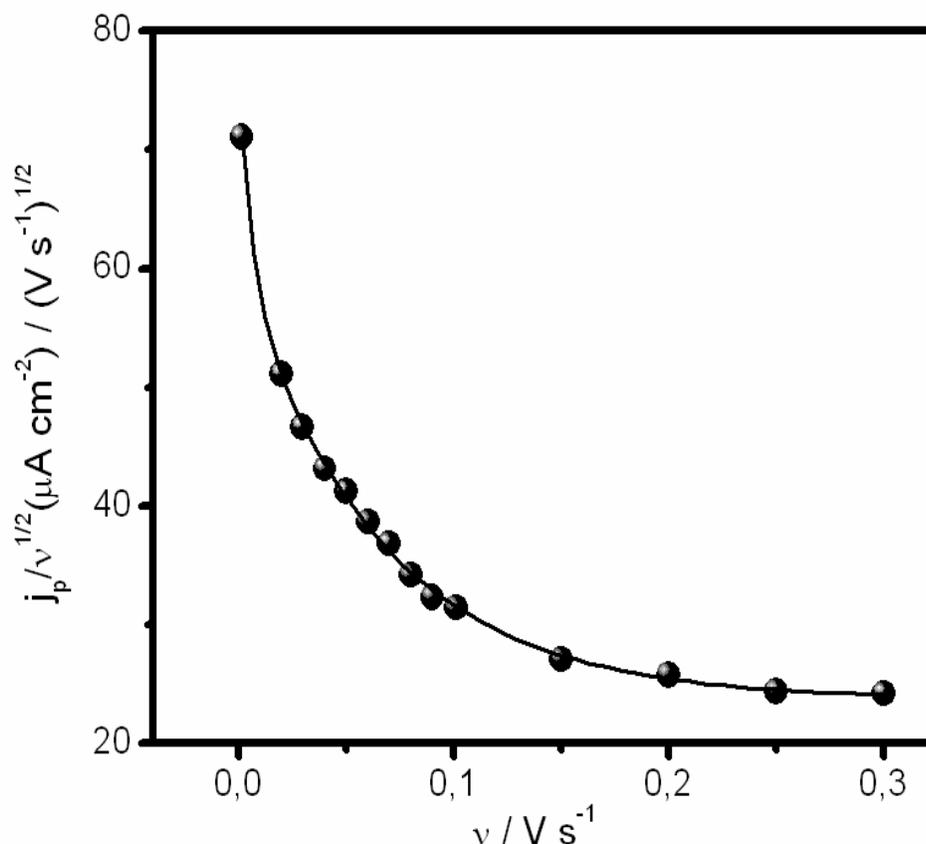
Assim, essa dependência linear sugere que o processo seja controlado por difusão na faixa de velocidade de varredura de potencial estudada.



**Figura IV.6.** Variação da corrente de pico anódica  $j_{pa}$  vs.  $v^{1/2}$  no EPC/4-NOFN/4-NHOHFN em solução contendo  $0,02 \text{ mmol L}^{-1}$  de L-CySH. Medidas realizadas em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 e  $v$ :  $0,01$ - $0,3 \text{ V s}^{-1}$

Para ratificar que o processo de oxidação eletrocatalítica entre a L-CySH e o EPC/4-NOFN/4-NHOHFN de fato apresenta uma etapa química acoplada, foram realizados alguns ensaios. Pela análise do gráfico da corrente de pico normalizada pela raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial ( $j_{pa}/v^{1/2}$ ) versus a velocidade de varredura de potencial (Figura IV.7) é possível observar um perfil característico de um típico processo eletroquímico-químico catalítico ( $EC_{cat}$ ) (Bard & Faulkner, 2001),

corroborando, portanto, com o mecanismo proposto como observado na Figura IV.5a.



**Figura IV.7.** Variação da corrente de pico anódica normalizada  $j_{pa}/v^{1/2}$  vs.  $v^{1/2}$  no EPC/4-NOFN/4-NHOHN em solução contendo  $0,02 \text{ mmol L}^{-1}$  de L-CySH. Medidas realizadas em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 e  $v$ :  $0,01$ - $0,3 \text{ V s}^{-1}$ .

A partir do coeficiente angular da Equação IV.7 deve ser possível calcular o número de elétrons ( $n$ ) envolvidos na oxidação eletrocatalítica da L-CySH no eletrodo modificado. Assim sendo, como pode ser observado na

Figura IV.4a, o experimento de voltametria cíclica na presença de *L*-CySH no EPC/4-NOFN/4-NHOHFN apresentou um pico anódico na faixa de potencial investigada. Por essa razão, assumindo uma oxidação irreversível da *L*-CySH no eletrodo modificado, a seguinte reação foi usada (Bard & Faulkner, 2001):

$$j_p = (2,99 \times 10^5) n [(1-\alpha) n_a]^{1/2} C_s^* D_o^{1/2} \nu^{1/2} \quad (\text{Eq. IV.8})$$

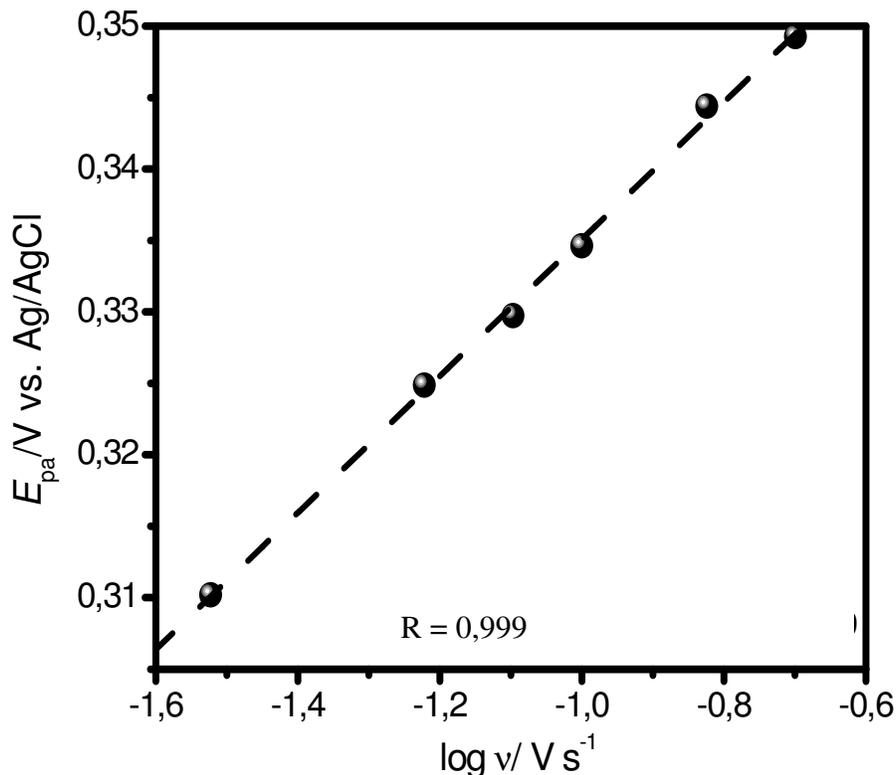
sendo  $j_p$  a densidade de corrente de pico,  $n$  o número total de elétrons envolvidos na reação,  $\alpha$  o coeficiente de transferência de elétrons,  $n_a$  representa o número de elétrons envolvidos na etapa determinante, “ $D_o$ ” ( $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ) o coeficiente de difusão da espécie eletroativa,  $C_s^*$  ( $\text{mol cm}^{-3}$ ) a concentração da espécie eletroativa e  $\nu$  a velocidade de varredura de potencial.

Os valores da concentração da espécie eletroativa e o coeficiente de difusão usados para *L*-CySH em solução aquosa foram  $0,02 \text{ mmol L}^{-1}$  ( $2 \times 10^{-8} \text{ mol cm}^{-3}$ ) e  $4,8 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  (Ozoemena *et al.*, 2001; Luz *et al.*, 2006), respectivamente.

Considerando-se que é necessário o conhecimento do valor de  $[(1-\alpha)n_a]$  presente na (Equação IV.8), uma aproximação foi empregada, baseando-se no deslocamento do potencial de pico em função da velocidade de varredura de potencial (Bard & Faulkner, 2001). Assim, a dependência do potencial de pico com a velocidade de varredura ( $E_{pa}$  versus  $\log \nu$ ) resultou em uma equação de regressão linear representada por  $E_p(\text{V}) = 0,38 + 0,05 \log[\nu(\text{V s}^{-1})]$  para velocidades de varredura entre  $0,010$  e  $0,300 \text{ V s}^{-1}$ , conforme pode ser observado na Figura IV.8.

Baseado na expressão simplificada para uma reação irreversível, a mudança no  $E_{pa}$  para cada aumento de dez vezes na  $\nu$  é  $1,15RT/[(1-\alpha)n_a]F$  (Bard & Faulkner, 2001), o gráfico de  $E_{pa}$  versus  $\log \nu$  indica uma variação linear com inclinação ( $\Delta E_{pa}/\Delta \log \nu$ ) encontrada de 0,0588 V, o valor de  $[(1-\alpha)n_a]$  foi calculado como sendo 0,59. Assim, usando este valor na (Equação IV.8) e o coeficiente angular de  $25,4 \mu A/(V s^{-1})^{1/2}$  extraído do gráfico  $j_{pa}$  versus  $\nu^{1/2}$ , o valor de  $n$  foi calculado e igual a 1,0 como esperado para oxidação de *L*-CySH (Ballarin *et al.*, 2002; Luz *et al.*, 2006; Perez *et al.*, 1998).

Com base nos valores dos parâmetros eletroquímicos obtidos a partir da técnica voltamétrica, construiu-se um modelo esquemático como pode ser verificado na Figura IV.5. Assim, o 4-NOFN reage com *L*-CySH que está presente na interface eletrodo/solução formando um aduto que é oxidado e posteriormente sofre dissociação a R-NO e  $\frac{1}{2}(\text{CyS-SCy})$ . O R-NO pode reagir novamente com uma nova *L*-CySH em um novo ciclo da reação, sendo o aumento da intensidade da corrente de pico de oxidação maior quando comparado com o voltamograma na presença de *L*-CySH e ausência do catalisador na superfície do eletrodo (Figura IV.4).



**Figura IV.8.** Variação do potencial de pico  $E_{pa}$  vs.  $\log v$  para a *L*-CySH no eletrodo modificado. Medidas realizadas em solução tampão fosfato 0,1 mol  $L^{-1}$ , pH 7,0 e  $v$ : 0,01-0,3  $V s^{-1}$ .

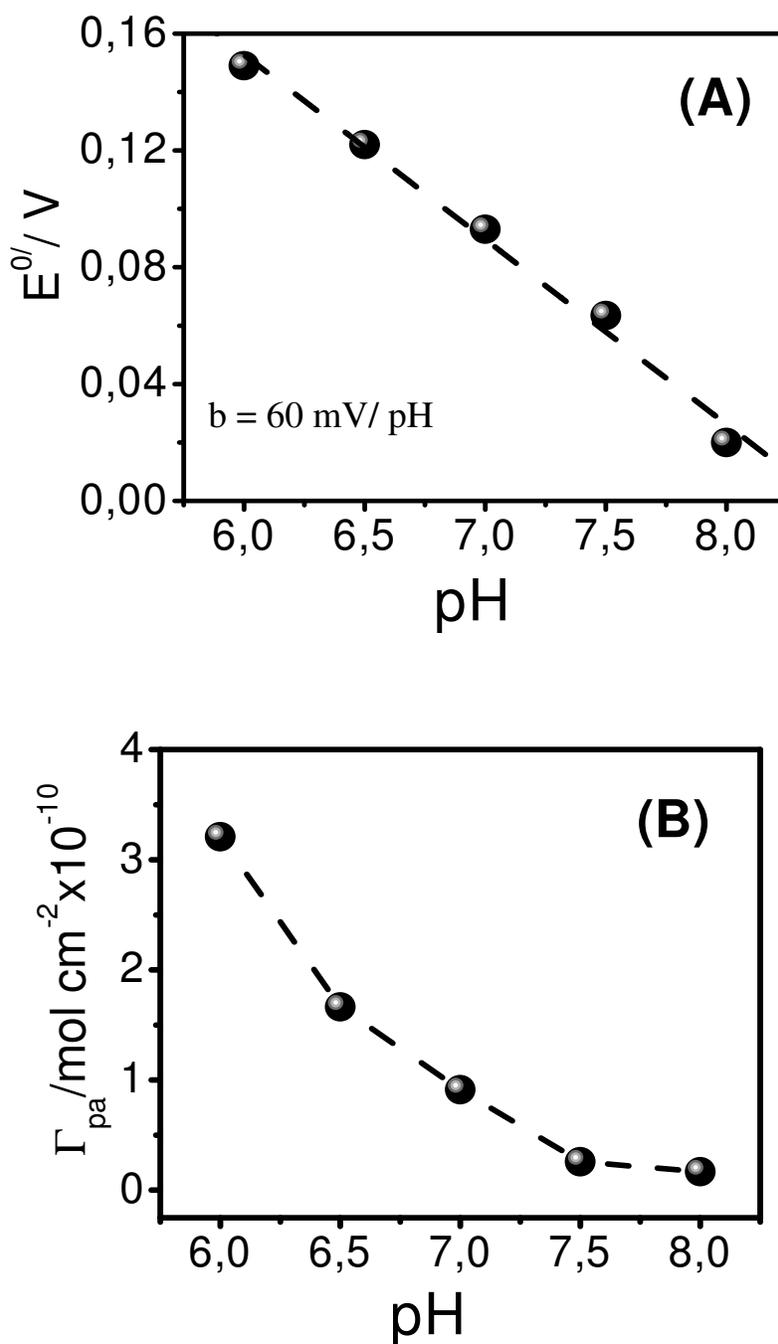
#### IV.2.2. Influência do pH da solução, natureza e concentração do tampão

A influência do pH da solução na resposta eletroquímica na ausência e na presença de *L*-CySH usando solução tampão fosfato 0,1 mol  $L^{-1}$  em pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0 foi estudada. Inicialmente, a relação do  $E^{0'}$  do EPC/4-

NOFN/4-NHOHFN em função do pH da solução foi avaliada na ausência do analito (Figura IV.9A).

Assim, foi possível verificar que a inclinação ( $E^0/\text{pH}$ ) é de aproximadamente 60 mV/unidade de pH na faixa de pH de 6,0 a 8,0. Esta inclinação é próxima do valor teórico Nernstiano de 59,2 mV e torna-se consistente com um processo de dois elétrons e dois prótons associado à interconversão do par redox 4-NOFN/4-NHOHFN.

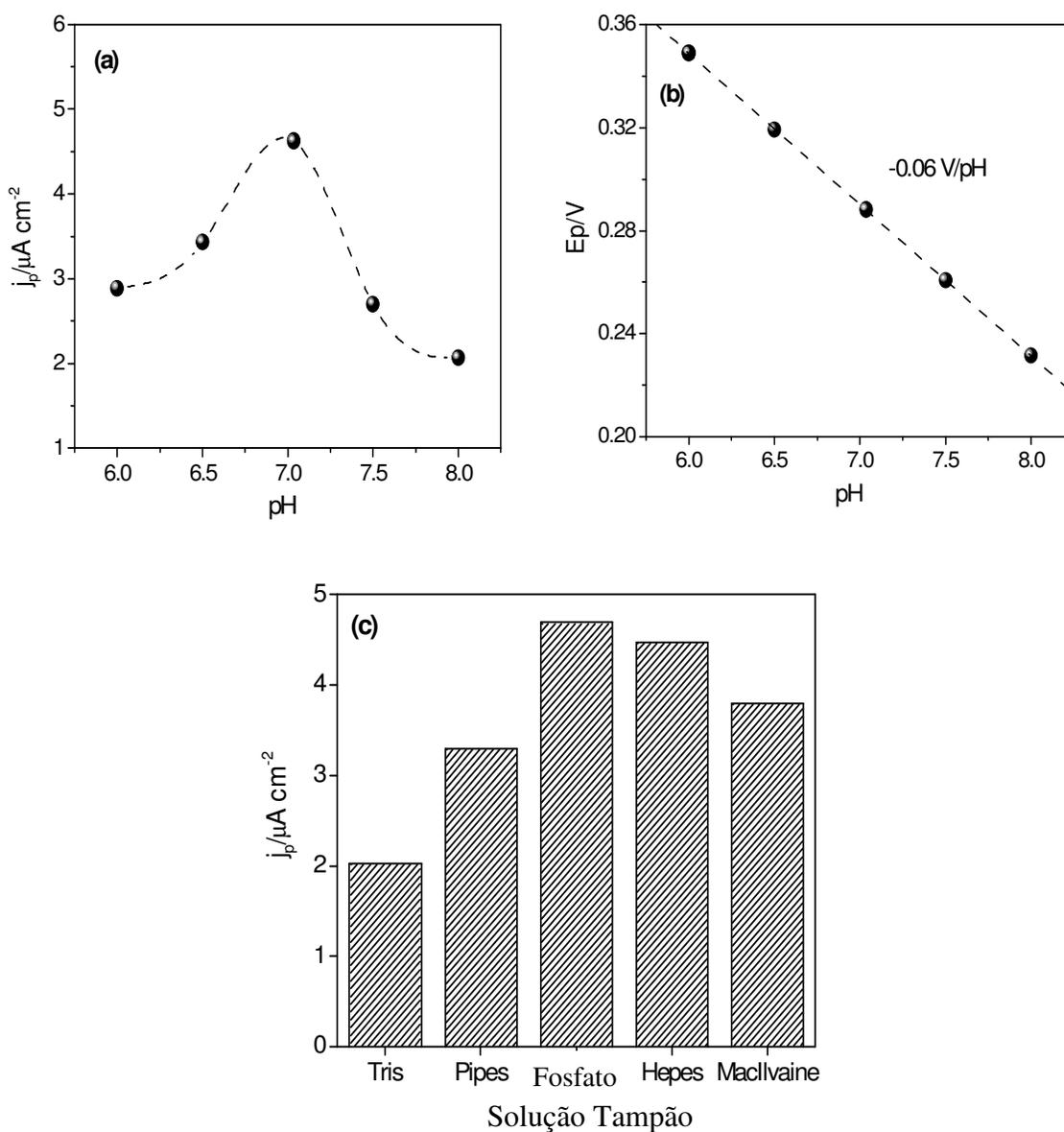
Além disso, há uma diminuição do excesso de superfície ( $\Gamma$ ) com o aumento dos valores de pH da solução (Figura IV.9B). Esta deve ser devida à desprotonação do 4-NOFN/4-NHOHFN confinado na superfície (Andrieux & Saveant, 1978). O cálculo  $\Gamma$  do pico anódico foi determinado usando uma equação típica,  $\Gamma = Q/nFA$ , sendo  $Q$  a carga obtida pela integração do pico anódico em  $0,050 \text{ V s}^{-1}$ ,  $A$ , a área geométrica do eletrodo e  $n = 2e^-$ .



**Figura IV.9.** Potencial formal ( $E^0$ ) do EPC/4-NOFN/4-NHOHFN em função do pH e ausência de L-CySH. Cobertura de superfície aparente ( $\Gamma$ ) em função do pH, na ausência de L-CySH. Condições empregadas: solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 e  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .

Com o intuito de otimizar a resposta eletrocatalítica do EPC/4-NOFN/4-NHOHFN para a oxidação de *L*-CySH, o efeito do pH da solução também foi estudado como pode ser observado nas Figuras IV.10a ,b. Assim, a corrente de pico aumenta com o pH na faixa de 6,0 a 8,0. No pH 7,0 a corrente de pico apresenta um melhor sinal. Por essa razão, o pH da solução foi fixado em 7,0 para os estudos seguintes.

Uma correlação linear foi obtida para o  $E_p$  vs. pH com uma inclinação de 0,0588 V/pH (Figura IV.10b) na faixa de pH entre 6,0 e 8,0, a qual é próxima daquela esperada para uma reação eletródica com razão ( $e^-/H^+$ ) igual a um (0,0592 ( $n_p/n_e$ ) V/pH, sendo o  $n_p = n_e$  a 25 °C) (Bard & Faulkner, 2001). Assim, o número de prótons envolvidos no processo deve ser igual ao dos elétrons. Assim, se o número de elétrons determinado neste trabalho foi 1,0 para o processo de oxidação da *L*-CySH, bem como considerando o comportamento do potencial de pico de oxidação do aduto em função do pH da solução, há somente uma possibilidade para o pH entre 6,0 e 8,0, ou seja, o número de prótons envolvidos neste processo deve ser também 1,0.



**Figura IV.10.** A influência do pH da solução na  $j_p$  (a), potencial de pico (b) e efeito da natureza da solução tampão na  $j_p$  (c) obtida por VC em  $60,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de L-CySH. Condições empregadas: solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 e  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .

A influência da natureza da solução tampão na resposta do sensor foi também testada em cinco diferentes soluções de tampões (HEPES, PIPES, MACILVAINE, TRIS e fosfato), na concentração de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Uma melhor resposta foi obtida em solução de tampão fosfato (Figura IV.10c), sendo, portanto, esta a escolhida para os estudos seguintes. A influência da concentração do tampão fosfato em concentrações diferentes ( $0,025$ ,  $0,05$ ,  $0,10$ ,  $0,2$  e  $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ ) foi estudada. Assim, a melhor resposta foi obtida com solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , a qual foi escolhida para os estudos posteriores. A seguir, para verificar o desempenho do dispositivo desenvolvido, são realizados ensaios de caracterização analítica na presença de *L*-CySH.

### **IV.2.3. Estudos de caracterização analítica do sensor para a *L*-CySH**

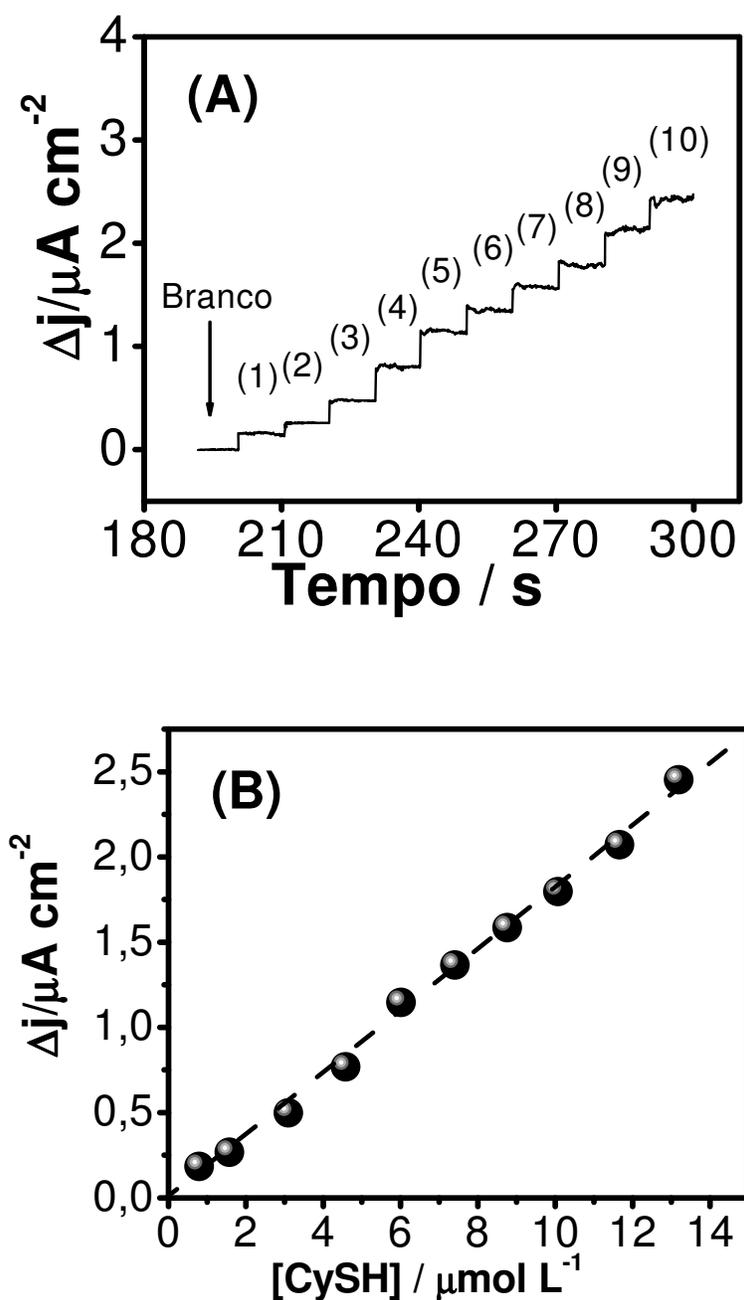
As características do EPC/4-NOFN/4-NHOHFN foram verificadas por experimentos amperométricos. Nas medidas amperométricas, um estudo inicial foi realizado com intuito de determinar o melhor potencial para aplicar no eletrodo para a oxidação da *L*-CySH. Assim, o potencial aplicado foi escolhido baseado nas medidas das intensidades da corrente catalítica nas condições otimizadas e uma maior corrente foi verificada em um potencial aplicado de  $0,330 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ .

Para obter uma curva analítica para o sensor desenvolvido, amperogramas para a oxidação de *L*-CySH foram obtidos em diferentes concentrações, em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  ( $\text{pH} = 7,0$ ) após otimização dos parâmetros experimentais (Figura IV.11A).

O sensor proposto mostrou uma faixa linear de resposta de 0,8 a 13,2  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (Figura IV.11B), que pode ser expressa de acordo com Equação 03 seguinte:

$$\Delta j / (\mu\text{Acm}^{-2}) = 0,003(\pm 0,004) + 0,183(\pm 0,001)[L\text{-CySH}] / \mu\text{mol L}^{-1} \text{ (Eq. IV.9)}$$

com um coeficiente de correlação de 0,998 (para  $n = 10$ ) com sensibilidade e limite de detecção melhores em relação a vários trabalhos reportados recentemente na literatura (Tabela I.1)



**Figura IV.11.** (A) Medidas amperométricas para a eletrooxidação de L-CySH no EPC/4-NOFN/4-NHOHFN. Condições empregadas: solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0,  $E_{\text{aplicado}}=0,330 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  e [L-CySH]: (1) 0,8 – (10)  $13,20 \mu\text{mol L}^{-1}$ . (B) Curva analítica.

A sensibilidade de  $37 \text{ nA L } \mu\text{mol}^{-1}$  pode ser atribuída à eficiência na transferência eletrônica entre o 4-NOFN e a *L*-CySH. O limite de detecção (LD) de  $0,25 \mu\text{mol L}^{-1}$  foi determinado, usando um razão  $3\sigma/b$  e o limite de quantificação (LQ) de  $0,80 \mu\text{mol L}^{-1}$  usando  $10\sigma/b$ , sendo  $\sigma$  o DPR do valor médio para dez amperogramas do branco e  $b$  o coeficiente angular da curva analítica (Figura IV.11B), determinado de acordo com as recomendações da IUPAC (Analytical Methods Committee, 1987).

A Tabela I.1 lista alguns trabalhos reportados na literatura com o propósito de comparação envolvendo eletrodos quimicamente modificados com vários mediadores para a determinação de *L*-CySH. A partir da Tabela I.1. Além disso, os potenciais de oxidação para a *L*-CySH são relativamente altos quando comparados com o do presente trabalho, o qual também apresenta melhores sensibilidade e limite de detecção em relação aos vários sensores apresentados na Tabela I.1. Assim sendo, o aumento da sensibilidade pode ser atribuída à eficiente transferência de elétrons entre o mediador ativado *in situ* e o grupo sulfidril da *L*-CySH.

#### **IV.2.4. Estabilidade da 4-NO<sub>2</sub>FN na pasta de carbono**

Após o processo de ativação *in situ* da 4-nitroftalonnitrila, a estabilidade do par redox 4-NOFN / 4-NHOHFN foi checada através de voltamogramas cíclicos sucessivos. A variação da corrente de pico depois de estabilizada foi avaliada, com o DPR. Assim, após 50 ciclos foi observado um DPR menor do que 5%, sugerindo uma boa estabilidade.

Além disso, a estabilidade do EPC/4-NOFN/4-NHOHFN foi verificada na presença de *L*-CySH, por meio de voltamogramas cíclicos na faixa de

potencial entre -0,1 e 0,4 V vs. Ag/AgCl. Depois de 80 determinações nenhuma mudança significativa foi observada nas respostas voltamétricas.

Quando o eletrodo modificado foi estocado a seco e na temperatura ambiente, nenhuma mudança significativa foi observada por três meses. O eletrodo modificado apresentou uma boa repetibilidade para a determinação de *L*-CySH. O DPR para dez determinações de 13  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de *L*-CySH foi 4,1 %. Adicionalmente, uma série de vinte sensores preparados da mesma maneira e testados em solução tampão fosfato 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  (pH = 7,0) contendo 13,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de *L*-CySH, apresentaram respostas com DPR menor do que 5,0 %, indicando uma boa estabilidade e repetibilidade, provavelmente devido às interações  $\pi$ - $\pi$  e propriedades lipofílicas que devem favorecer a adsorção na matriz, levando a uma boa estabilidade em suas respostas voltamétricas (Shahrokhiana *et al.*, 2005). O DPR para os demais analitos estudados manteve-se entre 3,5% e 5,0%, indicando, portanto, uma ótima estabilidade do sinal analítico.

#### **IV.2.5. Aplicação do sensor desenvolvido em amostras e testes de recuperação**

Para verificar o potencial prático do sensor desenvolvido, o mesmo foi aplicado para a detecção e quantificação de *L*-CySH em amostras de suplemento alimentar comercial em triplicata. As concentrações dos analitos foram determinadas usando o método de adição de padrão e os resultados foram comparados ao método espectrofotométrico usando o teste *t*-Student pareado para *L*-CySH, mostrando, portanto, que os resultados são estatisticamente os mesmos, no nível de confiança de 95% (Tabela IV.2).

Assim, o sensor de pasta de carbono modificada com o 4-NO<sub>2</sub>FN, submetido a uma redução eletroquímica preliminar do grupo –NO<sub>2</sub> demonstra ser sensível, estável, preciso e rápido para a determinação de *L*-CySH.

**Tabela IV.2.** Determinação de *L*-CySH em amostras de suplemento alimentar em triplicata.

Amostras	Determinação de CySH	
	Método proposto (m/mg)	Método Comparativo (m/mg)
A	497 (± 3)	500 (±20)
B	506 (± 10)	499 (±13)

*m*: massas obtidas por cápsula para *L*-CySH.

Para uma checagem adicional da exatidão do método desenvolvido e do efeito de matriz, experimentos analíticos de recuperação foram feitos pela adição de quantidades conhecidas de um padrão de *L*-CySH em amostras de suplemento alimentar. A percentagem de valores recuperados foi calculada pela comparação com aqueles encontrados nas amostras e as concentrações esperadas, de acordo com a Equação IV.10 a seguir:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{concentração encontrada}}{\text{concentração esperada}} \times 100 \quad (\text{Eq.IV.10})$$

Assim, as recuperações encontradas para as amostras são mostradas na Tabela IV.3 e a partir desta, verifica-se, portanto, que não há influência de matriz na resposta do sensor desenvolvido para as amostras avaliadas.

**Tabela IV.3.** Dados de recuperação de L-CySH em amostras de suplemento alimentar ( $n=3$ ) obtidos com o sensor desenvolvido.

<b>Amostras</b>	<b>CySH<sub>ad.</sub></b> <b>(<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	<b>CySH<sub>esp.</sub></b> <b>(<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	<b>CySH<sub>encon.</sub></b> <b>(<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	<b>Recup.</b> <b>(%)</b>
<b>A</b>	0,0	----	1,94( $\pm 0,02$ )	
	1,96	3,90	3,96 ( $\pm 0,06$ )	101 ( $\pm 1$ )
<b>B</b>	0,0	----	2,05( $\pm 0,05$ )	
	1,96	4,01	4,11 ( $\pm 0,09$ )	102 ( $\pm 1$ )

### IV.3. Sensor Amperométrico para *L*-GSH

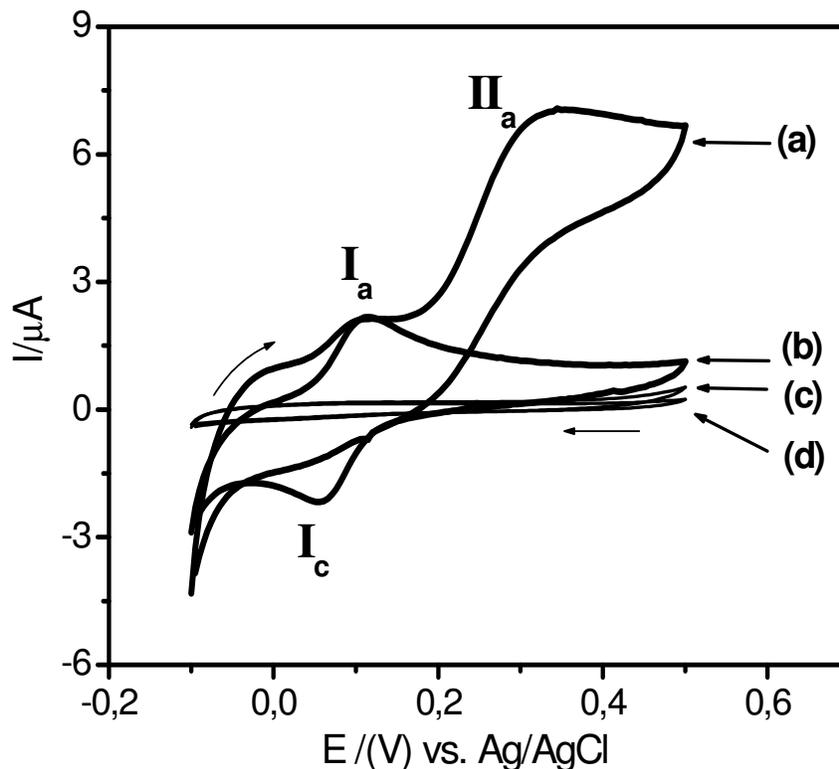
#### IV.3.1. A oxidação eletrocatalítica de *L*-GSH pelo EPC/4-NOFN/4-NHOHFN

A atividade eletrocatalítica do par redox 4-NOFN/4-NHOHFN foi também estudada na presença de *L*-GSH. Assim, a Figura IV. 12 mostra os voltamogramas cíclicos para um EPC/4-NOFN/4-NHOHFN em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>(pH=7,0), usando uma varredura no sentido anódico, com  $E_{inicial} = -0,1$  V e  $E_{\lambda} = 0,4$  V vs. Ag/AgCl, na presença (a) e ausência de *L*-GSH (b).

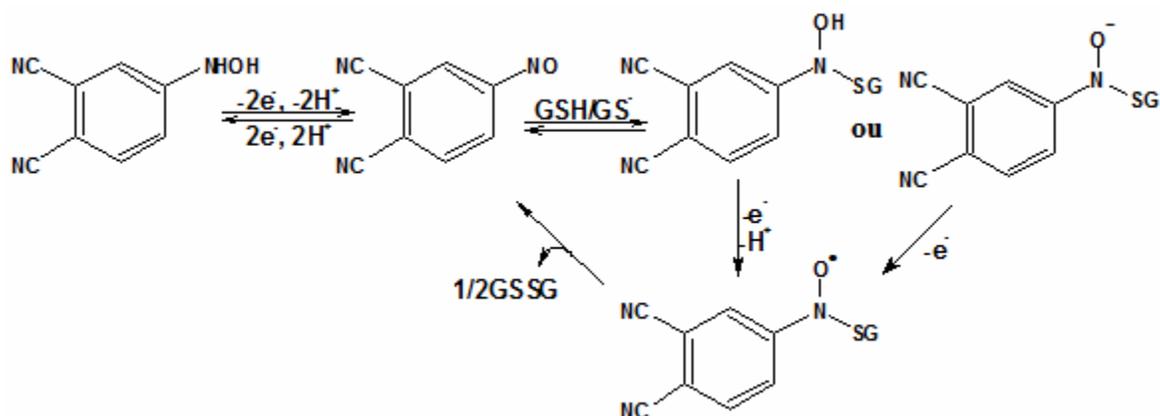
Para análise comparativa dos dados, voltamogramas com EPC não modificado na presença (c) e ausência de *L*-GSH (d) são também apresentados. Nesses voltamogramas (Figs. IV.12c e d), não há evidência de picos, indicando que a oxidação direta de *L*-GSH está fora destes limites ( $E_{pa} > 0,4$  V vs. Ag/AgCl). Na Figura IV.12b, o sistema redox  $I_{pa}/I_{pc}$ , relativo ao par redox 4-NOFN/4-NHOHFN está presente em potenciais de  $E_{pIa} = 0,100$  V e  $E_{pIc} = 0,050$  V vs. Ag/AgCl.

Na Figura IV.12a, após adição de *L*-GSH a solução, observa-se, na primeira varredura, que o pico Ia (relativo à oxidação de 4-NHOHFN) ainda está presente, com um pequeno aumento, ao passo que um novo pico ( $I_{pa}$ ) aparece, com uma corrente de pico significativamente maior, em um potencial de 0,350 V vs. Ag/AgCl. Na varredura reversa, o pico  $I_c$  ainda é observado. Este fato sugere que *L*-GSH /GS<sup>-</sup> (pKa = 9,65) reage com o derivado nitroso eletrogerado na superfície, formando um aduto, que sofre uma reação química sequencial, gerando um composto oxidável, como mostrado anteriormente por

Komiyama & Fujimori (1997). A Figura IV.13 apresenta o ataque nucleofílico  $-SH/S^-$  ao nitroso, formando o  $RN(OH)SG/RN(O^-)SG$  (aduto nitrosotiol), que é oxidado, pela captura de um elétron (com ou sem a liberação de  $H^+$ ), neste potencial, que após dissociação, gera o dissulfeto ( $GS-SG$ ) e  $RNO$  (Figura IV.13). Este mecanismo pode explicar o alto valor de corrente observado. Este mecanismo ocorre de forma semelhante ao da *L*-CySH como discutido anteriormente.



**Figura IV.12.** Voltamogramas cíclicos para o EPC/4-NOFN/4-NHOHFN, na presença (a) e ausência (b) de  $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$  de *L*-GSH; EPC não modificada na presença (c) e ausência (d) de  $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$  de *L*-GSH. Condições empregadas: solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $pH=7,0$  e  $v=0,05 \text{ V s}^{-1}$ .



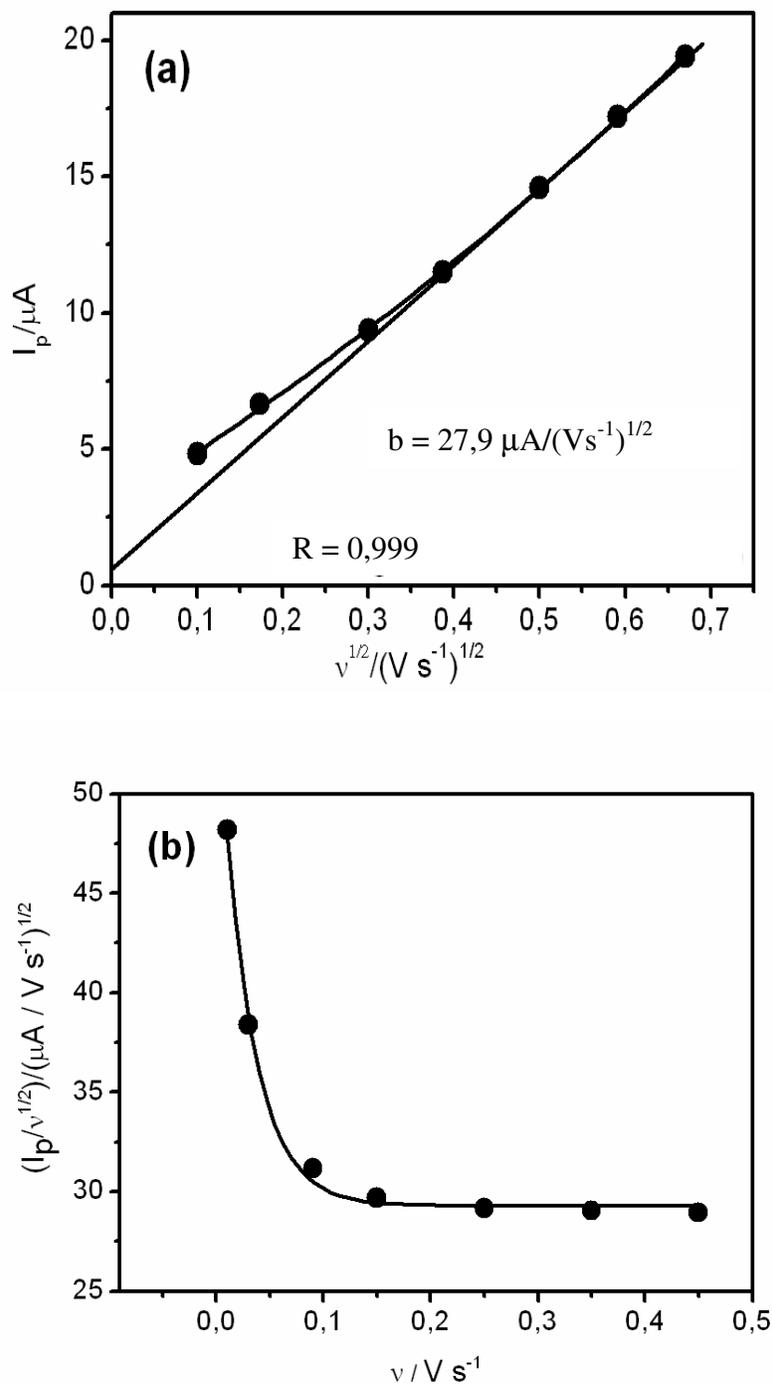
**Figura IV.13.** Mecanismo proposto para a reação entre o eletrodo modificado com a 4-NOFN/4-NHOHFN e L-GSH.

Estudos mais detalhados a respeito da corrente de pico de oxidação da L-GSH na superfície do EPC/4-NOFN/4-NHOHFN foram realizados por voltametria cíclica em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  ( $\text{pH}=7,0$ ). Assim, de acordo com o modelo teórico de Andrieux & Savèant (1978), a corrente de pico catalítica  $I_p$  depende da velocidade de varredura de potencial,  $\nu$ , como observado na Equação IV.6.

Além disso, um sistema catalítico se comporta como um sistema totalmente irreversível eletroquimicamente controlado por difusão para grandes valores de parâmetros cinéticos (ex. grandes valores de  $k$ ), que representa a constante da velocidade da reação (Andrieux & Savèant, 1978), como já discutido no item anterior para o processo electrocatalítico de oxidação da L-CySH. Assim, um gráfico da corrente catalítica  $I_p$  versus a raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial ( $\nu^{1/2}$ ), na faixa de velocidade de  $0,010$  a  $0,450 \text{ V s}^{-1}$  foi construído e resultou numa dependência linear (Figura IV.14), expressa pela Equação IV.11 seguinte:

$$I_p(\mu\text{A}) = 0,3 + 27,9 v^{1/2} (\text{V s}^{-1})^{1/2} \quad (\text{Eq.IV.11})$$

Assim, esta dependência linear sugere que o processo seja controlado por difusão na faixa de velocidade de varredura de potencial estudado.



**Figura IV.14.** (a) Variação da corrente de pico anódica  $I_{pa}$  vs.  $v^{1/2}$  no EPC/4-NOFN/4-NHOHN em solução contendo  $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$  de L-GSH e (b)  $I_p/v^{1/2}$  vs.  $v$ . Medidas realizadas em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 e  $v$ :  $0,01$ - $0,45 \text{ V s}^{-1}$ .

Para ratificar que o processo de oxidação eletrocatalítica entre a *L*-GSH e o EPC/4-NOFN/4-NHOHFN também ocorre via etapa química acoplada, alguns ensaios foram realizados. A partir do gráfico da corrente de pico normalizada com a raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial ( $I_{pa}/v^{1/2}$ ) versus a velocidade de varredura de potencial (Figura IV.14b) é possível observar um perfil característico de um processo típico eletroquímico-químico catalítico ( $EC_{cat}$ ) (Bard & Faulkner, 2001), corroborando, portanto, com o mecanismo proposto.

Usando o coeficiente angular da Equação IV.11 deve ser possível calcular o número de elétrons ( $n$ ) envolvido na oxidação de *L*-GSH pelo eletrodo modificado ativado *in situ*. Assim sendo, como pode ser observado na Figura IV.12a, o experimento de voltametria cíclica na presença de *L*-GSH no EPC/4-NOFN/4-NHOHFN apresentou um pico anódico na faixa de potencial investigada. Por essa razão, assumindo uma oxidação irreversível da *L*-GSH pelo eletrodo modificado a Equação IV.8 foi também utilizada.

Os valores da concentração da espécie eletroativa e o coeficiente de difusão usados para *L*-GSH em solução aquosa foram  $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$  ( $2 \times 10^{-7} \text{ mol cm}^{-3}$ ) e  $6,47 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  (Chen *et al.*, 2006; Jin & Chen, 2000), respectivamente.

Considerando-se que é necessário o conhecimento do valor de  $[(1-\alpha)n_a]$  presente na Eq. IV.8, uma aproximação foi empregada baseando-se no deslocamento do potencial de pico em função da velocidade de varredura de potencial (Bard & Faulkner, 2001). Assim, a dependência da posição do potencial de pico em função da velocidade de varredura ( $E_{pa}$  versus  $\log v$ ) resultou em uma equação de regressão representada por  $E_p(\text{V}) = 0,37 + 0,05 \log[v(\text{Vs}^{-1})]$  para velocidades de varredura entre  $0,030$  e  $0,400 \text{ V s}^{-1}$ .

Neste sentido, baseado na expressão simplificada para uma reação irreversível, a mudança no  $E_{pa}$  para cada aumento de dez vezes na  $\nu$  é  $1,15RT/[(1-\alpha)n_a]F$  (Bard & Faulkner, 2001), o gráfico de  $E_{pa}$  versus  $\log \nu$  indica uma variação linear com inclinação ( $\Delta E_{pa}/\Delta \log \nu$ ) encontrada de 0,05, o valor de  $[(1-\alpha)n_a]$  foi calculado como sendo 0,6. Assim, usando este valor na Equação IV.8 e o coeficiente angular de  $27,9 \mu A/(V s^{-1})^{1/2}$  extraído do gráfico  $I_{pa}$  versus  $\nu^{1/2}$ , o valor de  $n$  foi calculado e igual a 1,0 como esperado para oxidação de *L*-GSH (Penninckx, 2000).

Construiu-se, então, um modelo esquemático (Figura IV.13) baseado nas informações obtidas a partir dos dados voltamétricos. Assim, a nitroftalonitrila (R-NO) reage com *L*-GSH de maneira similar ao processo na presença de *L*-CySH, formando um aduto que é oxidado e posteriormente, dissocia-se em R-NO e  $1/2(GS-SG)$ . O R-NO pode reagir novamente com uma nova *L*-GSH em um novo ciclo da reação, sendo o aumento da intensidade da corrente de pico de oxidação maior quando comparado com o voltamograma na presença de *L*-GSH e ausência do catalisador na superfície do eletrodo (Figura IV.12).

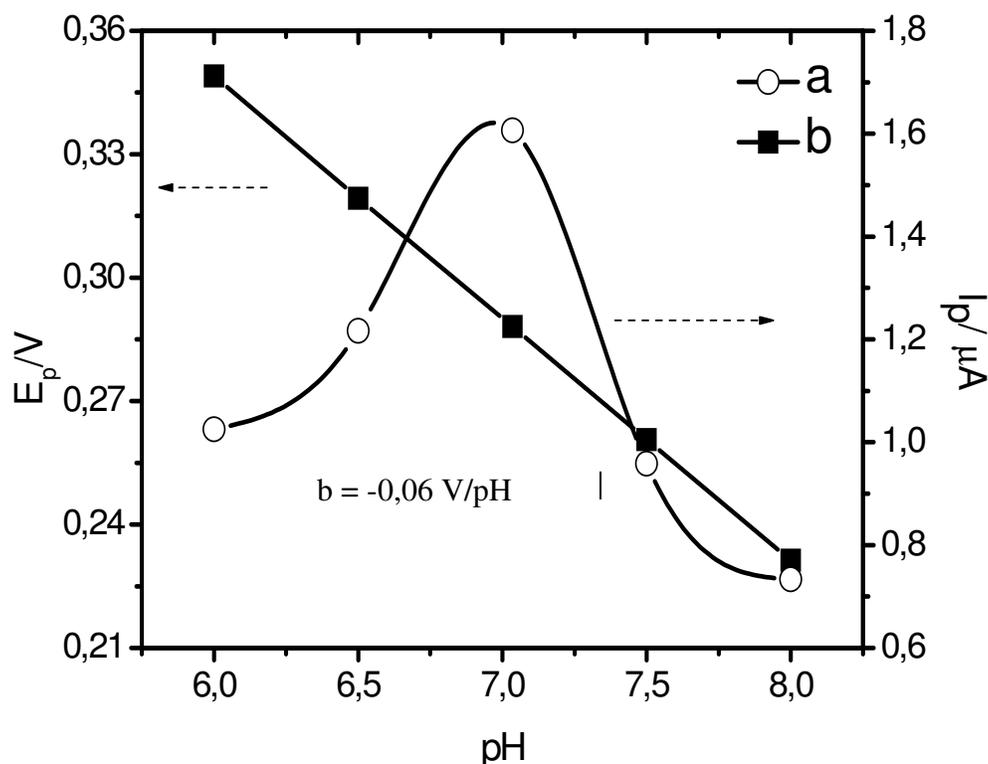
### IV.3.2. Influência do pH da solução, natureza e concentração do tampão

Com o intuito de otimizar a resposta eletrocatalítica do EPC/4-NOFN/4-NHOHFN para a oxidação de *L*-GSH, o efeito do pH da solução no comportamento da oxidação eletrocatalítica também foi estudado como pode ser observado nas Figuras IV.15a e b. A corrente de pico aumenta com o aumento pH da solução na faixa de 6,0 a 7,0. Assim, no pH 7,0 a corrente de

pico teve um maior valor. Por outro lado, uma diminuição na corrente é observada quando o pH da solução é maior que 7,0. Por essa razão, o pH da solução foi fixado em 7,0 para os estudos seguintes.

Uma correlação linear obtida para o  $E_p$  vs. pH com uma inclinação de 0,0588 V/pH (Figura IV.15b) na faixa de pH entre 6,0 e 8,0, é próxima aquela esperada para uma reação eletrodica com razão ( $e^-/H^+$ ) igual a um (0,0592 ( $n_p/n_e$ ) V/pH, sendo o  $n_p = n_e$  a 25 °C) (Bard & Faulkner, 2001).

Assim, se o número de elétrons determinado neste trabalho foi 1,0 bem como considerando o comportamento do potencial de pico com o pH da solução, há somente uma possibilidade para o pH entre 6,0 e 8,0. O número de prótons envolvidos neste processo deve ser também 1,0.



**Figura IV.15.** A influência do pH da solução na  $I_p$  (a), potencial de pico (b) obtida por VC em  $60,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de L-GSH. Condições empregadas: solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 e  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .

A influência da natureza da solução tampão na resposta do sensor foi também testada em quatro diferentes soluções de tampões (HEPES, PIPES, MACILVAINE, TRIS e fosfato), em concentrações de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e indicando que a solução de tampão fosfato apresentou a melhor resposta, sendo, portanto, esta a escolhida para os estudos seguintes. Além disso, a influência da concentração da solução tampão fosfato em concentrações diferentes ( $0,025$ ,  $0,05$ ,  $0,10$ ,  $0,2$  e  $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ ) foi estudada. Assim, a melhor resposta

foi obtida com solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, a qual foi escolhida para os estudos posteriores. A seguir, para verificar o desempenho do dispositivo desenvolvido, são realizados alguns ensaios de caracterização analítica na presença de *L*-GSH.

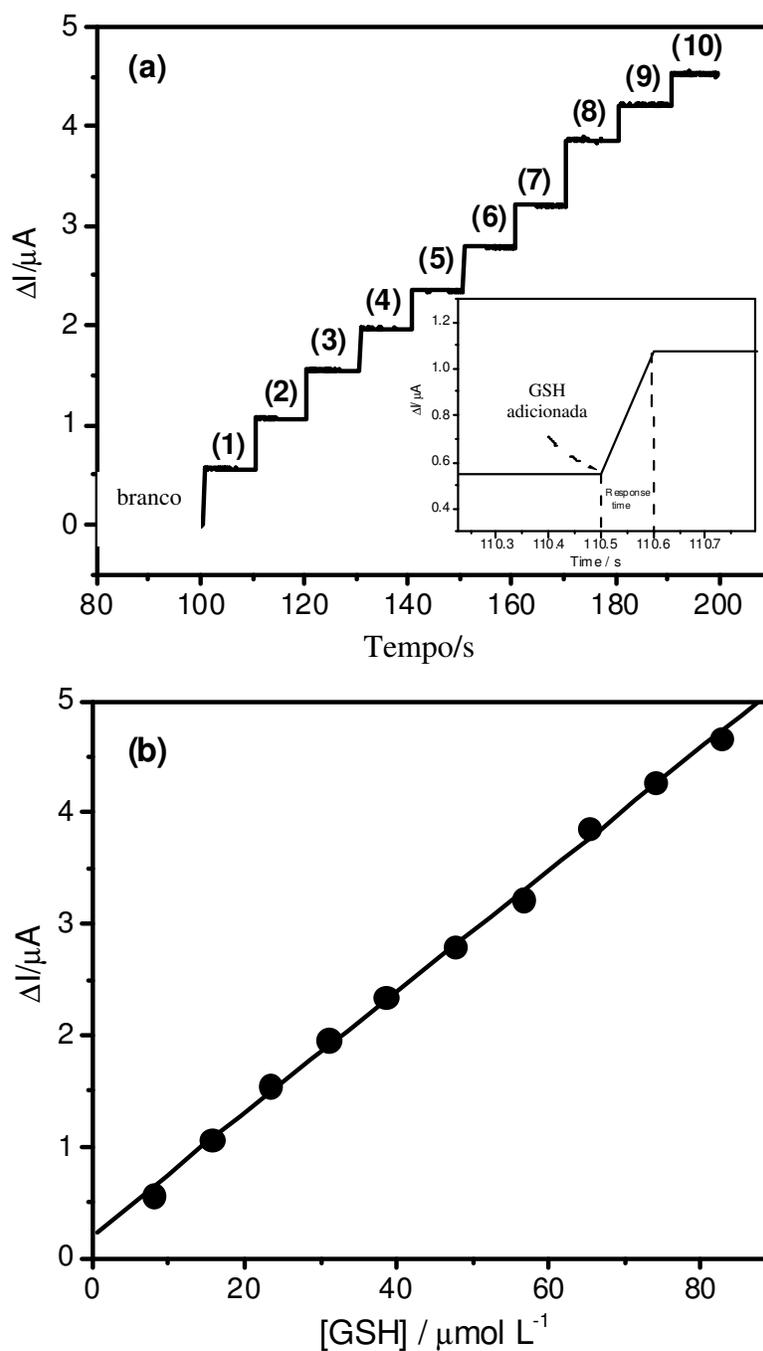
### **IV.3.3. Estudos de caracterização analítica do sensor para a *L*-GSH**

As características do EPC/4-NOFN/4-NHOHFN foram verificadas através de experimentos amperométricos. Nas medidas amperométricas, um estudo inicial foi realizado com intuito de determinar o melhor potencial para aplicar no eletrodo para a oxidação da *L*-GSH. Assim, o potencial aplicado foi escolhido baseado nas medidas das intensidades da corrente catalítica nas condições otimizadas e uma maior corrente foi verificada em um potencial aplicado de 0,4 V vs. Ag/AgCl.

Para obter uma curva analítica para o sensor desenvolvido, amperogramas para a oxidação de *L*-GSH foram realizados em diferentes concentrações em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH=7,0), após otimização dos parâmetros experimentais (Figura IV.16A). Assim, o sensor proposto mostrou uma faixa linear de resposta de 8,0 a 83,0 μmol L<sup>-1</sup> (Figura IV.16B), que pode ser expressa de acordo com Equação IV.12 seguinte:

$$\Delta I/\mu A = 0,210 (\pm 0,040) + 0,054 (\pm 0,001)[L\text{-GSH}]/\mu\text{mol L}^{-1} \quad (\text{Eq. IV.12})$$

com um coeficiente de correlação de 0,998 (para  $n = 10$ ) com sensibilidade e limite de detecção melhores em relação a vários trabalhos reportados recentemente na literatura (Tabela I.2).



**Figura IV.16.** (A) Medidas amperométricas para a eletrooxidação de L-GSH no EPC/4-NHOHFN/4-NOFN. Condições empregadas: solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0,  $E_{\text{aplicado}}=0,4 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  e [L-GSH]: (1)  $8,0 - (10)83,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ . (B) Curva analítica.

Assim, esta sensibilidade de  $54 \text{ nA L } \mu\text{mol}^{-1}$  pode ser atribuída a eficiência na transferência eletrônica entre o 4-NOFN e *L*-GSH. O limite de detecção (LD) de  $2,7 \mu\text{mol L}^{-1}$  foi determinado usando um razão  $3\sigma/b$  e o limite de quantificação (LQ) de  $8,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  usando  $10\sigma/b$ , sendo  $\sigma$  o D.P.R. do valor médio para dez amperogramas do branco e  $b$  o coeficiente angular da curva analítica, determinado de acordo com as recomendações da IUPAC (Analytical Methods Committee, 1987).

Além disso, como pode ser verificado a partir da inserção da Figura IV.16, o sensor apresentou um tempo de resposta rápido em torno de 0,1 s para a detecção de *L*-GSH. Este tempo de resposta é muito curto considerando que o eletrodo utilizado é feito a base de pasta de carbono, onde a difusão das espécies deve ser mais dificultada.

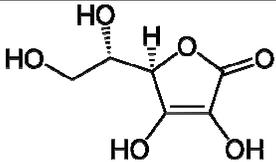
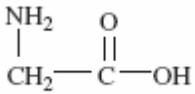
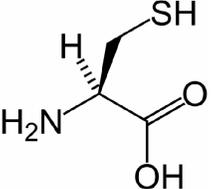
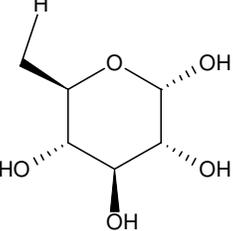
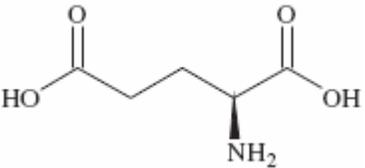
A Tabela I.2 lista alguns trabalhos reportados na literatura com o propósito de comparação envolvendo eletrodos quimicamente modificados com vários mediadores para a determinação de *L*-GSH. Assim, de acordo com a Tabela I.2, os potenciais de oxidação para a *L*-GSH são relativamente altos quando comparados com o do presente trabalho, o qual também apresenta melhores sensibilidade e limite de detecção em relação à alguns sensores reportados na Tabela I. 2. O aumento da sensibilidade pode ser atribuído a eficiência da transferência de elétrons entre o mediador e o grupo sulfidril da *L*-GSH como pode ser verificado na Tabela I. 2.

#### **IV.3.4. Estudos de interferentes da L-GSH**

Estudo de interferentes na resposta do eletrodo é útil para definir a preparação da amostra com o objetivo de minimizar seus efeitos. Neste trabalho, particularmente, os possíveis interferentes foram considerados compostos que estão estruturalmente relacionadas com a L-GSH e/ou presentes em amostras biológicas.

Para os estudos de interferentes, o sinal analítico para uma concentração de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  de L-GSH foi registrado e este foi comparado ao sinal analítico da mistura entre o L-GSH e os compostos interferentes na razão de 5:1. Esta proporção foi escolhida uma vez que estes interferentes não são encontrados em altas concentrações em extratos de levedura e sangue (Penninckx, 2000; Nalini & Narayanan, 1998). Os resultados podem ser observados na Tabela IV. 4. Estes resultados mostraram uma interferência significativa do L-AscH<sub>2</sub> e L-CySH no sinal obtido. Entretanto, a glicina, ácido glutâmico e glicose não apresentaram interferência sobre a resposta do eletrodo. Embora o L-AscH<sub>2</sub> e L-CySH apresentem interferência na proporção testada, não estão presente nas amostras de extratos de levedura ou são encontrados em um nível baixo no sangue. Além disso, a interferência de ascórbico ácido pode ser minimizada utilizando enzima ascorbato oxidase que apresenta alta seletividade para a oxidação de ácido ascórbico (Saari *et al.*, 1996; Fernandes *et al.*, 1999).

**Tabela IV.4.** Valores de Recuperação (%) obtidos para L-GSH  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  na presença de  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  dos compostos interferentes.

Estruturas dos interferentes	L-GSH <sub>ad.</sub> ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	L-GSH <sub>Enc.</sub> ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Recuperação (%)	
L-ácido ascórbico		50	$55,5 \pm 0,2$	$111 \pm 1$
Glicina		50	$49,3 \pm 0,1$	$99 \pm 1$
L-cisteína		50	$52,9 \pm 0,3$	$106 \pm 2$
D-(+)- Glicose		50	$50,6 \pm 0,3$	$101 \pm 1$
L-(+)- ácido glutâmico		50	$50,5 \pm 0,2$	$101 \pm 1$

#### IV.3.5. Estabilidade da resposta do sensor na presença de L-GSH

A estabilidade do EPC/4-NOFN/4-NHOHFN foi verificada na presença de L-GSH, por meio de voltamogramas cíclicos na faixa de potencial de -0,1 a 0,4 V vs. Ag/AgCl. Depois de 100 determinações nenhuma mudança

significativa foi observada nas respostas voltamétricas. Quando o eletrodo modificado foi estocado a seco e na temperatura ambiente, nenhuma mudança significativa foi observada por 1 mês. O eletrodo modificado apresentou uma boa repetibilidade para a determinação de *L*-GSH. O DPR para dez determinações de  $60 \mu\text{mol L}^{-1}$  de *L*-GSH foi 4,1 %. Adicionalmente, uma série de 10 sensores preparados da mesma maneira e testados em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH=7,0) contendo  $60,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de *L*-GSH, apresentaram respostas com DPR menor do que 5,0 %, indicando uma boa estabilidade e repetibilidade, provavelmente devido às interações  $\pi$ - $\pi$  e propriedades lipofílicas que devem favorecer a adsorção na matriz, levando a uma boa estabilidade em suas respostas voltamétricas.

#### **IV.3.6. Aplicação do sensor desenvolvido em amostras e testes de recuperação**

O sensor desenvolvido foi aplicado para a detecção e quantificação de *L*-GSH em amostras de extratos de levedura em triplicata (Tabela IV.5). As concentrações dos analitos foram determinadas usando o método de adição de padrão e os resultados foram comparados ao método espectrofotométrico usando o teste *t*-Student pareado para *L*-GSH, mostrando, portanto, que os resultados são estatisticamente os mesmos, no nível de confiança de 95%.

Assim, o sensor de pasta de carbono modificada com o 4-NO<sub>2</sub>FN, submetido a uma redução eletroquímica preliminar do grupo -NO<sub>2</sub>, demonstra ser sensível, estável, preciso e rápido para a determinação de *L*-GSH.

**Tabela IV.5.** Determinação de L-GSH em amostras de extrato de levedura em triplicata.

Amostras	Determinação de L-GSH	
	Método proposto (m/mg)	Método Comparativo (m/mg)
A	1,87 ( $\pm 0,03$ )	1,86 ( $\pm 0,01$ )
B	1,81 ( $\pm 0,01$ )	1,80 ( $\pm 0,08$ )
C	1,83 ( $\pm 0,03$ )	1,82 ( $\pm 0,05$ )

*m: massas obtidas em 1000 mg de amostra de extrato de levedura.*

Para uma checagem adicional da exatidão do método desenvolvido e do efeito de matriz, experimentos analíticos de recuperação foram feitos pela adição de quantidades conhecidas de um padrão de L-GSH em amostras de suplemento alimentar. A porcentagem de valores recuperados foi calculada pela comparação com aqueles encontrados nas amostras e as concentrações esperadas, de acordo com a Equação IV.10

Assim, as recuperações encontradas para as amostras são mostradas na Tabela IV.6 e a partir desta, verifica-se, portanto, que não há influência de matriz na resposta do sensor desenvolvido para as amostras avaliadas.

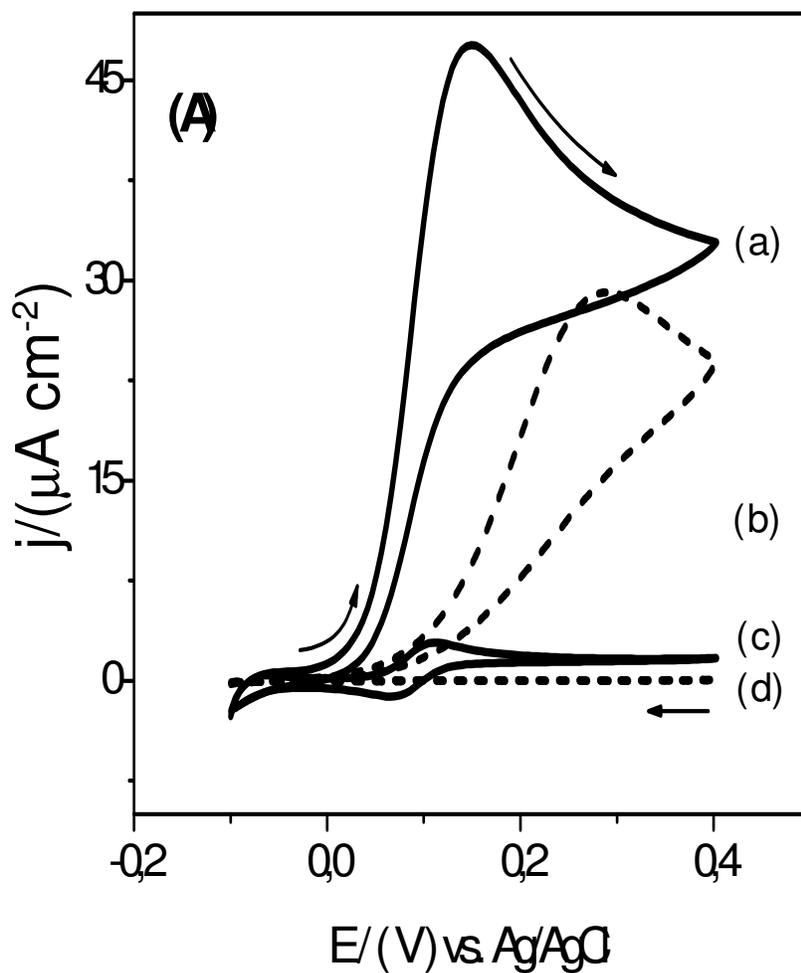
**Tabela IV.6.** Dados de recuperação de L-GSH em amostras de extrato de levedura ( $n=3$ ) obtidos com o sensor desenvolvido.

<b>Amostras</b>	<b>L-GSH<sub>ad.</sub></b> <b>(<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	<b>L-GSH<sub>esp.</sub></b> <b>(<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	<b>L-GSH<sub>encon.</sub></b> <b>(<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	<b>Recup.</b> <b>(%)</b>
<b>A</b>	0,0	-	8,35 ( $\pm 0,02$ )	
	8,50	16,85	16,82 ( $\pm 0,06$ )	99,8 ( $\pm 0,2$ )
<b>B</b>	0,0	-	8,08 ( $\pm 0,05$ )	
	8,50	16,58	16,50 ( $\pm 0,09$ )	99,5 ( $\pm 0,1$ )
<b>C</b>	0,0	-	8,17 ( $\pm 0,05$ )	
	8,50	16,67	16,70 ( $\pm 0,09$ )	100,2 ( $\pm 0,3$ )

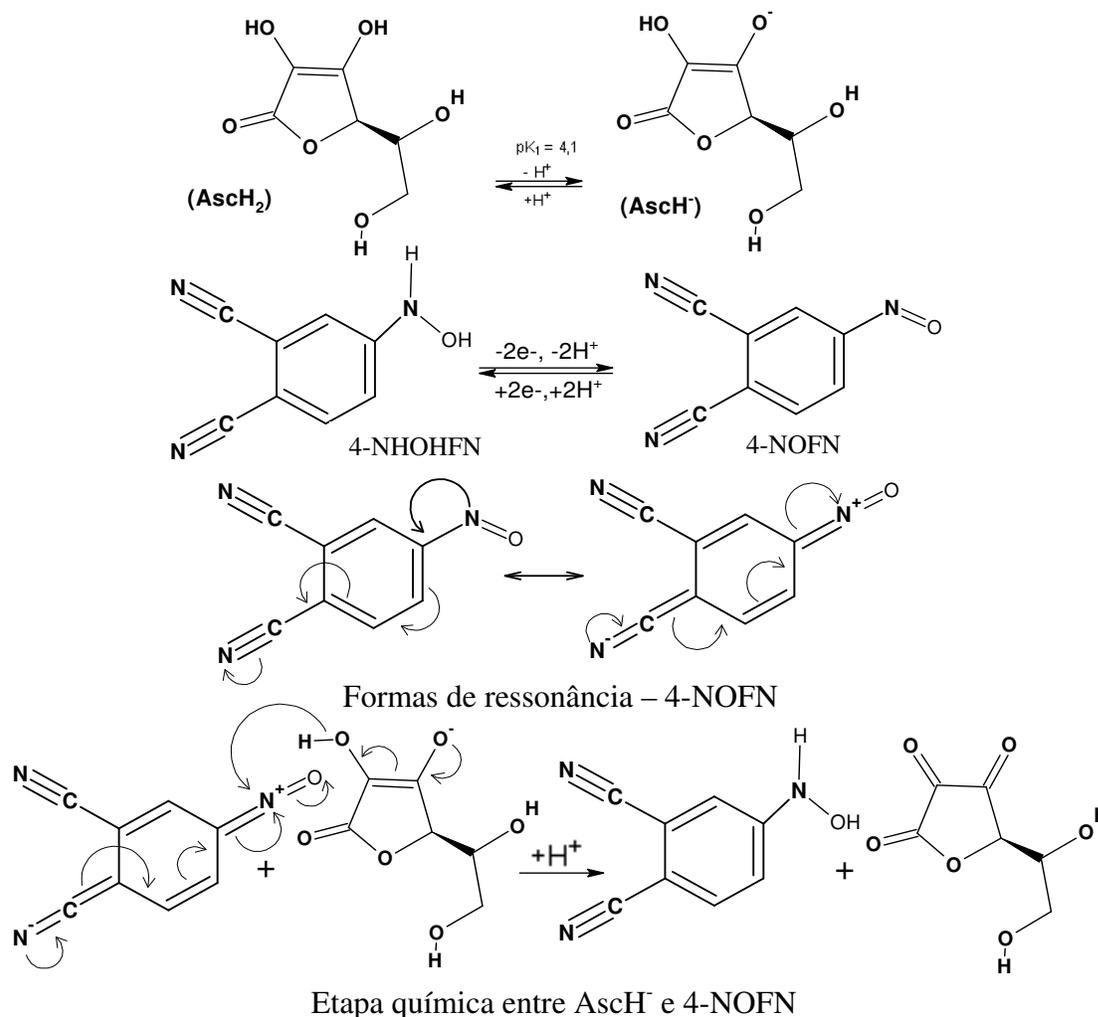
## IV.4. Sensor Amperométrico para *L*-AscH<sub>2</sub> e AU

### IV.4.1. A oxidação eletrocatalítica de *L*-AscH<sub>2</sub> pelo EPC/4-NOFN/4-NHOHFN

Após o procedimento de ativação *in situ* na superfície do eletrodo modificado como previamente descrito, o eletrodo modificado foi aplicado com intuito de testar a atividade eletrocatalítica do par redox 4-NOFN/4-NHOHFN para oxidação de *L*-AscH<sub>2</sub> e AU. Inicialmente, as respostas voltamétricas foram obtidas em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> e pH 7, na ausência e presença de *L*-AscH<sub>2</sub> 0,2 mmol L<sup>-1</sup> com  $E_{\text{inicial}} = -0,1$  V e  $E_{\lambda} = 0,4$  V, Figura IV.17. Na ausência de *L*-AscH<sub>2</sub>, um par redox de picos bem definidos de 4-NOFN/4-NHOHFN pode ser observado (Fig.IV.17c). Após adição de *L*-AscH<sub>2</sub> 0,2 mmol L<sup>-1</sup>, houve um aumento drástico da corrente de pico anódica, ao passo que nenhuma corrente catódica foi observada na varredura reversa (Fig. IV.17a). Este comportamento é consistente com um forte efeito eletrocatalítico. Além disso, sob as mesmas condições experimentais, a oxidação direta de *L*-AscH<sub>2</sub> no eletrodo de pasta de carbono não modificado foi observada, na forma de um pico irreversível em potenciais mais positivos (Fig. IV.17b). O potencial de pico catalítico é observado em 100 mV *versus* Ag/AgCl, enquanto o pico na ausência de efeito catalítico é de aproximadamente 300 mV. Assim, uma diminuição do sobrepotencial de aproximadamente 200 mV e um aumento da corrente de pico são alcançados com o eletrodo modificado, após o processo de ativação *in situ*. O mecanismo do processo eletrocatalítico é proposto como pode ser verificado na Figura IV.18.



**Figura IV.17.** Voltamogramas cíclicos para o EPC/4-NOFN/4-NHOHFN, na presença (a) e na ausência (c) de  $L\text{-AscH}_2$   $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ ; Eletrodo de pasta de carbono não modificado na ausência (d) e na presença (b) de  $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $L\text{-AscH}_2$ . Velocidade de varredura ( $v$ ):  $2,0 \text{ mV s}^{-1}$ . Estudos realizados em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , em pH 7,0.



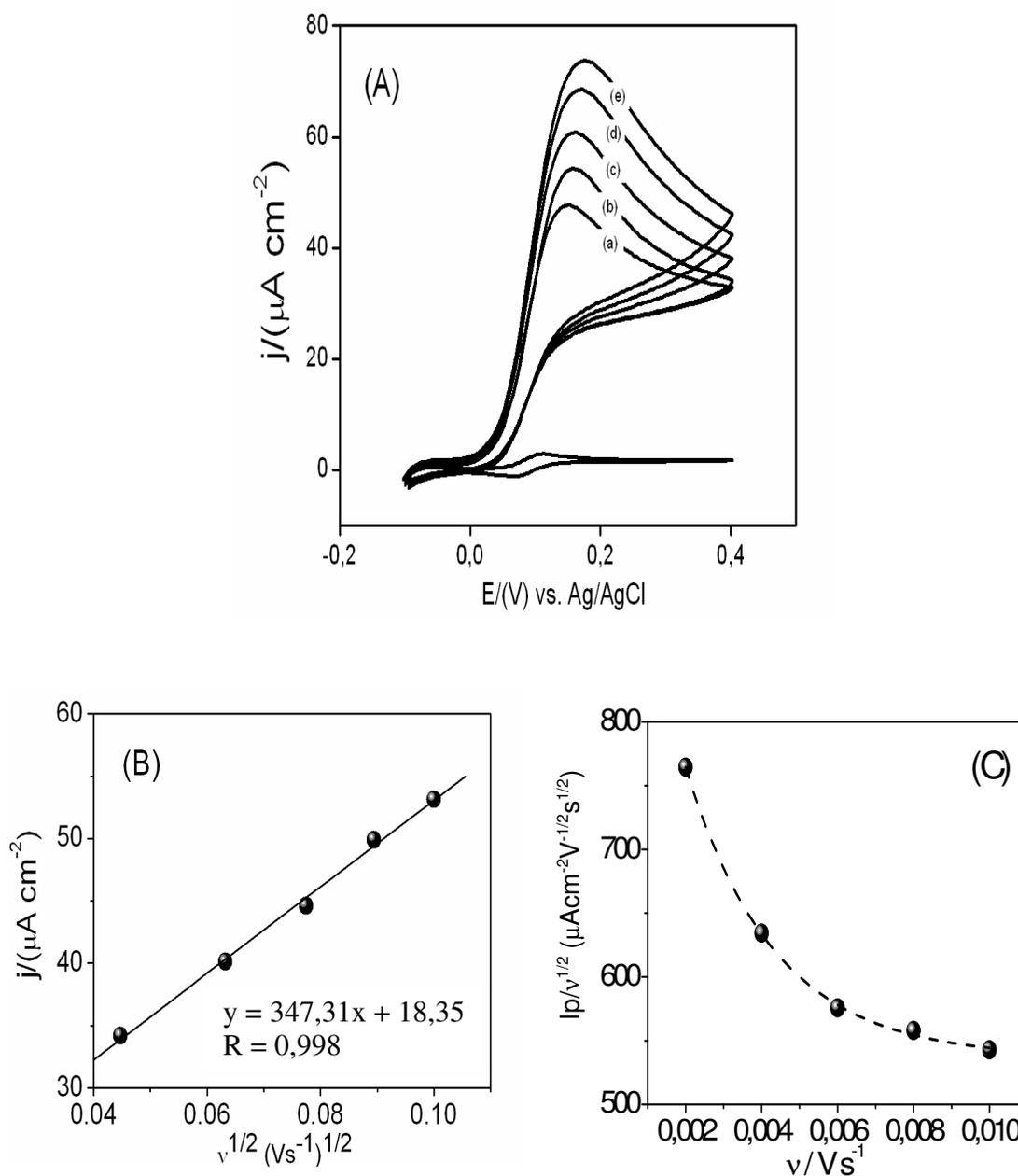
**Figura IV.18.** Mecanismo proposto para a reação entre o eletrodo modificado com a 4-NOFN/4-NHOHFN e L-AscH<sub>2</sub>.

Estudos mais detalhados a respeito da corrente de pico de oxidação do L-AscH<sub>2</sub> na superfície do eletrodo de pasta de carbono modificada com o 4-nitroftalonitrila ativada foram realizados, inicialmente, por voltametria cíclica em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH=7,0). A Figura IV.19 exibe os voltamogramas cíclicos de uma solução de L-AscH<sub>2</sub> em diferentes velocidades de varredura.

Como observado na Figura IV. 19A, 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 *L*-AscH<sub>2</sub>. Por outro lado, um gráfico da densidade de corrente catalítica  $j_p$  versus a raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial ( $v^{1/2}$ ) na faixa de velocidade de 2 a 10 mV s<sup>-1</sup> foi construído e resultou numa dependência linear (Fig. IV. 19B), expressa pela Eq. IV.13 seguinte:

$$j(\mu\text{A cm}^{-2}) = 18,35 + 347,31 v^{1/2} (\text{V s}^{-1})^{1/2} \quad \text{Eq. IV.13}$$

Assim, esta dependência linear sugere que o processo seja controlado por difusão na faixa de velocidade de varredura de potencial estudado. Para ratificar que o processo de oxidação eletrocatalítica entre o *L*-AscH<sub>2</sub> e a pasta de carbono modificada com o 4-nitroftalonitrila ativada de fato apresenta uma etapa química acoplada, foram realizados alguns ensaios. A análise do gráfico da densidade de corrente de pico normalizada com a raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial ( $j_p/v^{1/2}$ ) versus a velocidade de varredura de potencial (Fig. IV. 19C) permite observar um perfil característico de um típico processo eletroquímico-químico catalítico ( $EC_{\text{cat}}$ ) (Bard & Faulkner, 2001), corroborando, portanto, com o mecanismo proposto.



**Figura IV.19.** (A) Voltamogramas cíclicos para o EPC/4-NOFN/4-NHOHFN em várias velocidades de varredura ( $v$ ): (a) 2, (b) 4, (c) 6, (d) 8 e (e) 10  $\text{mV s}^{-1}$ , (B) gráfico de  $j_p$  vs.  $v^{1/2}$  e (C) variação de  $j_p/v^{1/2}$  vs.  $v$ . Todos os estudos foram realizados em solução tampão fosfato 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  em pH 7,0 e  $[\text{L-AscH}_2] = 0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ .

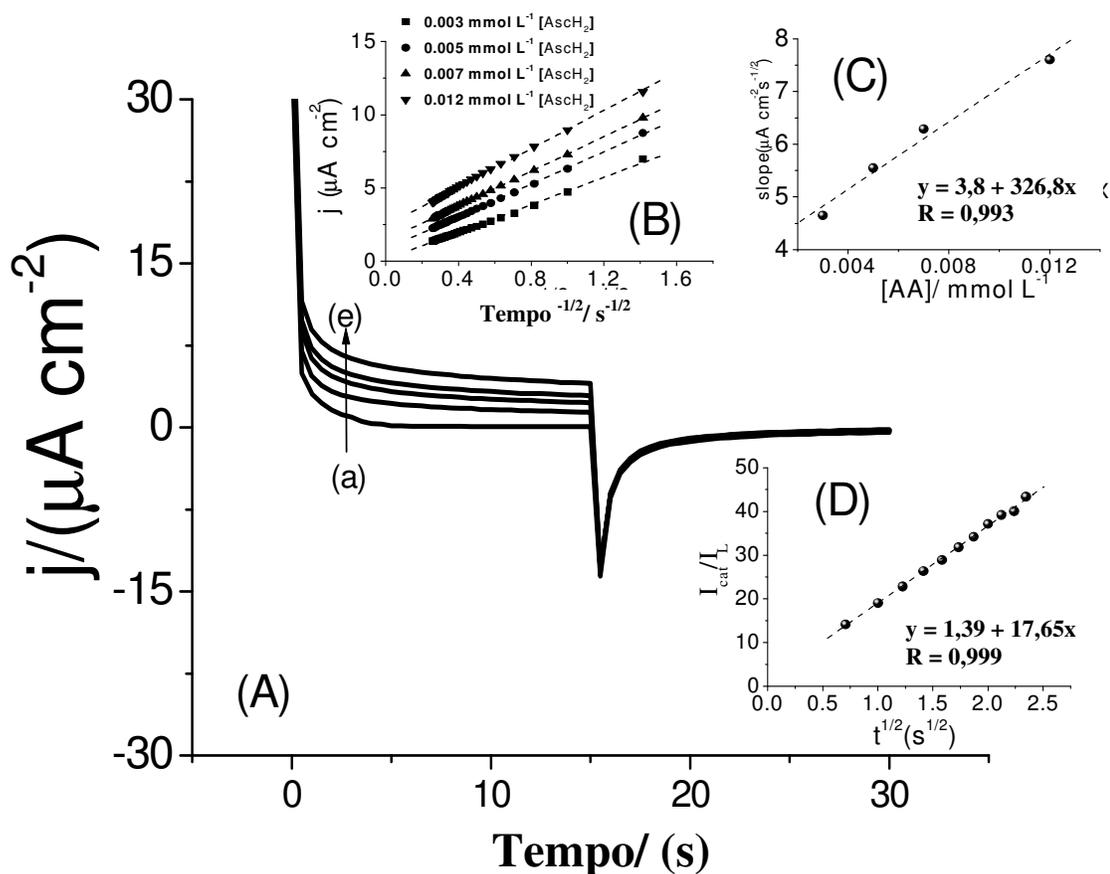
Como já mencionado, o substituinte nitro na ftalonitrila pode ser transformado totalmente no grupo hidroxilamina que, na varredura reversa, pode ser oxidada ao grupo nitroso por um processo de dois elétrons e dois prótons. Para o composto nitrosoftalonitrila, neste caso, a rota via hidreto deve ser a preferida devido à presença da carga positiva parcial no nitrogênio do grupo NO, devido à deslocalização eletrônica (Fig. IV.18). A rota via hidreto foi reportada anteriormente por Siskos & colaboradores de forma similar, onde o *L*-AscH<sub>2</sub> atua também como doador de hidreto (Loannou & Siskos, 2001).

#### **IV.4.2. Estudos Cronoamperométricos**

A cronoamperometria de duplo salto de potencial e outros métodos eletroquímicos foram empregados para a investigação de processos eletroquímicos. A Figura IV.20 mostra as curvas corrente-tempo de 4-NOFN/4-NHOHFN obtidas com  $E_{\text{inicial}} = 100$  mV e  $E_{\text{final}} = 50$  mV *versus* Ag/AgCl para várias concentrações de *L*-AscH<sub>2</sub>. Como pode ser verificado, não há corrente catódica líquida correspondente à redução do mediador na presença de *L*-AscH<sub>2</sub>.

Além disso, os cronoamperogramas de duplo salto de potencial direto e reverso para o mediador na ausência de *L*-AscH<sub>2</sub> mostraram-se simétricos com um consumo de carga igual para redução e oxidação do sistema redox 4-NOFN/4-NHOH na superfície do eletrodo de pasta de carbono (Fig. IV.20A(a)). Por outro lado, na presença de diferentes concentrações de *L*-AscH<sub>2</sub>, os valores de corrente anódica associada com os amperogramas diretos são significativamente maiores do que aqueles observados para o processo

reverso (Fig. IV.20A(b-e)), indicando que o grupo nitroso está sendo consumido pela etapa química como observado na Figura IV.18.



**Figura IV.20.** (A) Cronoamperogramas obtidos no EPC/4-NOFN/4-NHOHFN em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7 na ausência (a) e presença de 3,0 (b); 5,0 (c); 7,0 (d) e 12,0 (e)  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de L-AscH<sub>2</sub>,  $E_{\text{inicial}} = 0,10$  e  $E_{\text{final}} = 0,05$  vs. Ag/AgCl, respectivamente. (B) gráfico de  $j$  vs.  $t^{-1/2}$  obtidos a partir dos cronoamperogramas. (C) gráfico da inclinação da linha reta contra a concentração de L-AscH<sub>2</sub> e (D) dependência de  $I_{\text{cat}}/I_L$  vs.  $t^{1/2}$  derivado dos dados dos cronoamperogramas de (a) e (e) no painel principal.

A cronoamperometria foi usada para estimar o coeficiente de difusão do  $L$ -AscH<sub>2</sub> em solução. Para um material eletroativo com coeficiente de difusão,  $D$ , a corrente correspondente à reação química (sob controle difusional) é descrita pela equação de Cottrell (Bard & Faulkner, 2001):

$$j = nFD^{1/2}C_s\pi^{-1/2}t^{-1/2} \quad (\text{Eq. IV.14})$$

sendo  $D$  e  $C_s$  o coeficiente de difusão ( $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ) e a concentração no seio da solução do  $L$ -AscH<sub>2</sub> ( $\text{mol cm}^{-3}$ ), respectivamente. A Figura IV.20B mostra os gráficos de  $j$  versus  $t^{1/2}$  com o melhor ajuste linear para diferentes concentrações de  $L$ -AscH<sub>2</sub>, o qual indica que a corrente observada deve ser controlada pela difusão de  $L$ -AscH<sub>2</sub> em solução.

Um gráfico a partir dos declives obtidos das linhas retas versus a concentração de  $L$ -AscH<sub>2</sub> foi construído (Fig. IV.20C). A partir do declive da Figura IV.20C e usando a equação de Cottrell (Eq.IV 14), um coeficiente de difusão de  $9,01 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  para o  $L$ -AscH<sub>2</sub> foi obtido. Este valor está próximo aos valores reportados na literatura (Moreno *et al.*, 2000).

Além disso, a constante de velocidade,  $\kappa_{\text{obs}}$ , para a reação química entre o  $L$ -AscH<sub>2</sub> e os sítios redox confinados na superfície do eletrodo modificado pode ser avaliado pela cronoamperometria com base no método descrito na literatura (Galus, 1976):

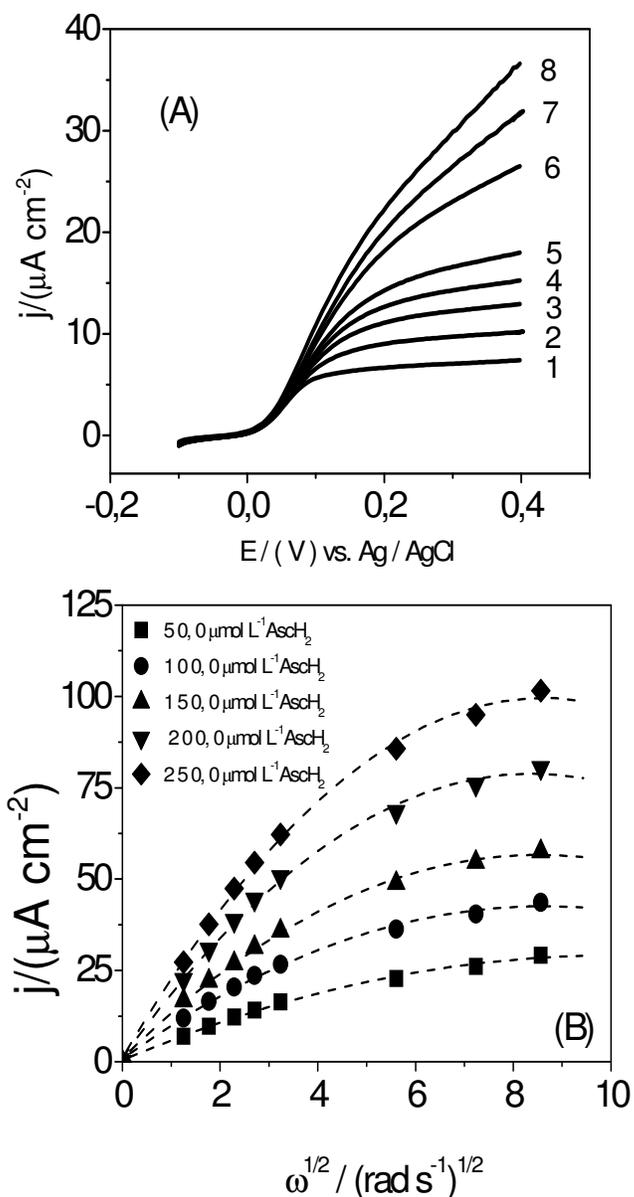
$$I_{\text{cat}}/I_L = \gamma^{1/2}\pi^{1/2} = \pi^{1/2}(\kappa_{\text{obs}}C_s t)^{1/2} \quad (\text{Eq.IV 15})$$

A partir do declive do gráfico  $I_{\text{cat}}/I_L$  versus  $t^{1/2}$  podemos calcular de forma simples o valor de  $k_{\text{obs}}$  para uma dada concentração do  $L$ -AscH<sub>2</sub>. A Figura

IV.20D mostra o gráfico, construído a partir dos cronoamperogramas do EPC/4-NOFN/4-NHOHF, na ausência e presença de *L*-AscH<sub>2</sub> 12 μmol L<sup>-1</sup>. O valor médio para  $k_{obs}$  na faixa de concentração 3-12 μmol L<sup>-1</sup> foi obtido e apresentou um valor de  $6,0 \times 10^6$  L mol<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> (ou  $k\Gamma = 3,8$  cm s<sup>-1</sup>).

### **IV.4.3. Estudos com Eletrodo de Disco Rotatório**

Para uma melhor avaliação quantitativa do comportamento eletrocatalítico da oxidação de *L*-AscH<sub>2</sub> no EPC/4-NOFN/4-NHOH em relação, medidas cinéticas foram realizadas em diferentes concentrações de *L*-AscH<sub>2</sub> em diferentes velocidades de rotação  $\omega$  (rad s<sup>-1</sup>) em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH =7) e uma velocidade de varredura fixa de 2 mV s<sup>-1</sup> (Fig. IV.21).



**Figura IV.21.** (A) Curvas de polarização obtidas para oxidação electrocatalítica de  $L\text{-Asch}_2$  no EPC/4-NOFN/4-NHOHFN. Velocidade de rotação: (1) 1,57; (2) 3,14; (3) 5,23; (4) 7,33; (5) 10,47; (6) 31,41; (7) 52,35 e (8) 73,29  $\text{rad s}^{-1}$ .  $v = 2,0 \text{ mVs}^{-1}$ . (B) Gráfico de Levich para a resposta electrocatalítica de estado-estacionário para um EDR de EPC/4-NOFN/4-NHOHFN em diferentes  $[L\text{-Asch}_2]$ . Estudos realizados em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em pH 7,0 e  $\Gamma = 6,5 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ .

A Figura IV.21B mostra os gráficos de Levich obtidos para EPC/4-NOFN/4-NHOHFN para cinco diferentes concentrações de *L*-AscH<sub>2</sub>, 50, 100, 150, 200 e 250 μmol L<sup>-1</sup>, tampão fosfato (0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0). A corrente de oxidação para o *L*-AscH<sub>2</sub> no eletrodo modificado pode ser limitada pelo transporte de massa do *L*-AscH<sub>2</sub> para a superfície do eletrodo e/ou pela cinética da reação.

A partir da Figura IV.21B, fica evidente que há limitação cinética na reação global. Para o eletrodo de disco rotatório, a corrente limitada pelo transporte de massa ( $I_{d(L)}$ ) depende da velocidade de rotação,  $\omega$ , e da concentração de *L*-AscH<sub>2</sub> no seio da solução [*L*-AscH<sub>2</sub>]\*, de acordo com a equação de Levich (Bard & Faulkner, 2001) (Eq.IV.16):

$$I_{d(L)} = 0,620nFA[L - AscH_2] * D^{2/3} \nu^{-1/6} \omega^{1/2} \quad (\text{Eq.IV.16})$$

sendo  $n$  o número de elétrons,  $F$  a constante de Faraday,  $\nu$  a viscosidade cinemática, e  $D$  o coeficiente de difusão. Os valores de  $D$  e  $\nu$  de  $9,01 \times 10^{-6}$  cm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>, obtido nos estudos cronoamperométricos e discutidos anteriormente e 0,01 cm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> (Moreno *et al.*, 2000), respectivamente, foram empregados.

Para uma reação eletrocatalítica, a corrente limitada cineticamente ( $I_{kin}$ ) é dada geralmente pela seguinte expressão (Eq. IV.17):

$$I_{kin} = nFA\kappa \Gamma^* [L - AscH_2]^* \quad \text{Eq. IV.17}$$

sendo  $\Gamma^*$  a cobertura total do 4-NOFN/4-NHOHFN. Uma dependência linear da corrente catalítica na  $\omega^{1/2}$  é esperada a partir da equação de Levich. O desvio observado a partir da equação de Levich (Figura IV. 21B) pode ser o

resultado da etapa limitada quimicamente. Assim, a expressão geral para a corrente global,  $I$ , é dada por (Eq. IV.18):

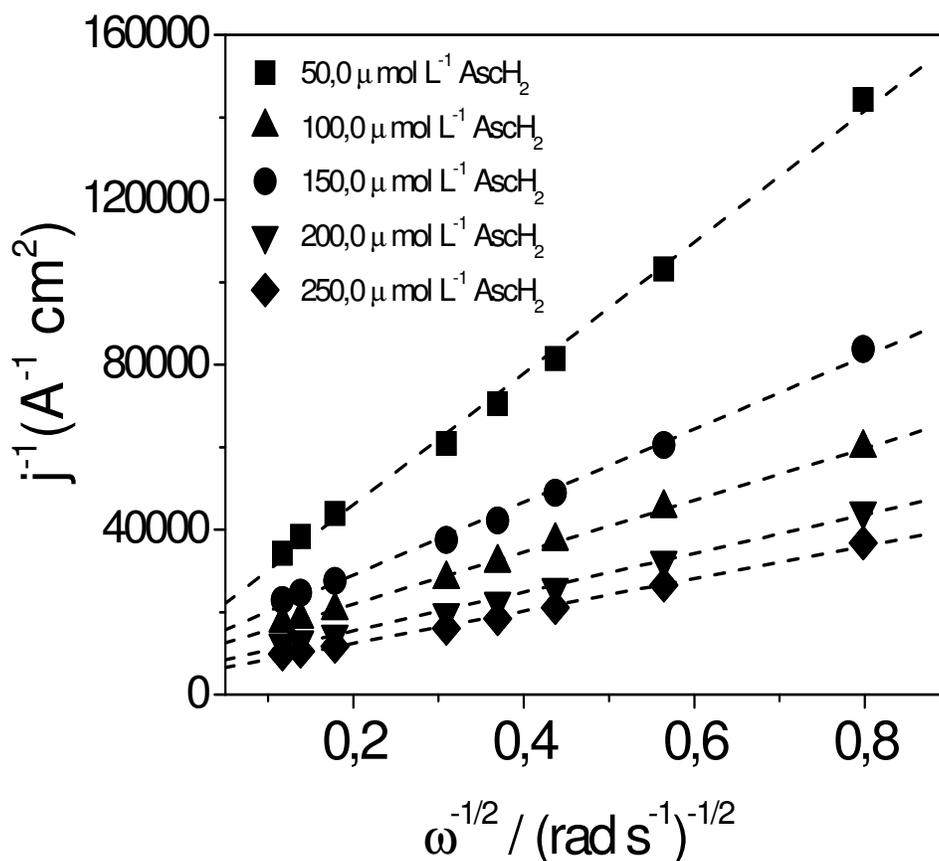
$$I^{-1} = I_{d(L)}^{-1} + I_{Kin}^{-1} \quad (\text{Eq. IV.18})$$

Fazendo a inversão da Eq. IV.18, tem-se a conhecida Equação IV.19 de Koutecky-Levich, muito utilizada em reações catalíticas empregando eletrodos contendo mediadores de elétrons. Esta equação foi empregada na obtenção da Figura IV.22, variando a concentração de  $[L\text{-AscH}_2]^*$ :

$$\frac{1}{I} = \frac{1}{nFA\kappa_{obs}\Gamma^*[L\text{-AscH}_2]^*} + \frac{1}{0,620nFA\nu^{-1/6}D^{2/3}[L\text{-AscH}_2]^*\omega^{1/2}} \quad (\text{Eq. IV.19})$$

Pela inclinação da curva, é possível obter o número de elétrons ( $n$ ) envolvidos na reação, o qual apresentou um valor próximo a dois elétrons, corroborando com alguns trabalhos reportados na literatura também baseados na oxidação catalítica de  $L\text{-AscH}_2$  (Moreno *et al.*, 2000; Galus, 1976).

Através do intercepto do gráfico de Koutecky-Levich é possível também avaliar a constante de velocidade da reação catalítica,  $\kappa_{obs}$ , conhecendo-se então o valor de  $\Gamma$  (Figura IV.22C), o qual apresentou um valor médio de  $5,5 \times 10^6 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (ou  $k_{obs}\Gamma = 3,5 \text{ cm s}^{-1}$ ) na faixa de concentração de 0,05-0,25 mmol  $\text{L}^{-1}$  de  $L\text{-AscH}_2$ . Este valor está próximo ao obtido pelos dados cronoamperométricos ( $6,0 \times 10^6 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ou  $k_{obs}\Gamma = 3,8 \text{ cm s}^{-1}$ ), os quais são maiores quando comparados aos valores reportados na literatura por outros sistemas eletrodo-mediador (Moreno *et al.*, 2000)



**Figura IV.22.** Gráficos de Koutecky-Levich dos dados experimentais mostrados na Figura IV.21 B. Estudos realizados em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em pH 7,0 e  $\Gamma = 6,5 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ .

#### IV.4.4. Comportamento Eletroquímico do *L*-AscH<sub>2</sub> na presença de AU no EPC/4-NOFN/4-NHOHFN

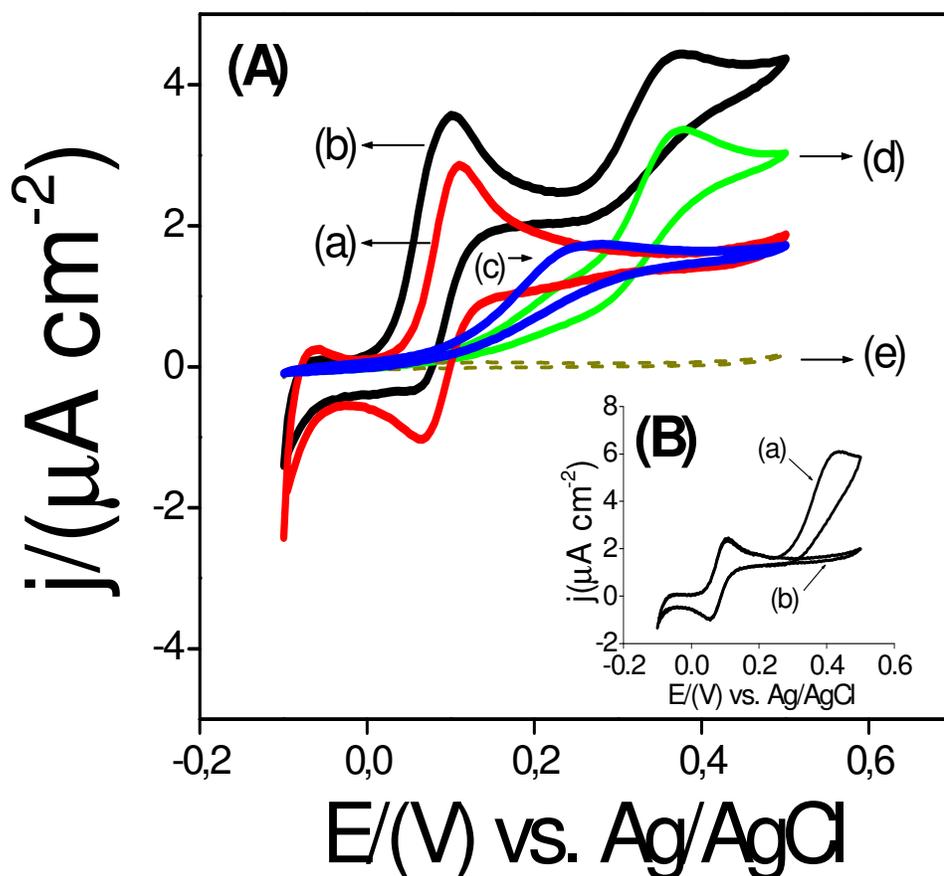
Um dos objetivos principais destes estudos foi o desenvolvimento de um eletrodo modificado capaz de realizar a oxidação electrocatalítica de *L*-AscH<sub>2</sub> e permitir a separação das respostas electroquímicas de *L*-AscH<sub>2</sub> e AU.

Assim, com intuito de verificar a atividade catalítica do EPC/4-NOFN/4-NHOHFN na presença de *L*-AscH<sub>2</sub> e AU, alguns ensaios foram realizados.

A Figura IV.23A mostra os voltamogramas cíclicos para o EPC/4-NOFN/4-NHOHFN em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7, usando uma varredura no sentido anódico, com  $E_{\text{inicial}} = -0,1 \text{ V}$  and  $E_{\lambda} = 0,5 \text{ V}$  versus Ag/AgCl, na ausência e presença de *L*-AscH<sub>2</sub> e AU. Para efetuar uma análise comparativa, voltamogramas cíclicos obtidos no eletrodo não modificado na presença e ausência de *L*-AscH<sub>2</sub> e AU são também apresentados. Nestes voltamogramas (Fig. IV.23c), há uma corrente de pico, indicando que a oxidação direta de *L*-AscH<sub>2</sub> está presente nesta faixa de potencial ( $E_{\text{pa}} = 0,3 \text{ V}$  vs. Ag/AgCl).

É conhecido que a oxidação eletroquímica direta de AU e *L*-AscH<sub>2</sub> nos eletrodos convencionais requer altos sobrepotenciais e os potenciais de oxidação são também próximos. Como observado na Figura IV.23d, há um pico voltamétrico sobreposto para oxidação eletroquímica da mistura de AU e *L*-AscH<sub>2</sub> no eletrodo não modificado em 0,37 V versus Ag/AgCl; os potenciais de pico para o *L*-AscH<sub>2</sub> e AU foram indistinguíveis, com obtenção de informações não conclusivas.

Por outro lado, na presença do sistema redox I<sub>a</sub>/I<sub>c</sub>, relativo ao par redox 4-NOFN/4-NHOHFN, a resposta voltamétrica sobreposta pode ser resolvida, a qual apresentou dois picos bem definidos em 0,1 e 0,4 versus Ag/AgCl (Fig. IV.24b), correspondentes à oxidação eletroquímica de *L*-AscH<sub>2</sub> (pico II<sub>a</sub>) e AU (pico III<sub>a</sub>), respectivamente.



**Figura IV.23.** (A) Voltamogramas cíclicos para um EPC/4-NOFN/4-NHOHFN, na ausência (a) e presença (b) de  $L\text{-AscH}_2$  e AU  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Eletrodo de pasta de carbono não modificada na presença de  $L\text{-AscH}_2$  (c),  $L\text{-AscH}_2$  e AU (d) de  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente, e ausência (e) de  $L\text{-AscH}_2$  e/ou  $L\text{-AscH}_2$  e AU, em solução tampão fosfato em pH 7.  $\nu = 2 \text{ mV s}^{-1}$ . (B) Voltamogramas cíclicos para um eletrodo de pasta de carbono modificado com 4-nitroftalonitrila ativada, na presença (a) e ausência (b) de AU  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

A diferença entre os potenciais de picos é de 280 mV *versus* Ag/AgCl, a qual é suficientemente larga para a determinação seletiva e simultânea de AU e *L*-AscH<sub>2</sub>, em uma mistura binária.

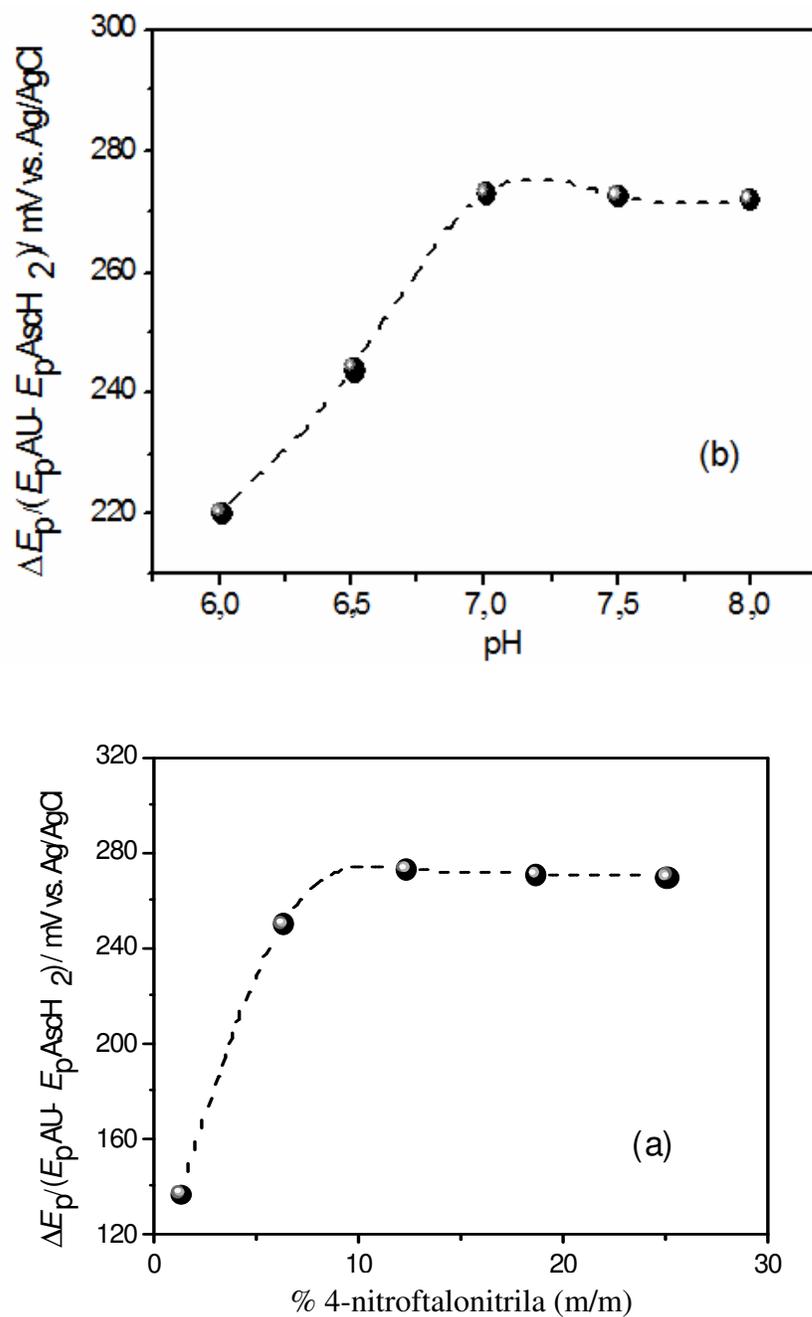
Além disso, com intuito de confirmar a atividade eletrocatalítica do sensor para o *L*-AscH<sub>2</sub>, alguns ensaios foram realizados na presença de AU. Assim, a Figura IV. 23B mostra os voltamogramas cíclicos para um EPC/4-NOFN/4-NHOHFN em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH=7, usando uma varredura no sentido anódico, com  $E_{inicial} = -0,1$  V e  $E_{\lambda} = 0,5$  V *versus* Ag/AgCl, na ausência e presença de AU.

Após adição de AU 50 μmol L<sup>-1</sup>, um pico de oxidação não catalítico foi observado em 400 mV *versus* Ag/AgCl. Entretanto, não houve aumento da corrente de pico anódica do mediador (4-NOFN), bem como sua corrente catódica também foi observada na varredura reversa. Assim, é possível verificar que o eletrodo modificado e ativado não apresenta atividade eletrocatalítica para oxidação de AU, indicando que a transferência de elétrons de uma espécie não interfere na resposta da outra, possibilitando, portanto, seu emprego para determinação simultânea de *L*-AscH<sub>2</sub> e AU.

#### **IV.4.5. Efeito da quantidade do mediador, pH, tipo de tampão e concentração de tampão na Resposta do Sensor**

Alguns ensaios foram realizados com intuito de determinar a quantidade ótima do mediador, pH, natureza e concentração do tampão para obter a melhor resolução de pico anódico ( $\Delta E_{p,a}$ ) para determinação simultânea de *L*-AscH<sub>2</sub> e AU. Nestes estudos, a influência da proporção entre a 4-nitroftalonitrila e o pó de grafite usados no preparo do eletrodo de pasta de

carbono modificado foram investigadas com % de mediador de 1,25%; 6,25%; 12,25%; 18,62% e 25% (m/m), em solução tampão fosfato (pH 7) contendo *L*-AscH<sub>2</sub> e AU 50 μmol L<sup>-1</sup>. Os resultados indicaram que a o melhor  $\Delta E_{p,a}$  foi obtido, usando uma proporção de 1:7 (m/m) ( $\Delta E_{p,a}$ = 280 mV vs. Ag/AgCl) e, portanto, esta foi escolhida para os experimentos seguintes (Fig. IV.24a). Nas proporções maiores de que 1:7, não foi obtida uma boa homogeneização da pasta de carbono, e para menores proporções, obteve-se menor  $\Delta E_{p,a}$ .



**Figura IV.24.** Influência da % (m/m) de 4-nitroftalonitrila (a) e pH no  $\Delta E_p$  (b). Medidas realizadas na presença de L-AscdH<sub>2</sub> e AU 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em solução tampão fosfato 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  em pH 7,0.

A influência da solução tampão no  $\Delta E_{p,a}$  foi estudada na presença de *L*-AscH<sub>2</sub> e AU (50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , cada) usando tampão fosfato 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  em pH 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 e 8,0 (Fig. IV.24a). No pH 7,0, o  $\Delta E_{p,a}$  apresenta um máximo de 280 mV. Além disso, a atividade eletrocatalítica do EPC/4-NOFN/4-NHOHFN para detecção de *L*-AscH<sub>2</sub> e AU não depende somente do pH, mas também da solução tampão e sua concentração, que pode mudar a atividade e estabilidade do sensor.

Assim, a influência da solução tampão na resposta do sensor foi testada em quatro diferentes soluções tampão (HEPES, PIPES, MacIlvaine, TRIS e fosfato) com concentrações de 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  em pH 7,0, indicando que a solução tampão fosfato apresentou o melhor  $\Delta E_{p,a}$ , provavelmente devido a facilidade dos ânions fosfato difundir através da pasta de carbono em comparação aos íons dos tampões HEPES, PIPES, MacIlvaine e TRIS.

A solução tampão fosfato foi escolhida. As medidas foram realizadas em diferentes concentrações de fosfato (0,025, 0,05, 0,10, 0,20 e 0,25  $\text{mol L}^{-1}$ ). As concentrações do tampão fosfato de 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  apresentou melhor  $\Delta E_{p,a}$ . Neste sentido, a concentração de 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  foi selecionada para o estudos seguintes.

#### **IV.4.6. Caracterização Analítica**

Com intuito de obter uma curva analítica para o sensor desenvolvido frente à determinação simultânea de *L*-AscH<sub>2</sub> e AU, alguns ensaios foram realizados. Assim, a detecção amperométrica de potencial pulsado foi usada para este propósito. O método é baseado na aplicação de vários degraus de

potencial-tempo que gerencia o processo analítico sequencial como reportado anteriormente (Kilbey *et al.*, 2006).

A oxidação simultânea de *L*-AscH<sub>2</sub> e AU foi realizada em  $E_1 = 0,15$  V e  $E_2=0,40$  V *versus* Ag/AgCl, respectivamente (em  $E_1 = 0,150$ V há oxidação de *L*-AscH<sub>2</sub>). Por outro lado, em  $E_2=0,40$  V ocorre oxidação tanto de *L*-AscH<sub>2</sub> quanto de AU. Por esta razão, para obter o amperograma líquido ou curva analítica, em outras palavras, sem a contribuição da corrente de oxidação de *L*-AscH<sub>2</sub>, é necessário subtrair a corrente dos amperogramas entre  $E_2$  e  $E_1$ , em diferentes concentrações, após otimização dos parâmetros experimentais (Fig. IV.25a e b para *L*-AscH<sub>2</sub> e AU, respectivamente).

O sensor proposto mostrou uma faixa linear de resposta de 5 a 120  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (insert da Fig. IV.25a,b) para *L*-AscH<sub>2</sub> e AU, a qual pode ser expressa de acordo com as Equações IV.20 e IV.21 seguinte:

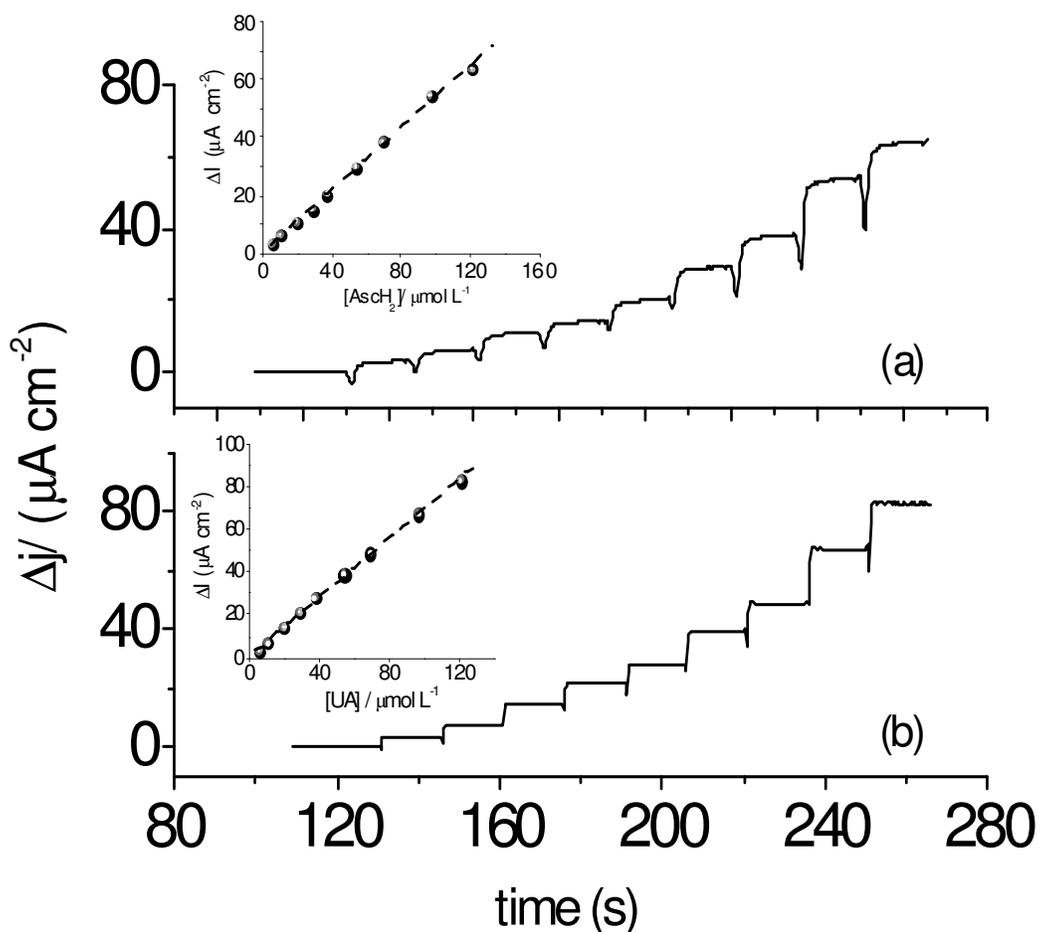
$$\Delta j (\mu\text{A cm}^{-2}) = 0,3(\pm 0,4) + 540(\pm 3) [L\text{-AscH}_2] / \text{mmol L}^{-1} \quad (\text{Eq.IV.20})$$

$$\Delta j (\mu\text{A cm}^{-2}) = 1,7(\pm 2,1) + 680(\pm 2) [UA] / \text{mmol L}^{-1} \quad (\text{Eq.IV.21})$$

Com um coeficiente de correlação de 0,998 (para n=9) e 0,999 (para n=9) para *L*-AscH<sub>2</sub> e AU, respectivamente, com melhor sensibilidade e limites de detecção do que aqueles reportados na literatura (Tabela I.3). A boa sensibilidade de  $540 \mu\text{A cm}^{-2} \text{ L mmol}^{-1}$  pode ser atribuída à eficiência da transferência de elétrons entre o Ar-NO e *L*-AscH<sub>2</sub>.

Limites de detecção (LD) de  $1,6 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $1,3 \mu\text{mol L}^{-1}$  para *L*-AscH<sub>2</sub> e AU foram determinados, usando uma razão  $3\sigma/b$ , respectivamente, e limites

de quantificação foram  $5,5 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $4,5 \mu\text{mol L}^{-1}$  para o *L*-AscH<sub>2</sub> e AU, respectivamente, usando uma razão  $10\sigma/b$ , sendo  $\sigma$  o desvio padrão do valor médio para dez amperogramas do branco, determinado de acordo com as recomendações da IUPAC (Analytical Methods Committee, 1987).



**Figura IV.25.** Medidas amperométricas combinadas com potencial pulsado para determinação simultânea de L-AscH<sub>2</sub> e AU em  $E_1 = 0,150$  V (a) e  $E_2 = 0,400$  V (b) vs. Ag/AgCl, respectivamente, no EPC/4-NOFN/4-NHOHFN obtida em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em pH 7,0. Inserção: curva analítica.

#### IV.4.7. Estabilidade do EPC/4-NOFN/4-NHOHFN

Após o processo de ativação *in situ* do eletrodo modificado, a estabilidade do par redox 4-NOFN/4-NHOHPH foi checada por meio de amperogramas sucessivos na presença de  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  *L*-AscH<sub>2</sub> e AU em  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em pH 7,0.

Após 100 determinações, nenhuma mudança significativa foi observada nas respostas amperométricas do sensor desenvolvido. Quando o eletrodo modificado foi estocado a seco e à temperatura ambiente, nenhuma mudança significativa foi observada, por um mês. O eletrodo modificado apresentou uma boa repetibilidade para determinação de *L*-AscH<sub>2</sub> e AU.

Além disso, o desvio padrão relativo para dez determinações de *L*-AscH<sub>2</sub> e AU  $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  foi 4,5%. Adicionalmente uma série de 10 sensores preparados da mesma maneira e testados em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH = 7,0) contendo  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de *L*-AscH<sub>2</sub> e AU apresentaram respostas com DPR menor do que 5,0 %, indicando uma boa estabilidade e repetibilidade provavelmente devido às interações  $\pi$ - $\pi$  e propriedades lipofílicas que devem favorecer a adsorção na matriz, levando a uma boa estabilidade em suas respostas amperométricas.

#### **IV.4.8. Aplicação do Sensor em Amostras e Testes de Recuperação**

O método proposto foi aplicado para determinação simultânea de *L*-AscH<sub>2</sub> e AU em três amostras de urina e determinação de *L*-AscH<sub>2</sub> em tabletes de vitamina C, em triplicata, usando o método de adição de padrão. Para ajustar na faixa linear a determinação de *L*-AscH<sub>2</sub> e AU, todas as amostras de

urina foram diluídas 50 vezes; esta diluição pode ajudar a reduzir os efeitos de matriz de amostras reais.

Para checar a precisão dos resultados, as amostras foram fortificadas com soluções padrões de *L*-AscH<sub>2</sub> e AU e assim as quantidades totais foram detectadas. A recuperação das amostras fortificadas foi determinada, com valores entre 98,5% e 100,7% (Tabela IV.7).

**Tabela IV.7.** Determinação de *L*-AscH<sub>2</sub> e AU em amostras de urina.

	Amostras					
	Urina 1#		Urina 2#		Urina 3#	
	AU	AscH <sub>2</sub>	AU	AscH <sub>2</sub>	AU	AscH <sub>2</sub>
Detectado (μmol L <sup>-1</sup> )	50,35	6,52	56,44	7,21	54,87	6,65
“Spike” (μmol L <sup>-1</sup> )	15	20	15	20	15	20
Após “spike” (μmol L <sup>-1</sup> )	65,10	26,12	71,50	27,40	69,91	26,73
Recuperação (%)	99,7	98,5	100,1	100,7	100,1	100,3
DPR (%)	2,4	2,2	2,1	2,9	2,6	2,4

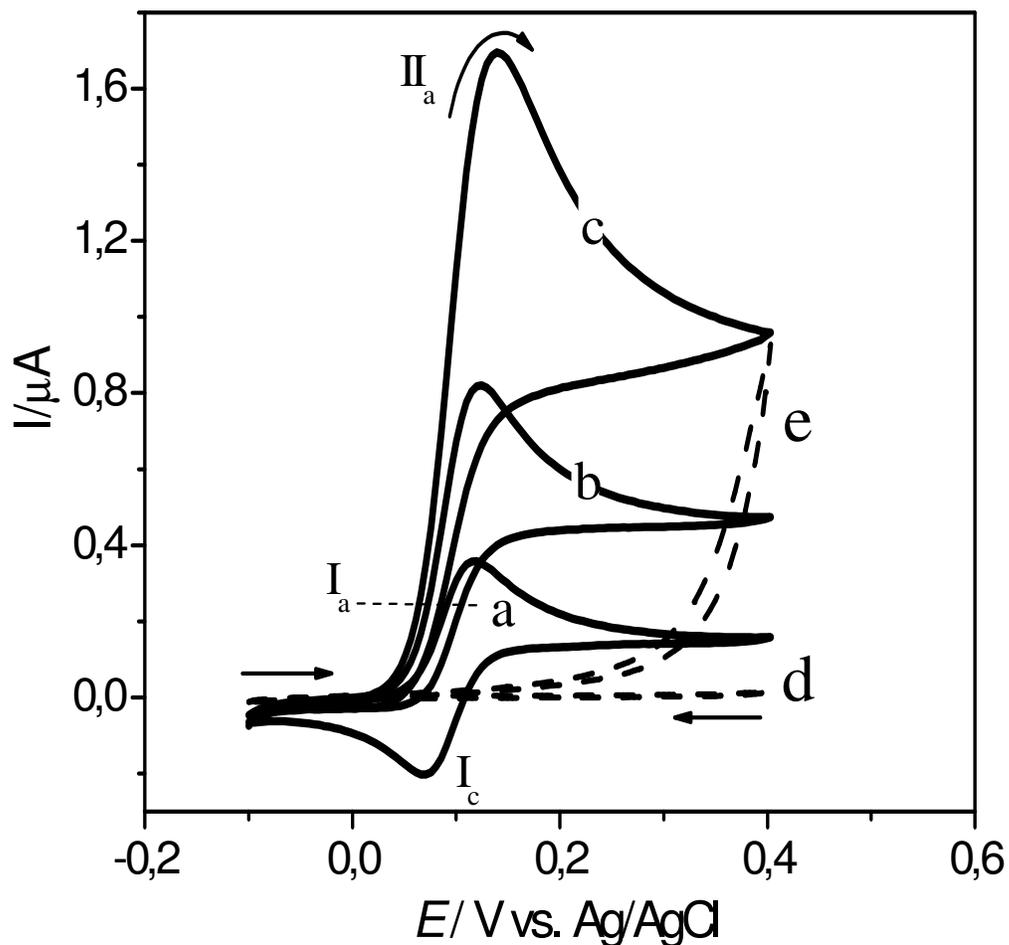
## IV.5. Sensor Amperométrico para NADH

### IV.5.1. A oxidação eletrocatalítica de NADH pelo EPC/4-NOFN/4-NHOHFN

De maneira a verificar a atividade eletrocatalítica do par redox 4-NOFN/4-NHOHFN na presença de NADH, alguns ensaios foram realizados. Assim, a Figura IV.26 mostra os voltamogramas cíclicos para um EPC/4-NOFN/4-NHOHFN em solução tampão TRIS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH = 7,0), usando uma varredura anódica, com  $E_{\text{inicial}} = -0,1 \text{ V}$  e  $E_{\lambda} = 0,4 \text{ V}$ , na ausência (a) e na presença (b,c) de NADH.

Para propósito comparativo, voltamogramas obtidos em um eletrodo de pasta de carbono não modificado na ausência (d) e presença de NADH (e) são também apresentados. Nestes voltamogramas (Figs. IV.26d,e), não há evidência de picos, indicando que a oxidação direta de NADH está fora destes limites ( $E_{\text{pa}} > 0,4 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ ). Na Figura IV.26a, o sistema redox  $I_a/I_c$ , relativo 4-NOFN/4-NHOHFN está presente em potenciais de  $E_{\text{pla}} = 0,12 \text{ V}$  e  $E_{\text{plc}} = 0,07 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ .

Após adição de NADH à solução (Figs. IV.26b e c), o pico de oxidação aumenta significativamente e o pico de redução do mediador desaparece completamente na presença de altas concentrações de NADH, indicando, portanto, uma eletrocatalise eficiente.



**Figura IV.26.** (A) Voltamogramas cíclicos para o EPC/4-NOFN/4-NHOHFN, na ausência (a) e na presença de NADH/ $mmol L^{-1}$ : (b) 0,1, (c) 0,3; eletrodo de pasta de carbono não modificado na ausência (d) e na presença (e) de 0,3  $mmol L^{-1}$  de NADH. Velocidade de varredura ( $v$ ):  $2,0 mV s^{-1}$ . Estudos realizados em tampão TRIS  $0,1 mol L^{-1}$  em pH 7,0.

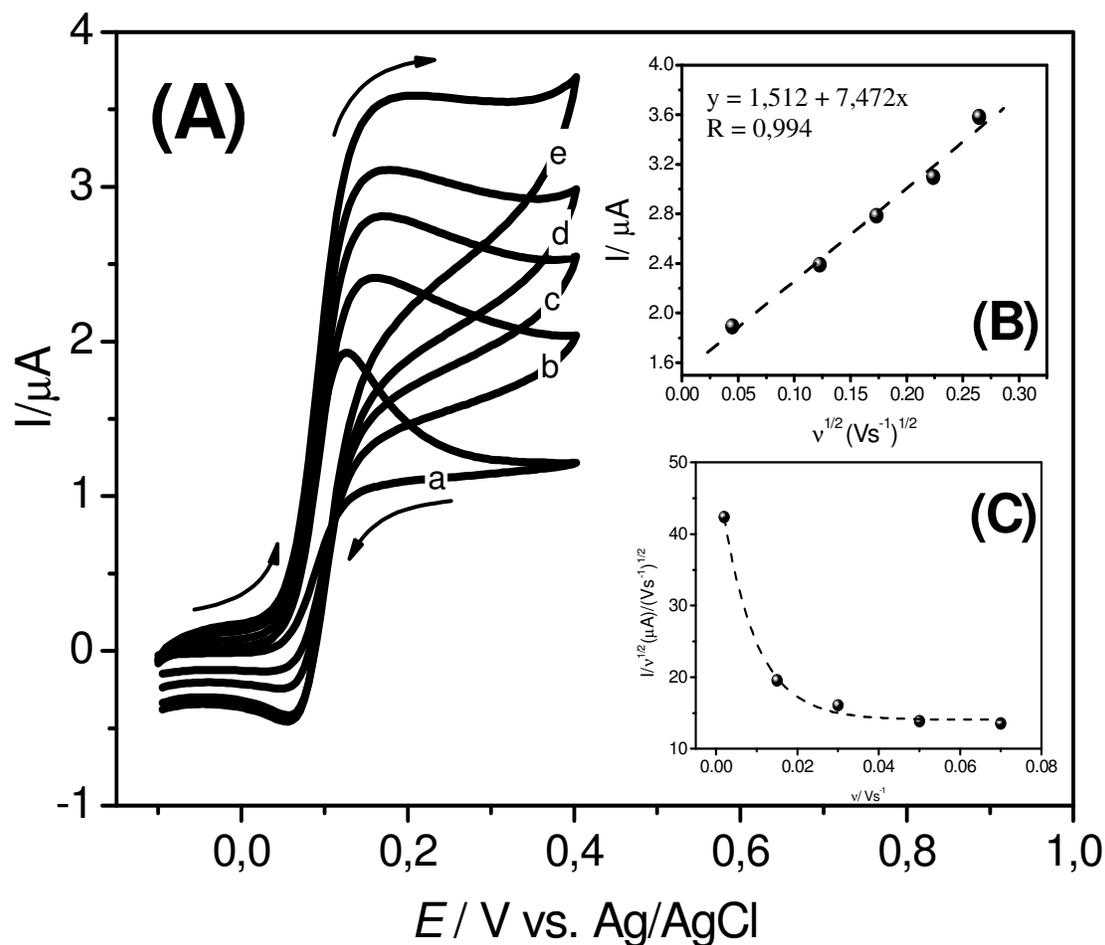
Estudos mais detalhados a respeito da corrente de pico de oxidação da NADH na superfície do EPC/4-NOFN/4-NHOHFN foram realizados por voltametria cíclica em solução tampão TRIS  $0,1 mol L^{-1}$  (pH=7,0). A Figura

IV.27 exhibe os voltamogramas cíclicos de uma solução de NADH em diferentes velocidades de varredura.

Como observado na Figura IV.27A, 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 da corrente catalítica  $I_p$  versus a raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial ( $v^{1/2}$ ) na faixa de velocidade de 2 a 70  $\text{mV s}^{-1}$  foi construído e resultou numa dependência linear (Figura IV.27B), expressa pela seguinte Equação IV. 22:

$$I(\mu\text{A}) = 1,5 + 7,5 v^{1/2} (\text{V s}^{-1})^{1/2} \quad (\text{Eq. IV.22})$$

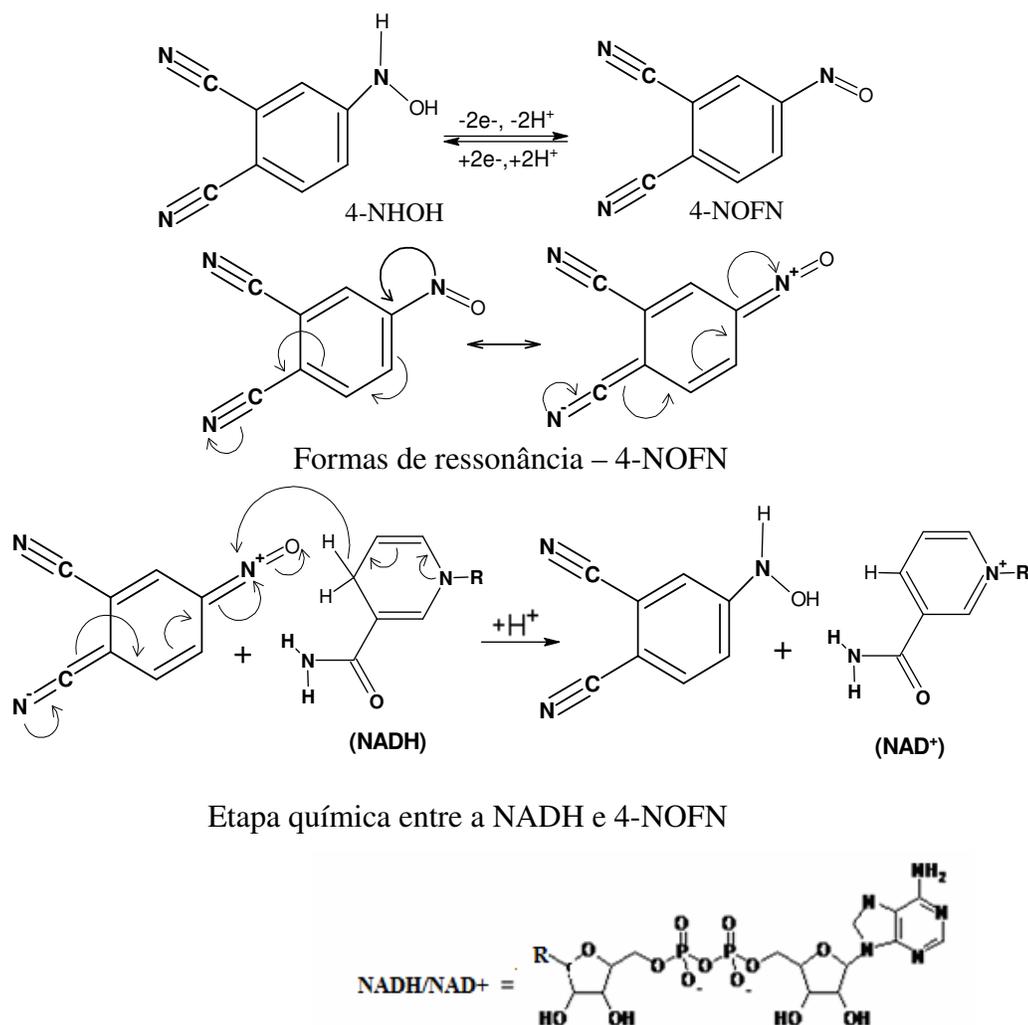
Assim, esta dependência linear sugere que o processo seja controlado por difusão na faixa de velocidade de varredura de potencial estudado. Para ratificar que o processo de oxidação eletrocatalítica entre a NADH e o EPC/4-NOFN/4-NHOHFN de fato apresenta uma etapa química acoplada, foram realizados alguns ensaios. A análise do gráfico da corrente de pico normalizada com a raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial ( $I_p/v^{1/2}$ ) versus a velocidade de varredura de potencial (Figura IV.27C) permite observar um perfil característico de um típico processo eletroquímico-químico catalítico ( $EC_{\text{cat}}$ ) (Bard & Faulkner, 2001), corroborando, portanto, com o mecanismo proposto.



**Figura IV.27.** (A) Voltamogramas cíclicos para o EPC/4-NOFN/4-NHOHFN em várias velocidades de varredura ( $v$ ): (a) 2, (b) 15, (c) 30, (d) 50 e (e) 70  $\text{mV s}^{-1}$ , (B) gráfico de  $I_p$  vs.  $v^{1/2}$  e (C) variação de  $I_p/v^{1/2}$  vs.  $v$ . Estudos realizados em solução tampão TRIS 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  em pH 7,0 e  $[\text{NADH}] = 0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ .

Como já mencionado, o substituinte nitro na ftalonitrila pode ser transformado totalmente no grupo hidroxilamina que, na varredura reversa, pode ser oxidada ao grupo nitroso por um processo de dois elétrons e dois prótons. Assim, o ciclo catalítico para a oxidação electrocatalítica de NADH

envolve o par redox 4-NOFN/4-NHOHFN, análogo ao sistema bem conhecido quinona/hidroquinona (Lobo *et al.*, 1997), como pode ser observado e sugerido através da Figura IV.28 seguinte:



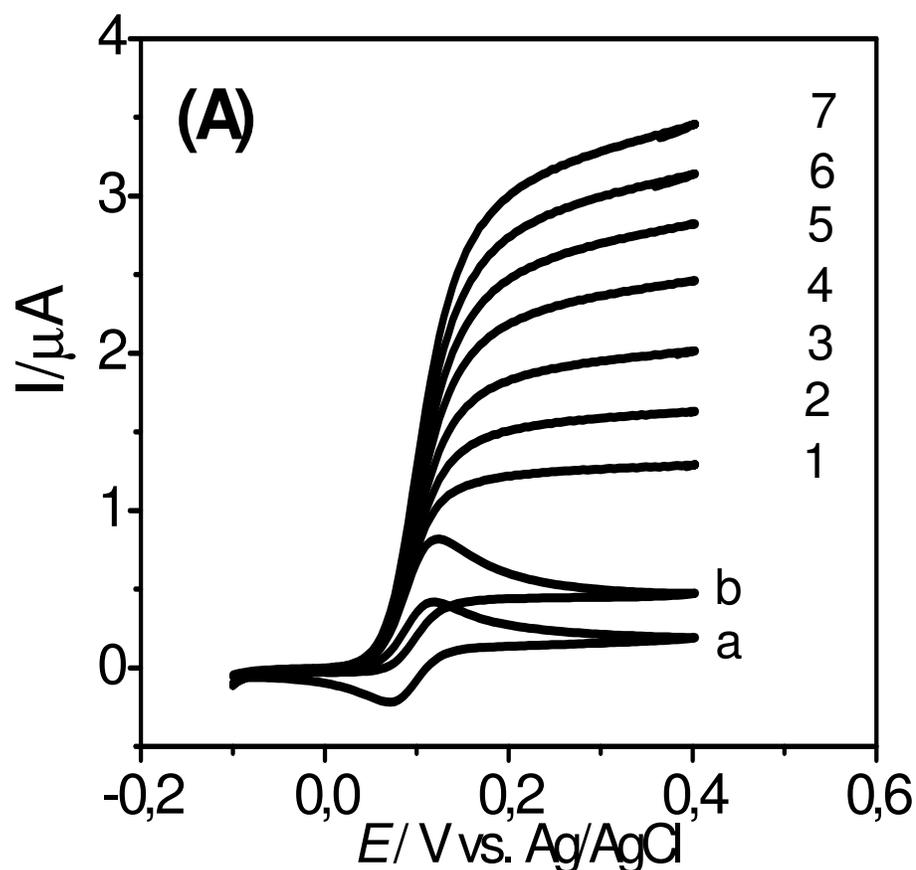
**Figura IV.28.** Modelo mecanístico proposto do processo de oxidação eletrocatalítica da NADH pelo EPC/4-NOFN/4-NHOHFN.

Em geral, as quinonas são hábeis para se submeterem a um processo de transferência de elétron-próton-elétron sequencial ou a uma transferência de hidreto (Carlson & Miller, 1985). Para o nitrosoftalonitrila, neste caso, a rota

via hidreto deve ser preferida devido à presença de uma carga parcial positiva no nitrogênio do grupo NO, devido à deslocalização de elétrons. Após a transferência de hidreto para o grupo NO, o complexo substrato-mediador dissocia-se, seguido pela rápida protonação do oxigênio como reportado por Mano & Kuhn (1999a,b), em tampão TRIS 0,1 mol L<sup>-1</sup>, em pH 8,0.

#### **IV.5.2 – Parâmetros cinéticos para a eletrooxidação de NADH no EPC/4-NOFN/4-NHOHFN**

Para uma melhor avaliação quantitativa do comportamento electrocatalítico da oxidação de NADH no EPC/4-NOFN/4-NHOHFN, medidas cinéticas foram realizadas em diferentes concentrações de NADH em diferentes velocidades de rotação  $\omega$  (rad s<sup>-1</sup>) em tampão TRIS 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH =7) e uma velocidade de varredura fixa de 2 mV s<sup>-1</sup> (Figura IV.29).



**Figura IV.29.** (A) Curvas de polarização obtidas em diferentes velocidade de rotação do eletrodo para oxidação eletrocatalítica de NADH no EPC/4-NOFN/4-NHOHN, na ausência (Aa) e presença de NADH: (Ab)  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ . Velocidade de rotação: (1)  $1,62$ ; (2)  $2,29$ ; (3)  $3,24$ ; (4)  $4,58$ ; (5)  $5,59$ ; (6)  $6,47$  e (7)  $7,24 \text{ rad s}^{-1}$ .  $v = 2,0 \text{ mVs}^{-1}$ . Estudos realizados em tampão TRIS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em pH  $7,0$  e  $\Gamma = 6,5 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ .

Assim, como pode ser verificado na Figura IV.29A, na presença de NADH, o pico de oxidação aumenta drasticamente e o pico de redução

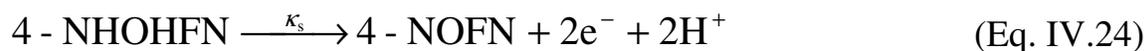
diminui, indicando um efeito eletrocatalítico bastante eficiente. A catálise é um resultado da difusão do NADH para a superfície eletródica onde ocorre redução do mediador oxidado (4-NOFN) para formar  $NAD^+$  e a forma reduzida do mediador (4-NHOHFN).

Neste contexto, experimentos foram realizados com o objetivo de estudar o mecanismo da reação, bem como avaliar as constantes de velocidade do referido processo eletrocatalítico. A escolha do pH 7 foi também racionalizado uma vez que há uma grande quantidade de enzimas desidrogenases que dependem do processo redox do NADH e que são dependentes do pH, apresentando um pH ótimo em 7 (Bartlett *et al.*, 1997). Além disso, é também neste pH, onde ambos NADH e  $NAD^+$  mostram maiores estabilidades quando dissolvidos em solução aquosa (Chenault & Whitesides, 1987) e onde a maioria dos valores prévios de  $\kappa_{obs}$  foram reportados na literatura (Gorton & Domínguez, 2002).

Para muitos eletrodos modificados quimicamente usados para oxidação eletrocatalítica de NADH, tem sido postulado que um complexo de transferência de carga é formado na reação entre NADH e o mediador, por causa do valor de  $\kappa_{obs}$  diminuir com o aumento na concentração de NADH (Santos *et al.*, 2002a,b). Além disso, acredita-se que um complexo de transferência de carga, inicialmente formado entre os reagentes, comporta-se análogo à cinética de Michaelis-Menten de reações enzimáticas (Gorton & Domínguez, 2002). Assim, a reação de eletrooxidação de NADH pode ser esquematizada conforme mostrado (Eq. IV.23):



A reação não está estequiometricamente completa, como não está claro se o próton é transferido do NADH para o mediador. A reação da Equação IV.23 é seguida por uma reoxidação de 4-NHOHFN:

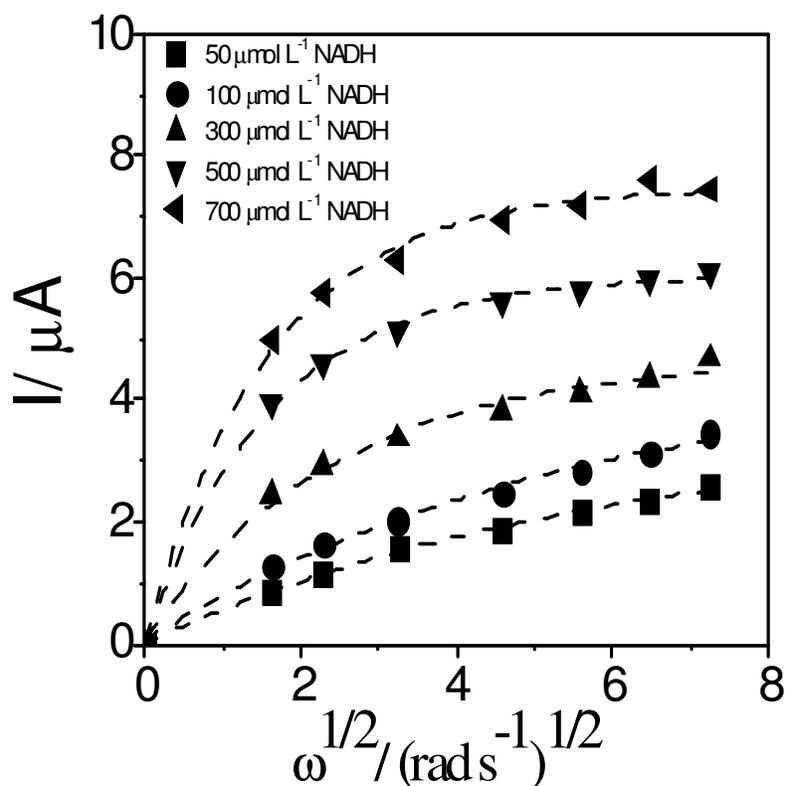


Sendo o  $\kappa_s$  a constante de transferência de elétrons entre o mediador imobilizado e o eletrodo.

A Figura IV. 30 mostra os gráficos de Levich obtidos para o EPC/4-NOFN/4-NHOHFN para cinco diferentes concentrações de NADH, 50, 100, 300, 500 e 700  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , tampão TRIS (0,1  $\text{mol L}^{-1}$ , pH 7,0). A corrente de oxidação para o NADH no eletrodo modificado pode ser limitada pelo transporte de massa do NADH para a superfície do eletrodo e/ou pela cinética da reação (Eq.IV.24). A partir da Figura IV. 30, fica evidente que há limitação cinética na reação global. Para o eletrodo de disco rotatório, a corrente limitada pelo transporte de massa ( $I_{d(L)}$ ) depende da velocidade de rotação,  $\omega$ , e da concentração de NADH no seio da solução  $[\text{NADH}]^*$ , de acordo com a equação de Levich (Bard & Faulkner, 2001) (Eq.IV.25):

$$I_{d(L)} = 0,620nFA[\text{NADH}]^* D^{2/3} \nu^{-1/6} \omega^{1/2} \quad (\text{Eq.IV.25})$$

sendo  $n$  o número de elétrons,  $F$  a constante de Faraday,  $\nu$  a viscosidade cinemática, e  $D$  o coeficiente de difusão. Os valores de  $D$  e  $\nu$  de  $2,4 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  (Moiroux & Elving, 1980) e  $0,01 \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  (Bard & Faulkner, 2001), respectivamente, foram empregados.



**Figura IV.30.** Gráfico de Levich para a resposta eletrocatalítica de estado-estacionário para o EPC/4-NOFN/4-NHOHFN em diferentes [NADH]. Estudos realizados em tampão TRIS 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH 7,0 e  $\Gamma = 6,5 \times 10^{-10}$  mol cm<sup>-2</sup>.

Para uma reação catalisada, a corrente limitada cineticamente ( $I_{kin}$ ) é dada geralmente pela seguinte expressão (Eq. IV.26):

$$I_{kin} = nFA\kappa_{obs} \Gamma^* [\text{NADH}]^* \quad (\text{Eq. IV.26})$$

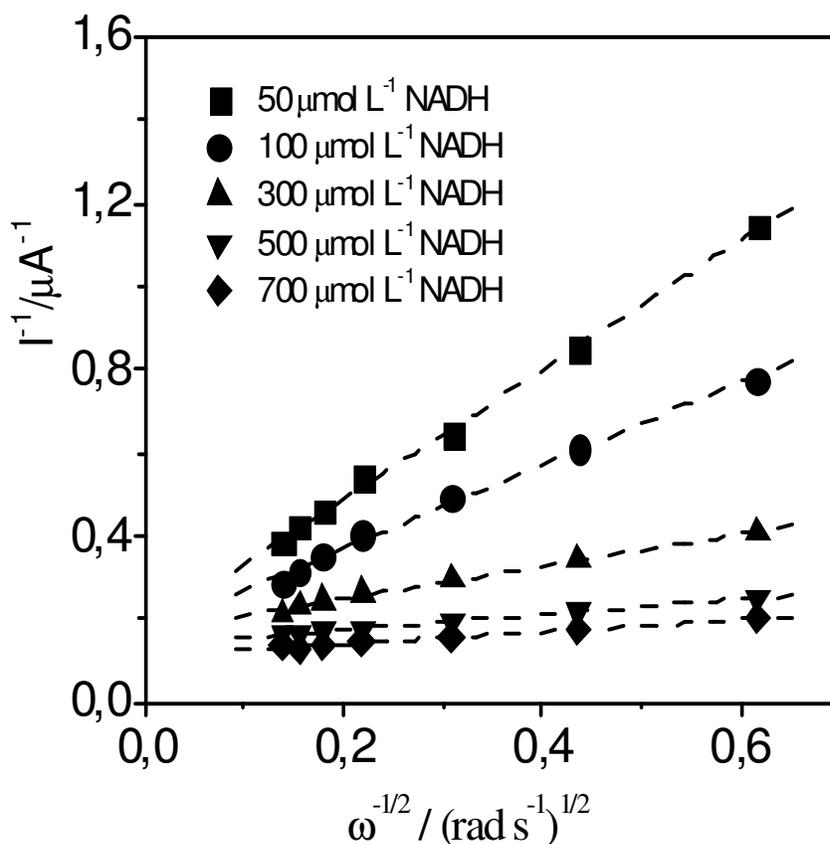
sendo  $\Gamma^*$  a cobertura total do 4-NOFN/4-NHOHFN. Uma dependência linear da corrente catalítica na  $\omega^{1/2}$  é esperada a partir da equação de Levich. O desvio observado a partir da equação de Levich (Figura IV.30) pode ser o resultado da etapa limitada quimicamente. Assim, a expressão geral para a corrente global,  $I$ , é dada por (Eq. IV.27A):

$$I^{-1} = I_{d(L)}^{-1} + I_{Kin}^{-1} \quad (\text{Eq. IV.27A})$$

Fazendo a inversão da Equação IV.27A, tem-se a conhecida Equação IV.27B de Koutecky-Levich, muito utilizada em reações catalíticas empregando eletrodos contendo mediadores de elétrons (Murray, 1984, 1992). Esta equação foi empregada na obtenção da Figura IV.31, variando a concentração de  $[\text{NADH}]^*$ :

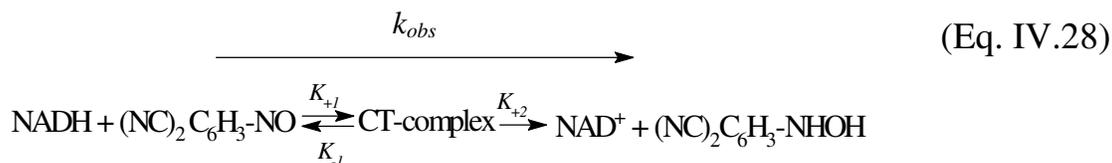
$$\frac{1}{I} = \frac{1}{nFA\kappa_{obs} \Gamma^* [\text{NADH}]^*} + \frac{1}{0,620nFA\nu^{-1/6} D^{2/3} [\text{NADH}]^* \omega^{1/2}} \quad (\text{Eq. IV.27B})$$

Pela inclinação da curva, é possível obter o número de elétrons ( $n$ ) envolvidos na reação. Através da interceptação do gráfico de Koutecky-Levich é possível também avaliar o  $\kappa_{obs}$ , conhecendo-se então o valor de  $\Gamma$ .



**Figura IV.31.** Gráficos de Koutecky-Levich dos dados experimentais mostrados em (B). Estudos realizados em tampão TRIS 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH 7,0 e  $\Gamma = 6,5 \times 10^{-10}$  mol cm<sup>-2</sup>.

O valor da constante  $\kappa_{\text{obs}}$  apresentou-se altamente dependente da [NADH]\* como observado na Figura IV.32.a. Este comportamento tem sido observado para outros eletrodos modificados com mediadores usados na oxidação eletrocatalítica de NADH (Santos *et al.*, 2002a,b; Kubota & Gorton, 1999), sendo esta alta dependência explicada pela formação de um complexo de transferência de carga (CT-complexo) entre o NADH e o mediador antes da formação do produto da reação representada pela Equação IV.28 a seguir:



Este tipo de mecanismo de reação é bastante empregado para o estudo de cinética de Michaelis-Menten e obtenção da constante que leva o mesmo nome ( $k_M$ ), que pode ser definida conforme a Equação IV.29 (Gorton, 1986):

$$K_M = \frac{\kappa_{-1} + \kappa_{+2}}{\kappa_{+1}} \quad (\text{Eq. IV.29})$$

A constante de velocidade global da reação,  $\kappa_{obs}$ , para qualquer concentração de NADH pode ser expressa como proposto abaixo (Gorton, 1986):

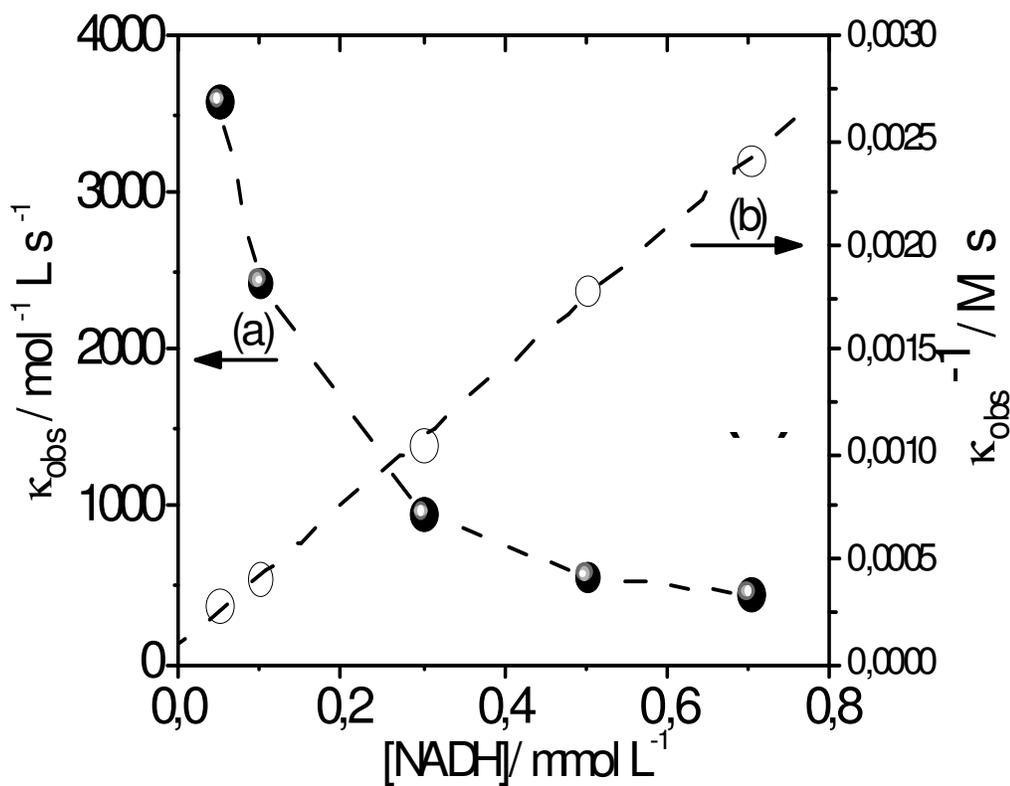
$$\kappa_{obs} = \frac{\kappa_{+2}}{K_M + [\text{NADH}]^*} \quad (\text{Eq. IV.30A})$$

Invertendo a Equação IV.30a, obtém-se a expressão

$$\frac{1}{\kappa_{obs}} = \frac{K_M}{\kappa_{+2}} + \frac{[\text{NADH}]^*}{\kappa_{+2}} \quad (\text{Eq. IV.30B})$$

A construção do gráfico  $1/\kappa_{obs}$  vs.  $[\text{NADH}]^*$  como observado na Figura IV.32.b fornece uma relação linear, compatível com a equação  $\kappa_{obs}^{-1} = 2,16(\pm 0,05)[\text{NADH}] + 5,7(\pm 0,4) \times 10^{-4}$ , com coeficiente de correlação de 0,999 para  $n = 5$ , sendo o  $\kappa_{obs}^{-1}$  em  $\text{mol L}^{-1}\text{s}$  e  $[\text{NADH}]$  em  $\text{mmol L}^{-1}$  sendo

indicativo que um complexo de transferência de carga deve se formar entre a 4-nitroftalonitrila ativada e o NADH. Do coeficiente angular da curva, é possível calcular o valor de  $\kappa_{+2}$  e, do coeficiente linear, o valor de  $K_M$  pode ser avaliado. Como verificado na Tabela IV.8, o  $\kappa_{obs}$ ,  $\kappa_{+2}$  e  $K_M$  foram calculados e apresentaram os valores de  $1,0 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$ ,  $0,3 \text{ s}^{-1}$  e  $2,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , respectivamente.



**Figura IV.32.** (a) Variação de  $k_{obs}$  vs.  $[NADH]$  obtidos para o eletrodo modificado com o 4-nitroftalonitrila ativado e (b) Variação de  $1/k_{obs}$  vs.  $[NADH]$ . Estudos realizados em tampão TRIS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em pH 7,0 e  $\Gamma = 6,5 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ .

A Tabela IV.8 lista alguns trabalhos reportados na literatura envolvendo eletrodos modificados com vários mediadores, bem como seus respectivos parâmetros cinéticos referentes ao processo de oxidação eletrocatalítica de NADH, permitindo, portanto, comparar seus resultados com o presente sensor desenvolvido e discutido ao longo deste tópico.

Assim, de acordo com a Tabela IV.8, observa-se que o valor de  $k_{obs}$  é maior quando comparado aos valores publicados previamente para os sistemas

eletrodo-mediador, exceto para os trabalhos de Nassef *et al.* (2006) e Mano & Kuhn (1999). Por outro lado, mediadores que têm apresentado altos valores de  $\kappa_{obs}$ , têm também requerido altos sobrepotenciais para a oxidação electrocatalítica de NADH, como verificado no trabalho desenvolvido por Nassef *et al.* (2006), dificultando, assim, sua aplicação no desenvolvimento de biossensores.

**Tabela IV.8.** Parâmetros eletroquímicos e cinéticos de alguns eletrodos modificados para eletrooxidação de NADH.

Ref.	$E^{0'}$ (mV)	pH	$\Gamma$ (mol cm <sup>-2</sup> )	$\kappa_{obs}$ (mol <sup>-1</sup> L s <sup>-1</sup> )	$K_M$ (mol L <sup>-1</sup> )	n
(Pereira <i>et al.</i> , 2003)	-140 vs. SCE	7,0	5,7x10 <sup>-9</sup>	5,5x10 <sup>3</sup>	1,0x10 <sup>-4</sup>	1,9
(Nassef <i>et al.</i> , 2006)	+200 vs. Ag/AgCl	7,0	4,2x10 <sup>-10</sup>	1,1x10 <sup>5</sup>	2,2x10 <sup>-5</sup>	2,0
(Santos <i>et al.</i> , 2002a)	-230 vs. SCE	7,0	5,2x10 <sup>-9</sup>	1,4x10 <sup>3</sup>	2,1x10 <sup>-4</sup>	1,9
(Kubota & Gorton, 1999)	-220 vs. SCE	7,0	6,8x10 <sup>-10</sup>	8,2x10 <sup>2</sup>	1,8x10 <sup>-3</sup>	2,0
(Mano & Kuhn, 1999)	-50 vs. Ag/AgCl	8,0	1,2x10 <sup>-10</sup>	5,0x10 <sup>4</sup>	—	1,9
(Santos <i>et al.</i> , 2002b)	-60 vs. SCE	7,0	4,4x10 <sup>-9</sup>	1,8x10 <sup>3</sup>	2,7x10 <sup>-4</sup>	1,9
(Munteanu <i>et al.</i> ,	+156 vs. Ag/AgCl	6,0	2,7x10 <sup>-10</sup>	3,0x10 <sup>3</sup>	3,1x10 <sup>-4</sup>	2,0

2003)

(Antiochia —

<i>et al.</i> ,		7,0	$9,7 \times 10^{-11}$	$2,0 \times 10^3$	—	—
-----------------	--	-----	-----------------------	-------------------	---	---

2005)

(Vasantha

& Chen,	+200 vs. Ag/AgCl	7,0	$2,6 \times 10^{-10}$	$9,8 \times 10^3$	—	—
---------	------------------	-----	-----------------------	-------------------	---	---

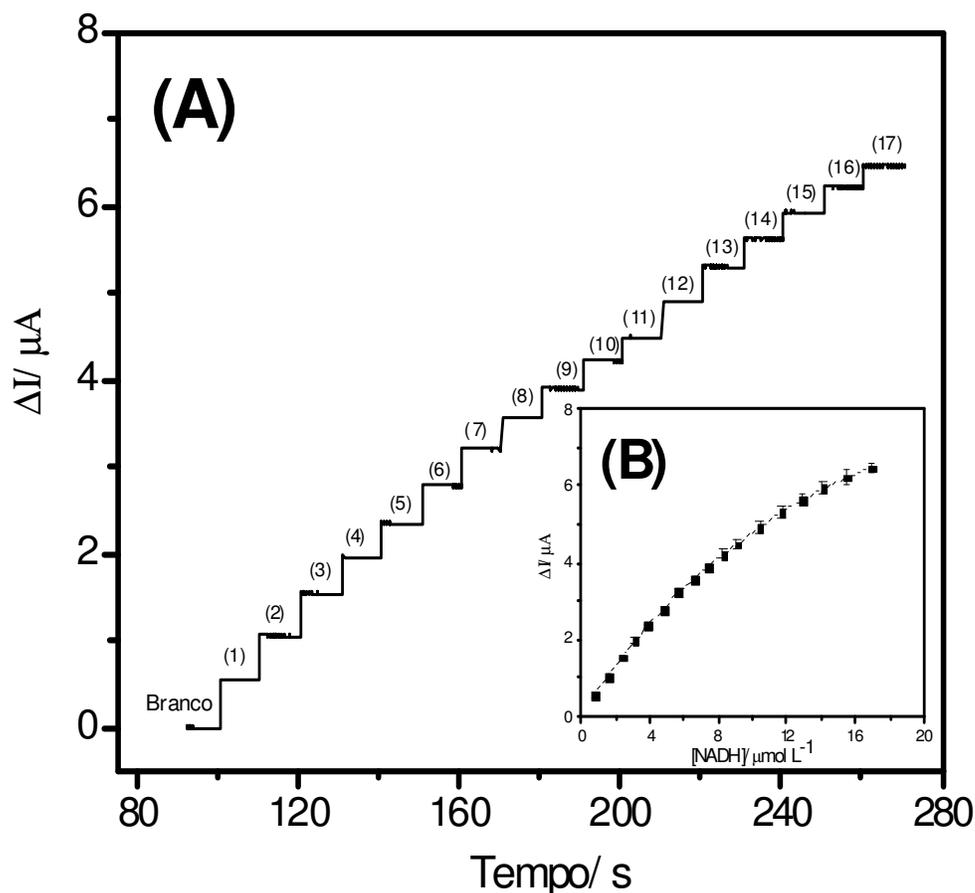
2006)

Este

trabalho	+100 vs. Ag/AgCl	7,0	$6,5 \times 10^{-10}$	$1,0 \times 10^4$	$2,7 \times 10^{-5}$	1,9
----------	------------------	-----	-----------------------	-------------------	----------------------	-----

### IV.5.3 – Detecção amperométrica de NADH

Para obter uma curva analítica para o sensor desenvolvido, amperogramas para a oxidação de NADH foram realizados em diferentes concentrações em tampão TRIS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH = 7,0) e potencial aplicado de +100 mV vs. Ag/AgCl (Figura IV.33).



**Figura IV.33.** (A) Medidas amperométricas para a eletro-oxidação de NADH no EPC/4-NOFN/4-NHOHFN obtidas em tampão TRIS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em pH 7,0 e  $[\text{NADH}]$ : (1)  $0,8$  - (17)  $17,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , (B) Curva analítica.  $E_{ap} = 100 \text{ mV vs. Ag/AgCl}$ .

A resposta para este sensor foi rápida, alcançando um máximo em cerca de 0,1 s. Este tempo de resposta é muito curto, considerando que o eletrodo utilizado é feito a base de pasta de carbono, onde a difusão das espécies deve ser mais dificultada. Sabe-se que uma condição para o sensor responder é que haja difusão da solução através da pasta, sendo que esta etapa influi no tempo

de resposta. Provavelmente, o procedimento usado para construir o sensor a base de pasta de carbono resultou num sistema bem empacotado, tornando difícil a solução difundir profundamente através da pasta, e isso pode levar a uma resposta mais rápida, pois somente os sítios superficiais devem contribuir para a resposta.

Além disso, o sensor proposto mostrou uma faixa linear de resposta de 0,8 a 8,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (Figura IV.33), que pode ser expressa de acordo com equação:  $\Delta I / (\mu\text{A}) = 0,34 (\pm 0,07) + 0,50 (\pm 0,02) [\text{NADH}] / (\mu\text{mol L}^{-1})$  com um coeficiente de correlação de 0,997 para  $n = 10$  apresentando sensibilidade maior do que os sensores reportados na literatura (Tabela I.4).

Assim, esta sensibilidade de  $0,5 \mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$  pode ser atribuída à eficiência na transferência de elétrons entre a 4-nitrosftalonitrila e o NADH. O limite de detecção de  $0,25 \mu\text{mol L}^{-1}$  foi determinado usando um razão  $3\sigma/b$  e limite de quantificação de  $0,82 \mu\text{mol L}^{-1}$  usando  $10\sigma/b$ , sendo  $\sigma$  o desvio padrão do valor médio para dez amperogramas do branco e  $b$  o coeficiente angular da curva analítica, determinado de acordo com as recomendações da IUPAC (Analytical Methods Commitee, 1987).

A Tabela I.4. lista alguns trabalhos reportados na literatura, envolvendo eletrodos quimicamente modificados com vários mediadores para a detecção de NADH, com o propósito de comparação. Assim, de acordo com a Tabela I.4., vários eletrodos modificados apresentam os potenciais de oxidação para NADH relativamente altos quando comparados com o do presente trabalho, o qual também apresenta maiores sensibilidade e limite de detecção em relação aos sensores apresentados na Tabela I.4.

#### **IV.5.4 – Estabilidade do 4-nitroftalonitrila ativado no eletrodo modificado**

Depois de ativado o eletrodo modificado com 4-nitroftalonitrila, a estabilidade do par redox 4-NOFN/4-NHOHFN foi checada por meio de amperogramas sucessivos na presença de NADH  $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , em tampão TRIS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em pH 7,0.

Após 100 determinações, nenhuma mudança significativa foi observada nas respostas amperométricas do sensor desenvolvido. Quando o eletrodo modificado foi estocado a seco e à temperatura ambiente nenhuma mudança significativa foi observada por um mês. O eletrodo modificado apresentou uma boa repetibilidade para determinação de NADH. Além disso, o desvio padrão relativo para dez determinações de NADH  $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  foi de 4,5%. Adicionalmente uma série de 10 sensores preparados da mesma maneira e testados em solução tampão TRIS  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH = 7,0) contendo  $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de NADH apresentaram respostas com DPR menor do que 5,0%, indicando uma boa estabilidade e repetibilidade provavelmente devido às interações  $\pi$ - $\pi$  e propriedades lipofílicas que devem favorecer a adsorção na matriz, levando a uma boa estabilidade em suas respostas amperométricas.

# **CAPÍTULO V**

# **CONCLUSÕES**

## V. Conclusões Gerais

Este trabalho relata a construção de forma simples e aplicação da pasta de carbono modificada com a 4-nitroftalonitrila, que submetida a uma redução preliminar do grupo nitro, promove a formação do par redox 4-NOFN/4-NHOHFN na superfície, sendo uma alternativa viável para a determinação eletroanalítica de *L*-CySH, *L*-GSH, *L*-AscH<sub>2</sub> e AU em amostras de interesse. Os resultados foram comparados com métodos descritos na literatura, mostrando concordância entre eles, em nível de 95 % de confiança.

A otimização das condições experimentais forneceu um ótimo limite de detecção e sensibilidade para os analitos estudados, superiores a vários dispositivos reportados recentemente na literatura. Além disso, este trabalho demonstrou que a pasta de carbono modificada com a 4-nitroftalonitrila ativada é um sensor sensível, robusto e estável, mostrando ser uma notável ferramenta para a determinação de *L*-CySH, *L*-GSH, *L*-AscH<sub>2</sub>, AU e NADH.

Particularmente, os estudos eletrocatalíticos e cinéticos do NADH e *L*-AscH<sub>2</sub> empregando o sensor desenvolvido comprovaram a grande eficiência do mediador, a 4-nitroftalonitrila ativada, em mediar a transferência de elétrons, envolvendo a molécula de NADH e *L*-AscH<sub>2</sub>. Além disso, a pasta de carbono constitui-se em excelente ambiente para a elaboração de sensores capazes de promover a detecção de NADH, com ótima sensibilidade e estabilidade.

A partir dos sensores desenvolvidos, foi possível operar a célula eletroquímica durante a eletrooxidação do NADH, aplicando potencial de 0,1 V vs. Ag/AgCl para o sensor desenvolvido, o que amplia bastante a possibilidade de uso destes sensores em amostras complexas, pois, neste

potencial, o sensor torna-se mais seletivo e muito menos sensível a possíveis interferentes.

A avaliação dos parâmetros analíticos deste sensor mostrou que são ótimos dispositivos para a determinação de NADH, com ampla faixa de resposta linear. Além disso, o sensor desenvolvido apresenta-se como uma alternativa para o desenvolvimento de biossensores com o emprego de enzimas NADH dependentes.

# **CAPÍTULO VI**

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

**VI. Referências Bibliográficas**

- Abiman, P.; Wildgoose, G. G.; Compton, R. G.; *Electroanalysis* 19 (2007) 437.
- Analytical Methods Committee, *Analyst* 112 (1987) 199.
- Anderson, M.; *Meth Enzymol* 13(1985) 548.
- Andrieux, C.P.; Savéant, J.M.; *J. Electroanal. Chem.* 93 (1978) 163.
- Antiochia, R.; Lavagnini, I.; Magno, F.; *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 381(2005)1355.
- Ardakani, M.M.; Rahimi, P.E.; Karami, P.E.; Zane, H.R.; Naeimi, H.; *Sensors and Actuators B*, 123 (2007) 763-768.
- Argüello, J.; Victor, L. L.; Magosso, H. A.; Ramos, R. R.; Gushikem, Y.; *Electrochim. Acta* 54 (2008) 560.
- Ballarin, B.; Gazzano, M.; Cisneros, J.L.H.; Tonelli, D.; Seeber, R.; *Anal. Bioanal. Chem.* 374 (2002) 891.
- Bard, A.J.; Faulkner, L.; *Electrochemical Methods-Fundamental and Applications*, 2nd ed. Wiley, New York, 2001.
- Barreiros, A. L. B. S.; David, J. M.; David, J. P.; *Quim. Nova* 29(2006)113.
- Bartlett, P.N.; Birkin, P.R.; Wallace, E.N.K.; *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 93 (1997) 1951.
- Blaedel, W. J.; Jenkins, R. A.; *Anal. Chem.*, 47 (1975) 1337.
- Braun, R.D.; 1977. *J. Electrochemical. Society* 124 (1977)1342.
- Bridavari, S., *The Merck Index*, 11th ed., Merck and Co. Inc., New Jersey, 1989.
- Calvo-Marzal, P.; Chumbimuni-Torres, K. Y.; Höehr, N. F.; Kubota, L. T.; *Clin. Chim. Acta* 371 (2006) 152.

- Carlson, B.W.; Miller, L.L.; J. Am. Chem. Soc. 107 (1985) 479.
- Casella, I.G.; Contursi, M.; Desimoni, E.; Analyst 127 (2002) 647–652.
- Casero, E.; Darder, M.; Takada, K.; Abruna, H.D.; Pariente, F.; Lorenzo, E.;  
Langmuir 15 (1999) 127.
- Chen, H.L.; Li, M.S.; Structure and Function of Biomacromolecules, Shanghai  
Science Press, Shanghai, 1999, pp. 4–9.
- Chen, J.; He, Z.; Liu, H.; Cha, C.; J. Electroanal. Chem. 588 (2006) 324.
- Chen, X.P.; Cross, R.F.; Clark, A.G.; Baker, W.L.; Mikrochim. Acta 130  
(1999) 225.
- Chenault, H.K.; Whitesides, G.M.; 1987, Appl. Biochem. Biotechnol. 14  
(1987) 147.
- Chi, Q.-J.; Dong, S.-J.; J. Mol. Catal. A: Chemical, 105 (1996) 193.
- Chwatko, G.; Bold, E.; Talanta 52 (2000) 509.
- Compagnone, D.; Federici, G.; Scarciglia, L.; Biosens. Bioelectron. 8 (1993)  
257.
- Compagnone, D.; Federici, G.; Scarciglia, L.; Palleschi, G.; Anal. Lett. 27  
(1994) 15.
- Cunningham, S.K.; Keaveny, T.V.; Clin. Chim. Acta 1978, 86, 217.
- Damos, F.S.; Sotomayor, M.D.T.; Kubota, L.T.; Tanaka, S.M.C.N.; Tanaka,  
A.A.; Analyst 128 (2003) 255.
- Darchen, A.; Moinet, C.; J. Electroanal. Chem 61 (1975a) 373.
- Darchen, A.; Moinet, C.; J. Electroanal. Chem 68 (1976b) 173.
- Darchen, A.; Moinet, C.; J. Electroanal. Chem. 78 (1977c) 81.
- De Viries, N.; De Flora, S.; J. Cell Biochem. 51 (1993) 271.
- Dröge, W.; Physiol. Rev. 82 (2002) 47.
- Duarte, J. C.; Luz, R. C.S.; Damos, F. S.; Tanaka, A. A.; Kubota; L.T. Anal.  
Chim. Acta 612(2008)29.

- Dursun, Z.; ahbaz, I.S.; Ertas, F.N.; Nis, G.; Turk, li.; J. Chem. 27 (2003) 5130.
- Fei, S.; Chen, J.; Yao, S.; Deng, G.; He, D.; Kuang, Y.; Anal. Biochim. 339 (2005) 29.
- Fernandes, J.C.B.; Kubota, L.T.; Neto, G.O.; Anal. Chim. Acta 385 (1999) 3.
- Filanovsky, B.; Anal. Chim. Acta 394 (1999) 91.
- Galus, Z.; Fundamentals of Electrochemical Analysis, Ellis Horwood Press, New York 1976, p. 313.
- Gao, Z.; Siow, K. S.; NG, A.; Zhang, Y.; Anal. Chim. Acta. 343(1997) 49.
- Ghiselli, A.; Serafini, M.; Natella, F.; Scaccini, C.; Free Radical Biol. Med. 29(2000)1106.
- Gilmartin, M.A.; Hart, J.P.; Birch, B.; Analyst 1992, 117, 1299.
- Golabi, S.M.; Zare, H.R.; Hamzehloo, M.; Electroanalysis 14 (2002) 611-618.
- Gorton, L.; 1986. Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1 82 (1986a) 1245.
- Gorton, L.; Domínguez, E.; Reviews in Molecular Biotechnology 82(2002)371.
- Gorton, L.; Electroanalysis 7 (1995) 23.
- Gorton, L.; J. Chem. Soc. Faraday Trans. I, 82 (1986b) 1245.
- Griveau, S.; Gulppi, M.; Pavez, J.; Zagal, .H.; Bedioui, F.; Electroanalysis 15 (2003) 779.
- Guilbault, G. G.; Handbook of enzymatic methods of analysis, Marcel Dekker, New York, (1976), 4.
- Halbert, M. K.; Baldwin, R. P.; Anal. Chem. 57 (1985) 591.
- Halliwel, B., Nutr. Rev. 52 (1994) 263.

- Halliwel. B.; Gutteridge, J.M.C.; Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, Oxford (fourth edition), UK, 2007, p. 114.
- Handbook of Amino Acid Analysis—Theory & Laboratory Techniques, Pharmacia LKB Biotechnology, 1988.
- Hua, G.; Maa, Y.; Guo, Y.; Shao, S.; *Electrochim. Acta* 53 (2008) 6610.
- Inoue, T.; Kirchoff, J.R.; *Anal. Chem.* 72 (2000) 5755.
- Jaegfeldt, H.; *J. Electroanal. Chem.*, 110 (1980) 295.
- Jaegfeldt, H.; Torstensson, A.; Johansson, G.; *Anal. Chim. Acta*, 97 (1978) 221
- Kachoosangi,R.T.; Banks,C.E.; Compton,R.G.; *Electroanalysis* 18(2006) 741.
- Kilbey,G.; Karousos,N.G.; Eglin, D.;J. Davis, *Electrochem. Commun.* 8 (2006) 1315.
- Kitani, A.; So, Y.-H.; Miller, L. L.; *J. Am. Chem. Soc.*, 103 (1981) 7636.
- Komiyama, T.; Fujimori, K.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*7 (1997) 175.
- Kubota, L.T.; Gorton, L.; *Electroanalysis* 11 (1999) 719.
- Kubota, L.T.; Gorton, L.; Roddick-Lanzilotta, A.; McQuillan, A.J.; *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 47 (1998) 39.
- Kumar, S.A.; Chen, S.-M.; *Sensors Actuators B*, 123 (2007) 964.
- Laviron, E.; 1979. *J. Electroanal. Chem.* 101(1979)19.
- Liang, S. C.; Wang, H.; Zhang,Z.M.; Zhang,X.; Zhang,H.S.; *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 58 (2002) 2605.
- Liang, S.C.; Wang, H.; Zhang, Z.M.; Zhang, H.S.; *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2005) 1095.
- Lima, P.R.; Santos, W.J.R.; Oliveira, A.B.; Goulart, M.O.F.; Kubota, L.T.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* 479(2008)758.

- Lima, P.R.; Santos, W.J.R.; Oliveira, A.B.; Goulart, M.O.F.; Kubota, L.T.; Biosens. Bioelectron. 24 (2008) 448.
- Lima, P.R.; Santos, W.J.R.; Luz, R. de C.S.; Damos, F.S.; Oliveira, A.B.; Goulart, M.O.F.; Kubota, L.T.; J. Electroanal. Chem. 612 (2008) 87.
- Liu, J.Y.; Tian, S.J.; Knoll, W.; Langmuir 21(2005) 5596.
- Loannou, P.V.; Siskos, M.G.; Appl. Organometal. Chem. 2001, 15, 511.
- Lobo, M.J.; Miranda, A.J.; López-Fonseca, J.M.; Tunon, P.; Anal. Chim. Acta 325(1996)33.
- Lobo, M.J.; Miranda, A.J.; Tunon, P.; Electroanalysis 9 (1997)191.
- Lobo, M.J.; Miranda, A.J.; Tunon, P.; Electroanalysis 8(1996)591.
- Luz, R.C.S.; Moreira, A.B.; Damos, F.S.; Oliveira, A.B.; Tanaka, A.A.; Kubota, L.T.; J. Pharm. Biomed. Anal. 42 (2006) 184.
- Mano, N.; Kuhn, A.; Electrochem. Comm. 1 (1999b) 497.
- Mano, N.; Kuhn, A.; Biosensors and Bioelectronics 16(2001a) 653.
- Mano, N.; Kuhn, A.; J. Electroanal Chem. 498 (2001b) 58.
- Mano, N.; Kuhn, A.; J. Electroanal. Chem. 477 (1999a), 79.
- Matos, R.C.; Augelli, M. A.; Lago, C. L.; Angnes, L. Anal. Chim. Acta. 404(2000)151.
- Matsue, T.; Suda, M.; Uchida, I.; Kato, T.; Osa, T.; J. Electroanal. Chem. 234(1987)163.
- McBride, J.M., Kraemer, W.J.; J. Strength Cond. Res. 13 (1999) 175.
- Meister, A.; Anderson, M. E. Ann. Rev. Biochem. 52 (1984) 711.
- Moiroux, J.; Elving, P.; J. Anal. Chem., 51 (1979) 346
- Moiroux, J.; Elving, P.J.; J. Am. Chem. Soc. 102( 1980)6533.
- Moore, R.R.; Banks, C.E.; Compton, R.G.; Analyst 129 (2004) 755.
- Moreno, G.; Pariente, F.; Lorenzo, E.; Anal. Chim. Acta 420(2000) 29.

- Munteanu , F.D.; Mano, N.; Kuhn, A.; Gorton, L.; J. Electroanal Chem. 564 (2004) 167.
- Munteanu, F.D.; Dicu, D.; Popescu, I. C.; Gorton, L.; Electroanalysis 15 (2003)385.
- Murray, R.W.; In: A.J. Bard (Ed.), Electroanalytical Chemistry, vol. 13. Marcel Dekker, New York, 1984,191.
- Murray, R.W.; Molecular Design of Electrode Surfaces, Wiley-Interscience, New York, 1992.
- Nalini, B.; Narayanan, S.S.; Electroanalysis 11 (1998) 779.
- Nassef, H. M.; Radi, A.E.; O’Sullivan, C. K.; Electrochem. Commun. 8 (2006) 1719.
- Nekrassova, O.; Lawrence, N.S.; Compton, R.G.; Electroanalysis 15 (2003) 1655.
- Nelson, D.L.; Cox, M.M.; third ed., Worth Publishers, USA, 2000.
- O’Connell, P. J.; Gormally, C.; Pravda, M.; Guilbault, G. G.; Anal. Chim. Acta 431 (2001) 239.
- Osipov, A.V.; Levashov, M.Y.; Tsetlin, V.I.; Utkin, Y.N.; Biochem. Biophys. Res. Commun. 328 (2005) 177.
- Ozoemena, K.; Westbroek, P.; Nyokong, T.; Electrochem. Commun. 3 (2001) 529.
- Pariente, F.; Lorenzo, E.; Tobalina, F.; Abruna, H.D.; Anal. Chem. 67 (1995) 3936.
- Pelletier, S.; Lucy, C.A.; Analyst 129 (2004) 710.
- Penninckx, M., Enzyme Microb. Technol. 26(2000)737.
- Pereira, A.U.; Santos, A.D.; Kubota, L.T.; Electrochim. Acta 48 (2003) 3541.
- Perez, E.F.; Kubota, L.T.; Tanaka, A.A.; Neto, G.O.; Electrochim. Acta 43 (1998) 1665.

- Persson, B.; *J. Electroanal. Chem.* 287(1990) 61.
- Popa, E.; Kubota, Y.; Tryk, D.A.; Fujishima, A.; *Anal. Chem.* 72(2000) 1724.
- Premkumar, J.; Khoo, S.B.; *J. Electroanal. Chem.* 576 (2005)105.
- Ramírez-Molina, C.; Boujtita, M.; Murr, N. E.; *Electroanalysis* 15(2003)1095.
- Ravichandram, K.; Baldwin, R.P.; *Analytical Chemistry* 55(1983)1586.
- Reis, A.P.; Tarley, C. R.; Martins, L. D. M.; Kubota, L.T.; *J. Braz. Chem. Soc.* 24(2008)1569.
- Rivera, N.; Colon, Y.; Guadalupe, A.R.; *Bioelectrochem. Bioen.* 34(1994)169.
- Rosatto, S.S.; Freire, R.S.; Durán, N.; Kubota, L.T.; *Quim. Nova*, 24 (2001) 77.
- Rover, L.; Kubota, L.T.; Höehr, N.F.; *Clin. Chim. Acta* 308 (2001) 55.
- Roy, P.R.; Saha, M. S.; Okajima, T.; Ohsaka, T.; *Electroanalysis* 16 (2004) 289.
- Saari, N.B.; Fujita, S.; Miyazoe, R.; Okugawa, M.; *J. Food Biochem.* 19 (1996) 321.
- Salimi, A.; Pourbeyram, S.; *Talanta* 60 (2003) 205.
- Samec, Z.; Elving, P. J.; *J. Electroanal. Chem.*, 144 (1983) 217.
- Santos, A.D., Gorton, L., Kubota, L.T., *Electrochim. Acta* 47(2002a)3351.
- Santos, A.D.; Gorton, L.; Kubota, L.T.; *Electroanalysis* 14(2002b)805.
- Shahrokhian, S.; Ghalkhani, M.; *Electrochim. Acta* 51(2006) 2599.
- Shahrokhian, S.; Karimi, M. *Electrochim. Acta* 50 (2004) 77.
- Shahrokhiana, S.; Karimia, M.; Khajehsharifi, H.; *Sens. Actuators B* 109 (2005) 278.
- Shankaran, D. R.; Narayanan, S. S.; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 75 (2002) 501.
- Shew, S.B., Keshen, T.H., Jahoor, F., Jaksic, T.; *J. Pediatr. Surg.* 40 (2005)52.

- Spătaru, N.; Sarada, B.V.; Popa, E.; Tryk, D.A.; Fujishima, A.; *Anal. Chem.* 73 (2001) 514.
- Strochkova, E.M.; Turyan, Y.I.; Kuselman, I.; Shenhar, A.; *Talanta* 44(1997)1923.
- Tan, W.T.; Bond, A.M.; Ngooi, S.W.; Lim, E.B.; Goh, J.K.; *Anal. Chim. Acta* 491 (2003) 181.
- Teixeira, M.F.S.; Dockal, E.R.; Cavalheiro, E.T.G.; *Sens. Actuators B* 106 (2005) 619.
- Tse, D.C.-S.; Kuwana, T.; *Anal. Chem.* 50(1978)1315.
- Vasantha, V.S.; Chen, S.-M.; *Electrochim. Acta* 52(2006)665.
- Vasconcelos, S.M.L.; Goulart, M.O.F.; Moura, J.B.de F.; Manfredini, V.; Benfato, M.da S.; Kubota, L. T.; *Quim. Nova* 30(2007)1323.
- Wring, S. A.; Hart, J. P.; Birch, B. J.; *Analyst*, 114 (1989) 1563.
- Wyngaarden, B.J.; Kelly, N.W.; *Gout and Hyperuricemia, Grune and Stratton, New York* 1974.
- Xu, F.; Wang, L.; Gao, M.; Jin, L.; Jin, J.; *Anal. Bioanal. Chem.* 372 (2002) 791.
- Yamashita, M.; Pessoa, C.A.; Kubota, L.T.; *J. Colloid. Inter. Sci.* 263(2003) 99.
- Young, J.G.; Onyebuago, W.; *J. Org. Chem.* 55 (1990) 2155.
- Zaia, A.M.; Ribas, K.C.L.; Zaia, C.T.B.V.; *Talanta* 50 (1999) 1003.
- Zaitseva, G.; Gushikem, Y.; Ribeiro, S.; Rosatto, S.S.; *Electrochimica Acta* 47(2002)1469.
- Zare, H.R.; Golabi, S.M.; *J. Electroanal. Chem.* 464, (1999)14.
- Zare, H.R.; Memarzadeh, F.; Ardakani, M. M.; Namazian, M.; Golabi, S.M.; *Electrochim. Acta* 5 (2005a) 3495.

- Zare, H.R.; Nasirizadeh, N.; Ardakani, M. M.; J. Electroanal. Chem. 577 (2005b) 25.
- Zen, J.M.; Jou, J.J.; Ilangovan, G.; Analyst 123(1998)1345.
- Zen, J.M.; Kimar, A.S.; Chen, J.C.; Anal. Chem. 73 (2001) 1169.
- Zhang, L.; Lin, X.; Analyst. 126(2001) 367.
- Zhang, L.; Zhang, C.; Lian, J.; Biosens. Bioelectron. 24 (2008) 690.
- Zhang, W.; Wan, F.; Zhu, W.; Xu, H.; Ye, X.; Cheng, R.; Jin, L.T.; J. Chromatog. B Anal. Technol. Biomed. Life Sc. 818 (2005) 227.
- Zhang, S.; Sun, W.-L.; Zhang, W.; Qi, W.-Y.; Jin, L.-T.; Yamamoto, K.; Tao, S.; Jin, J.; Anal. Chim. Acta 386 (1999) 21.
- Zhao, Y.D.; Zhang, W.D.; Chen, H.; Luo, Q.M.; Sens. Actuators B 92 (2003) 279.
- Zhu, L.D.; Zhai, J.G.; Yang, R.L.; Tian, C.Y.; Guo, L.P.; Biosens. Bioelectron. 22(2007) 2768.

# **CAPÍTULO VII**

# **PERSPECTIVAS**

## **VII. Perspectivas**

Pretende-se dar continuidade aos estudos ora reportados no que tange a quantificação de tióis totais, bem como utilizar novos compostos com grupo nitro e assim, verificar a atividade eletrocatalítica do sensor desenvolvido frente a outros tióis, mostrando-se desta forma a potencialidade do material desenvolvido.

Tentar imobilizar o mediador redox em diferentes matrizes tais como, sílicas modificadas, nanotubos de carbono, entre outras, visando o aumento de estabilidade do mesmo para posterior aplicação em fluídos biológicos.

Estudar novos sistemas para oxidação catalítica do NADH visando o desenvolvimento de biossensores.