

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
LABORATÓRIO DE ELETROQUÍMICA

ERIVALDO DE OLIVEIRA COSTA

**DESENVOLVIMENTO DE SENSOR NANOESTRUTURADO E BIOSSENSOR DE
dsDNA PARA DETERMINAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS DE INTERESSE
BIOLÓGICO: NITROTIROSINA, ÁCIDO ASCÓRBICO E ÁCIDO ÚRICO**

Maceió – AL

2016

ERIVALDO DE OLIVEIRA COSTA

**DESENVOLVIMENTO DE SENSOR NANOESTRUTURADO E BIOSSENSOR DE
dsDNA PARA DETERMINAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS DE INTERESSE
BIOLÓGICO: NITROTIROSINA, ÁCIDO ASCÓRBICO E ÁCIDO ÚRICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de doutor na área de Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marília Oliveira Fonseca Goulart

Maceió – AL

2016

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecária Responsável: Janaina Xisto de Barros Lima

C837e Costa, Erivaldo de Oliveira.
Desenvolvimento de sensor nanoestruturado e biossensor de dsDNA para
determinação de substâncias de interesse biológico: nitrotirosina, ácido ascórbico
e ácido úrico / Erivaldo de Oliveira Costa. – 2016.
136 f.: il.

Orientadora: Marília Oliveira Fonseca Goulart.
Tese (doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de
Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2016.

Bibliografia: f. 121-131.
Anexos: f. 132-136.

1. Sensor. 2. Biossensor. 3. Ácido ascórbico. 4. Ácido úrico. 5. Nitrotirosina.
6. CT-DNA. I. Título.

CDU: 543.553



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1144
Email: ppgqb.ufal@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da comissão julgadora da Defesa de Tese do Doutorando **Erivaldo de Oliveira Costa** intitulada: **“Desenvolvimento de sensor nanoestruturado e biossensor de dsDNA para determinação de substâncias de interesse biológico: nitrotirosina, ácido ascórbico e ácido úrico”**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 13 de dezembro de 2016, às 14:30 h, na Sala de Reuniões do IQB, na Universidade Federal de Alagoas.

COMISSÃO JULGADORA

Prof.^a Dr.^a Marília Oliveira Fonseca Goulart
Orientadora (PPGQB/IQB/UFAL)

Prof. Dr. Silvio do Desterro Cunha
(IQB/UFBA)

Profa. Dra. Daniela Santos Anunciação
(PPGQB/IQB/UFAL)

Prof. Dr. Vinicius del Colle
(UFAL/Campus Arapiraca)

Prof. Dr. José Rui Machado Reys
(ESENFAR/UFAL)

Profa. Dra. Maria Aline Fidelis de Moura
(ESENFAR/UFAL)

Dedico esta tese a minha mãe, Josefa, aos meus irmãos, Cícero, Sebastião, Aparecido e Vitória e a minha esposa Jhosianna.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por ser meu guia e sempre iluminar meu caminho.

Agradecimento especial a minha querida mãe, **Josefa de Oliveira Queiroz**, pelo amor, carinho e incentivo oferecidos durante toda a minha vida, especialmente na acadêmica.

Aos meus irmãos, **Cícero, Sebastião, Aparecido e Vitória**, por todo apoio e conselhos oferecidos ao longo desses anos.

A minha esposa **Jhosianna** pelo amor, carinho e dedicação em todas as horas, principalmente nos momentos mais difíceis.

A toda minha família, em especial as minhas cunhadas **Maria e Selma**, minha sogra **Joaquina**, meu cunhado **Jorge**, que sempre estiveram por perto.

A minha orientadora **Prof^a. Dra. Marília O. F. Goulart** por acreditar em mim, pela paciência, dedicação, responsabilidade. Levarei seus ensinamentos por toda minha vida.

Aos meus amigos do laboratório, **Waldomiro, Thaissa, Leonardo, Jadriane, Mary, Júnia, Adilson, Nicolas, Fred, Cleilton, Monica, Anny, Orlando e Camila** pelas brincadeiras, discussões, ajuda e pela amizade verdadeira.

Aos **professores do Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia**, pelos ensinamentos e discussões realizadas durante o curso.

Agradecimento especial ao Prof. **Dr.Phabyanno**, por ter obtido as imagens de MEV em seu laboratório no Instituto Federal de Alagoas.

Aos técnicos do **LNNano** por terem realizado os experimentos de AFM e XPS.

Ao técnico **Aldy**, pelas ajudas sempre que necessárias e pela amizade.

Aos professores da banca por terem aceitado o convite de participar da comissão julgadora e pela contribuição para melhoria deste trabalho.

Ao CNPq, FAPEAL e CAPES, pelo apoio financeiro, possibilitando assim a realização desse trabalho.

A todos muito obrigado!

RESUMO

Neste trabalho foram desenvolvidos um sensor eletroquímico modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) e 5-nitroindol (5-NI) para determinação simultânea dos ácidos ascórbico (AA) e úrico (AU), em amostras de urina e soro, e um biossensor à base de dsDNA para determinação do éster etílico da 3-nitro-L-tirosina (3NO₂TEE), como biomarcador de peroxinitração biológica. O trímico do 5-nitroindol foi eletrogerado *in situ* sobre os nanotubos de carbono depositados em eletrodo de carbono vítreo (ECV). Após esse processo, o grupo nitro aromático, presente na molécula foi reduzido gerando o par redox hidroxilamina/nitroso, utilizado para detecção e quantificação dos analitos presentes nas amostras biológicas. Os comportamentos eletroquímicos dos eletrodos modificados foram estudados, empregando as técnicas de voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial e cronoamperometria, as quais foram utilizadas para a detecção dos analitos e para obtenção dos parâmetros cinéticos e caracterização analítica da plataforma. Os estudos cronoamperométricos foram realizados com o objetivo de obter maiores informações dos processos redox entre AA e o sensor, uma vez que este demonstrou ser um processo electrocatalítico. Assim, por meio de gráficos e equações de Cottrell, foi possível obter os valores para o coeficiente de difusão (D_{AA}) e a constante catalítica (k_{cat}) da reação para o AA. Os valores do D_{AA} e de k_{cat} , determinados para AA, foram de $4,2 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ e $1,1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectivamente. O método desenvolvido de detecção de AA e AU apresentou boa sensibilidade e estabilidade em amostras de urina e soro, com limite de detecção (LD) de $1,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ para AA e $2,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ para AU. A partir do desempenho analítico obtido da plataforma nanoestruturada ECV/MWCNT/poli-5-NID, justifica-se a sua utilização deste como sensor para a determinação simultânea de AA e AU. Antes da construção do biossensor de DNA, para nitroaromáticos de importância biológica, foi necessária a realização dos estudos da 3NO₂TEE, em meios prótico: tampão acetato pH 4,5 e tampão fosfato pH 7,4 e 10,0 e, em meio aprótico (DMF/TBAPF₆, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), utilizando eletrodo de Pt e carbono vítreo, como eletrodos de trabalho. A espectroeletroquímica de 3NO₂TEE, realizada em meio aprótico, foi útil para racionalizar o comportamento eletroquímico de 3NO₂TEE e de seus intermediários gerados durante a redução. Para a construção do biossensor, sobre o eletrodo de carbono vítreo, foram otimizados: concentração de dsDNA, tempo de condicionamento para a redução do nitrocomposto, valor de pH. O biossensor ECV/dsDNA apresentou faixa linear de $60 - 320 \text{ nmol L}^{-1}$ e LD e LQ (limite de quantificação) encontrados foram 58 nmol L^{-1} e 200 nmol L^{-1} . Estes resultados indicaram que o sensor e o biossensor foram produzidos e aplicados de forma eficaz para detecção de substâncias de interesse biológico.

Palavras-Chave: Sensor. Biossensor. Ácido ascórbico. Ácido Úrico. Nitrotirosina, CT-DNA.

ABSTRACT

In this work we developed an electrochemical sensor modified with multi-walled carbon nanotubes and 5-nitroindole (5-NI) for the simultaneous determination of ascorbic (AA) and uric (UA) acids in urine and serum samples and a biosensor based on dsDNA for determination of 3-nitro-L-tyrosine ethyl ester (3NO₂TEE), as a biomarker of biological peroxynitration. The polymer of 5-NI was electrogenerated *in situ* on the carbon nanotubes deposited on glassy carbon electrode (GCE). Thereafter, the aromatic nitro group, present in the molecule, was reduced, generating a hydroxylamine/nitroso redox couple, then used for detection and quantification of the analytes in the biological samples. The electrochemical behavior of the modified electrodes were studied using cyclic voltammetry, differential pulse voltammetry and chronoamperometry, which were used for the detection of the analytes and to obtain the kinetic parameters and the analytical characterization of the platforms. The chronoamperometric studies were performed in order to obtain more information about the redox processes between AA and the sensor, since it proved to be an electrocatalytic process. Thus, by means of graphs and Cottrell equations, it was possible to obtain values for the diffusion coefficient (D_{AA}) and the catalytic constant (k_{cat}) for the AA electrocatalytic oxidation. The values for D_{AA} and k_{cat} , determined for AA were $4.2 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ and $1.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectively. The platform for the detection of AA e AU showed good sensitivity and stability in urine and serum samples, with LOD of $1.9 \mu\text{mol L}^{-1}$ for AA and $2.1 \mu\text{mol L}^{-1}$ for UA. The analytical performance obtained for the nanostructured platform GCE/MWCNT/poly-5-NID justifies its use as a sensor for the simultaneous determination of AA and UA. Studies of 3NO₂TEE in protic media (pH 4.5 acetate buffer and pH 7.4 and 10.0, in phosphate buffer) and in aprotic media (DMF/TBAPF₆, 0.1 mol L^{-1}), using Pt and glassy carbon electrodes, were necessary before the construction of the CT-DNA biosensor. The spectroelectrochemistry of 3NO₂TEE, held in aprotic media was useful for rationalizing the electrochemical behavior of 3NO₂TEE and intermediates generated during the reduction. For the biosensor construction, the amount of dsDNA, the conditioning time for reduction of the analyte, the pH value, on GCE, were optimized. The developed biosensor was used to determine the concentration of 3NO₂TEE and showed a linear range from 60 to 320 nmol L^{-1} and LOD and LOQ of 58 nmol L^{-1} and 200 nmol L^{-1} , respectively. These results indicate that the prepared sensor and biosensor were effective for the detection of substances with biological interest.

Keywords: Sensor. Biosensor. Ascorbic acid. Uric acid. Nitrotyrosine. CT-DNA

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Modelo esquemático dos principais componentes de um sensor eletroquímico.	23
Figura 2	Características desejáveis para o desenvolvimento de sensor.	23
Figura 3	Comparação entre processos de oxidação: (I) direto e (II) indireto ou mediado. (A) e (B) representam o analito no seu estado reduzido e oxidado, respectivamente. Mred e Mox representam um mediador na sua forma reduzida e oxidada confinado na superfície do eletrodo.	25
Figura 4	Representação esquemática: (A) SWCNT e (B) MWCNT.	27
Figura 5	Modificação química de nanotubos de carbono.	27
Figura 6	Representação esquemática de um biossensor.	29
Figura 7	Voltamogramas de pulso diferencial com correção de linha de base para uma mistura equimolar com 20 μM de guanina, adenina, timina e citosina em tampão fosfato, pH 7,4, em carbono vítreo.	31
Figura 8	Mecanismo de oxidação para as bases, (a) guanina e (b) adenina	32
Figura 9	Voltamograma de pulso diferencial obtido com eletrodo de carbono vítreo modificado com DNA ($60 \mu\text{g mL}^{-1}$), tampão acetato (0,1 M), pH 4,5: (a) ssDNA e (b) dsDNA.	33
Figura 10	Mecanismos propostos para a redução eletroquímica do nitrobenzeno em diferentes valores de pH.	36
Figura 11	Mecanismo típico de auto-protonação.	37
Figura 12	(A) estrutura do monômero 5-nitroindol e (B) Estrutura do trímero do 5-nitroindol.	41
Figura 13	Peroxinitrito: formação, reatividade, quantificação e efeitos patogênicos.	45

Figura 14	Reação proposta para nitração da tirosina e os valores de pK_{a1} , pK_{a2} e pK_{a3} .	46
Figura 15	Estrutura dos ácidos <i>L</i> -ascórbico e úrico.	50
Figura 16	Voltamogramas cíclicos de 3NO ₂ TEE ($c = 100 \mu\text{M}$), em DMF/TBAPF ₆ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), (---) primeiro ciclo; (---) Segundo ciclo (A) e (B) corte 1 (---) e corte 2 (---). Faixa de potencial + 0,5 V a -1,2 V. Pt, ν : $0,100 \text{ V s}^{-1}$.	60
Figura 17	Voltamogramas cíclicos de 3NO ₂ TEE ($c = 100 \mu\text{M}$), em DMF/TBAPF ₆ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), Pt. Faixa de potencial 0,5 a -1,2 V (A) e $I_{p\text{lic}}$ vs. $\nu^{1/2}$ (B).	60
Figura 18	Espectro-eletoquímica da 3NO ₂ TEE em meio aprótico (DMF/TBAPF ₆ , $0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Rede de Pt como eletrodo de trabalho; (A) $E = 0,0 \text{ V}$ a $-1,4 \text{ V}$; $\nu = 0,100 \text{ V s}^{-1}$ (---) eletrólito de suporte, (---) primeiro ciclo, (---) segundo ciclo e (B) espectro de UV-Vis, (---) sem aplicação de E , (---) 30, (---) 60, (---) 90 e (---) 120 s em $-0,9 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl/Cl ⁻	62
Figura 19	(A) VC da 3NO ₂ TEE em meio aprótico (DMF/ TBAPF ₆ , $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), $E = 0,5 \text{ V}$ a $-2,5 \text{ V}$, (B) (---) sem TBAOH, (---) $1,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ TBAOH, $\nu = 0,100 \text{ V s}^{-1}$ ECV, $c = 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ 3NO ₂ TEE e (C) espectro no UV-Vis (---) $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ 3NO ₂ TEE e (---) $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ 3NO ₂ TEE com $6,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ TBAOH.	64
Figura 20	Etapas de redução da 3NO ₂ TEE, com auto-protonação, em meio aprótico.	66
Figura 21	Equações de dissociação de 3NO ₂ TEE e respectivos valores de pK_{a1} e pK_{a2} .	67
Figura 22	VC de 3NO ₂ TEE ($c = 100 \mu\text{M}$), em tampão acetato $0,10 \text{ M}$, pH 4,5, (---), tampão fosfato pH 7,4 (---) e 10,0 (---), ECV, $\nu = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. $E = +0,5 \text{ V}$ a $-1,2 \text{ V}$, (B) $E = +1,5 \text{ V}$ a $-1,2 \text{ V}$.	68
Figura 23	VC de 3NO ₂ TEE ($c = 100 \mu\text{M}$), em tampão acetato $0,10 \text{ M}$, pH 4,5, (---), tampão fosfato pH 7,4 (---) e 10,0 (---). $E = -0,5 \text{ V}$ a $+1,5 \text{ V}$, $\nu = 0,100 \text{ V s}^{-1}$, ECV.	69
Figura 24	VC de 3NO ₂ TEE ($c = 100 \mu\text{M}$), $E = 0,5 \text{ V}$ a $-1,2 \text{ V}$, $\nu = 0,010$ a 400 V s^{-1} , pH 4,5 (A e B), 7,4 (C e D) e 10,0 (D e E). ECV. (B, D e F) I_{pc} vs. $\nu^{1/2}$.	70

- Figura 25 VPD de 3NO₂TEE (c = 100 μM), em tampão acetato 0,10 M, pH 4,5, (---), tampão fosfato pH 7,4 (---) e 10,0 (---). E= 0,5 V a -1,2 V, v = 0,005 V s⁻¹, ECV. 71
- Figura 26 Racionalização mecanística da redução eletroquímica da 3NO₂TEE em pH 7,4. 72
- Figura 27 VPD de 3NO₂TEE (c = 100 μM), (A) tampão acetato pH 4,5; (B e C) tampão fosfato pH 7,4 e 10,0. (---) sem condicionamento; (---) 120 s de condicionamento, ECV. v = 0,005 V s⁻¹. (A e B) E= 0,0 V a -1,2 V e (C) E= -0,25 V a +1,5 V. 73
- Figura 28 VPD e VC de 3NO₂TEE (c = 100 μM). (A e C) VPD (---) sem dsDNA, (---) ECV/dsDNA (19,0 mmol L⁻¹). E= 0,5 V a -1,0 V. v = 0,005 V s⁻¹. (B e D) VC (---) scan 1 sem dsDNA e (---) varredura 1 ECV/dsDNA (19,0 mmol L⁻¹). E= 0,5 V a -1,0 V. v: 0,100 V s⁻¹. A e B (pH 4,5) C e D (pH 7,4). 75
- Figura 29 VPD de 3NO₂TEE (c = 100 μM), em tampão acetato 0,10 M, pH 4,5; ECV/dsDNA (57 mmol L⁻¹). (A) Condicionamento Epc = -0,50 V aplicado por: 60 s (---), 120 s (---), 240 s (---) e 300 s (---); E= 0,2 a 1,4 V; (B) I vs. t (s), v = 0,005 V s⁻¹. 76
- Figura 30 VPD de 3NO₂TEE (c = 100 μM), em tampão acetato 0,10 M, pH 4,5; ECV/ dsDNA (Epc= -0,50 V), (A) 120 s e (B) 240 s de condicionamento. (A e B) sem dsDNA (---), 9,5 mmol L⁻¹ (---), 19 mmol L⁻¹ (---), 38 mmol L⁻¹ (---), 57 mmol L⁻¹ (---), 76 mmol L⁻¹ (---) e 95 mmol L⁻¹ (---) de dsDNA; Faixa de potencial: 0,0 V a 1,2 V; (C) ΔIa vs. [dsDNA] e (D) ΔIIa vs. [dsDNA]; 120 s (---) e 240 s (---), v = 0,005 V s⁻¹. 77
- Figura 31 VPD de 3NO₂TEE (c = 100 μM), em tampão fosfato 0,10 M, pH 7,4; ECV/dsDNA (Epc= -0,58 V), (A) 120 s e (B) 240 s de condicionamento. Sem dsDNA(---), 9,5 mmol L⁻¹ (---), 19 mmol L⁻¹ (---), 38 mmol L⁻¹ (---), 57 mmol L⁻¹ (---), 76 mmol L⁻¹ (---) e 95 mmol L⁻¹ (---) de dsDNA; E = 0,0 V a 1,2 V; (C) ΔIa vs. [dsDNA], 120 s (---) e 240 s (---). v = 0,005 V s⁻¹. 78
- Figura 32 VPD de 3NO₂TEE, em tampão fosfato 0,10 M, pH 7,4; ECV/dsDNA (19 mmol L⁻¹), t_{cond} 240s. (A) sem 3NO₂TEE(---), 60 nmol L⁻¹(---), 80 nmol L⁻¹(---), 100 nmol L⁻¹(---), 120 nmol L⁻¹(---), 160 nmol L⁻¹(---), 180 nmol L⁻¹(---), 220 nmol L⁻¹(---), 240 nmol L⁻¹(---), 260 nmol L⁻¹ (---), 300 nmol L⁻¹(---) e 320 nmol L⁻¹(---) 3NO₂TEE; E= 0,0 V a 1,0 V. v=0,005 V s⁻¹; (B) ΔIa vs. [3NO₂TEE]. 80

Figura 33	Formação da dispersão do MWCNT/DMF (1,0 mg mL ⁻¹): (A) MWCNT após o tratamento ácido com 0 min no ultrassom, (B) MWCNT sem tratamento com 0 min no ultrassom, (C) MWCNT após o tratamento ácido e 2 h no ultrassom, (D) MWCNT sem tratamento e 2 h no ultrassom.	86
Figura 34	Espectros Raman para (a) MWCNT, (b) MWCNT funcionalizado.	87
Figura 35	Voltamogramas cíclicos para o processo de eletropolimerização da 5-nitroindol (3,0 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹) em HCl 0,1 mol L ⁻¹ , $\nu = 0,020$ V s ⁻¹ ; ECV/MWCNT (1,0 mg mL ⁻¹).	89
Figura 36	Voltamogramas cíclicos para o processo de ativação do ECV/MWCNT/poli-5-NID, em solução tampão pH 7,0; (A) após a polimerização em scan 1 (---), sem polimerização scan 1 (---), $E = 0,5$ a $-1,0$ V, $\nu = 0,020$ V s ⁻¹ ; (B) ECV/MWCNT/poli-at-5-NID após a polimerização em solução tampão pH 7,0 (---) e sem polimerização (---), $E = -0,4$ a $0,4$ V, $\nu = 0,005$ V s ⁻¹ .	90
Figura 37	Voltamogramas Cíclicos para 100 varreduras de potencial do ECV/MWCNT/ poli-at-5-NID, em solução tampão pH 7,0; $\nu = 0,050$ V s ⁻¹ ; $E = -0,4$ a $0,4$ V vs. Ag AgCl Cl ⁻ .	91
Figura 38	MEV do ECV/MWCNT 8.900x (A) e ECV/MWCNT/poli-at-5-NID 5.06x (B).	92
Figura 39	AFM do ECV (A), ECV/poli-at-5-NID (B), ECV/MWCNT (C) e ECV/MWCNT/poli-at-5-NID (D), 1 x 1 μ m.	93
Figura 40	Espectros de XPS para N 1s, (A) ECV/poli-5-NID e (B) ECV/MWCNT/poli-at-5-NID.	95
Figura 41	Voltamogramas cíclicos de (A) ECV, (B) ECV/poli-at-5-NID, (C) ECV/MWCNT e (D) ECV/MWCNT/poli-at-5-NID. Branco (---), 200 μ M AA (---); 200 μ M AA + 200 μ M AU (---). Tampão fosfato, pH 7,0. $\nu = 0,005$ V.s ⁻¹ .	96
Figura 42	Eficiência eletrocatalítica (EEC) para o ECV/MWCNT/poli-at-5-NID frente ao AA, variando a quantidade de nanotubos. Tampão fosfato, pH 7,0. $\nu = 0,005$ V s ⁻¹ .	98
Figura 43	Eficiência eletrocatalítica (EEC) para o ECV/MWCNT/poli-at-5-NID frente ao AA, variando a concentração da 5-NID. Tampão fosfato, pH 7,0. $\nu = 0,005$ V.s ⁻¹ .	99
Figura 44	Eficiência eletrocatalítica (EEC) para o ECV/MWCNT/ poli-at-5-NID frente ao AA, variando o número de ciclos usado na	100

preparação do sistema ECV/MWCNT/poli-at-5-NID. Tampão fosfato, pH 7,0, $c = 3,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $v = 0,005 \text{ V s}^{-1}$.

- Figura 45 Eficiência eletrocatalítica (EEC) para o ECV/MWCNT/ poli-at-5-NID frente ao AA, variando a velocidade de varredura usada na preparação do sistema ECV/MWCNT/ poli-5-NID. Tampão fosfato, pH 7,0. ($c = 3,0 \text{ mmol.L}^{-1}$), $v = 0,005 \text{ V.s}^{-1}$. 101
- Figura 46 Voltamogramas cíclicos em ECV/MWCNT/poli-at-5-NID, tampão fosfato, pH 7,0 ($v = 0,005 - 0,100 \text{ V s}^{-1}$), $E = -0,4$ a $E = 0,4 \text{ V}$. 102
- Figura 47 Dependência da corrente de pico anódico (I_{pa}) e catódico (I_{pc}), em função da velocidade de varredura em solução tampão fosfato, pH 7,0 ($v = 0,005 - 0,100 \text{ V s}^{-1}$), $E = -0,4$ a $E = 0,4 \text{ V}$. 102
- Figura 48 Voltamogramas Cíclicos em ECV/MWCNT/poli-at-5-NID, tampão fosfato, pH 7,0 ($v = 0,005 - 0,023 \text{ V s}^{-1}$), $E = -0,4$ a $E = 0,4 \text{ V}$, AA ($c = 200 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$). 103
- Figura 49 Variação da corrente de pico anódica I_{pa} vs. $v^{1/2}$ no ECV/MWCNT/poli-at-5-NID, AA ($c = 200 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$). Medidas realizadas em solução tampão fosfato, pH 7,0. $v = 0,003 - 0,023 \text{ V s}^{-1}$. 104
- Figura 50 Variação da corrente de pico anódica normalizada I_{pa}/v vs. v em ECV/MWCNT/ poli-at-5-NID, AA ($c = 200 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$). Medidas realizadas em solução tampão fosfato, pH 7,0, $v: 0,005 - 0,017 \text{ V s}^{-1}$. 105
- Figura 51 Cronoamperogramas obtidos no ECV/MWCNT/ poli-at-5-NID em solução tampão fosfato, pH 7,0 na ausência e presença de AA, $E_{inicial} = +0,050 \text{ V}$ e $E_{final} = -0,100 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl/Cl⁻, respectivamente. 106
- Figura 52 Integração dos cronoamperogramas obtidos ECV/MWCNT/ poli-at-5-NID, em solução tampão fosfato, pH 7,0, $E_{inicial} = +0,050 \text{ V}$ e $E_{final} = -0,100 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl/Cl⁻, respectivamente. 106
- Figura 53 Gráfico de I vs. $t^{1/2}$ obtidos a partir dos cronoamperogramas da Figura 52 em ECV/MWCNT/poli-at-5-NID, tampão fosfato, pH 7,0 na ausência e presença de AA, $E_{inicial} = +0,050 \text{ V}$ e $E_{final} = -0,100 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl/Cl⁻, respectivamente. 107

Figura 54	Gráfico de inclinação ($I/t^{-1/2}$) versus concentração de AA obtidos a partir da Figura 52 do ECV/MWCNT/ poli-at-5-NID, tampão fosfato, pH 7,0, na ausência e presença de AA, $E_{inicial} = +0,050$ V e $E_{final} = -0,100$ V vs. Ag/AgCl, respectivamente.	108
Figura 55	Dependência de I_{cat}/I_{lim} vs. $t^{1/2}$ derivado dos cronoamperogramas da Figura 51 em ECV/MWCNT/poli-at-5-NID, tampão fosfato, pH 7,0, na ausência e presença de AA, $E_{inicial} = +0,050$ V e $E_{final} = -0,100$ V vs. Ag/AgCl, respectivamente.	109
Figura 56	Gráfico da inclinação de I_{cat}/I_{Lim} vs. [AA] em ECV/MWCNT/poli-at-5-NID, tampão fosfato, pH 7,0, na ausência e presença de AA, $E_{inicial} = +0,050$ V e $E_{final} = -0,100$ V vs. Ag/AgCl/Cl ⁻ , respectivamente.	109
Figura 57	Corrente em função do potencial aplicado para o ECV/MWCNT/poli-at-5-NID, AA (A) e AU (B) ($c = 400 \mu\text{mol L}^{-1}$). Tampão fosfato, pH 7,0.	112
Figura 58	Cronoamperogramas (A) para a eletrooxidação de AA e AU no ECV/MWCNT/ poli-at-5-NID, curva analítica para AA (B) e AU (C), tampão fosfato, pH 7,0.	113
Figura 59	VC para a eletrooxidação de AU e AA no ECV/MWCNT/poli-at-5-NID obtidos na presença de urina em tampão fosfato, pH 7,0, (---) urina sem ingestão de AA, (---) urina com ingestão de AA. $v = 0,005$ V s ⁻¹ .	114
Figura 60	Cronoamperogramas para a eletrooxidação de AA e AU em amostras de urina e soro no ECV/MWCNT/ poli-at-5-NID, $E_{aplicado} = + 0,10$ V (AA), $E_{aplicado} = + 0,32$ V (AU). Tampão fosfato, pH 7,0.	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Aplicação de diferentes nitroaromáticos como mediadores redox.	38
Tabela 2	Espécies reativas de nitrogênio (ERN), oxigênio (ERO) e seus potenciais formais (E^0).	43
Tabela 3	Diferentes métodos para detecção de 3-NT em amostras biológicas.	47
Tabela 4	Faixas de concentração de 3-NT encontrados em diferentes amostras biológicas.	48
Tabela 5	Valores de rugosidade média para ECV, ECV/poli-5-NID, ECV/MWCNT e ECV/MWCNT/poli-at-5-NID.	94
Tabela 6	Potenciais de oxidação do AA e AU, em diferentes sistemas por voltametria cíclica em solução tampão fosfato pH 7,0.	97
Tabela 7	Comparação dos valores de k_{cat} para diferentes eletrodos modificados.	110
Tabela 8	Determinação de AA e AU em amostras de urina e soro.	116
Tabela 9	Determinação de AA e AU em diferentes amostras biológicas.	116
Tabela 10	Determinação de ácido ascórbico e ácido úrico em diferentes plataformas.	118

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

- α - Coeficiente de transferência de elétrons
 σ - Desvio padrão
 v - Velocidade de varredura de potencial
 ΔI - Variação de corrente
3NO₂TEE - Éster etílico da 3-nitro-L-tirosina
3-NT - 3-Nitro-L-tirosina
5-NID - 5-nitroindol
A - Área geométrica do eletrodo
AA - Ácido ascórbico
AFM – Microscopia de Força Atômica
AU - Ácido úrico
 b - Coeficiente angular
CG - Cromatografia gasosa
CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência
D - Coeficiente de difusão
DMF - Dimetil formamida
dsDNA - Ácido desoxirribonucleico de fita dupla
 E – Potencial
EC - Eficiência catalítica
ECV - Eletrodo de carbono vítreo
 E_p - Potencial de pico
 E_{pa} - Potencial de pico anódico
 E_{pc} - Potencial de pico catódico
EQM - Eletrodo quimicamente modificado
ERN - Espécie reativa de nitrogênio
ERO - Espécie reativa de oxigênio
F - Constante de Faraday
 I – Corrente
 i_{pa} - Corrente de pico anódico
 i_{pc} - Corrente de pico catódico

k_{cat} - Constante de velocidade da reação
LOD - Limite de detecção
LOQ - Limite de quantificação
MEV - Microscopia eletrônica de varredura
 M_{oxi} - Mediador oxidado
 M_{red} - Mediador reduzido
MWCNT - Nanotubos de carbono de paredes múltiplas
 n - Número de elétrons
NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NTC - Nanotubos de carbono
poli-at-5-NID - Polímero ativado da 5-nitroindol
ssDNA - Ácido desoxirribonucleico de fita simples
SWCNT - Nanotubos de carbono de paredes simples
VC - Voltametria cíclica
VOQ - Voltametria de onda quadrada
VPD - Voltametria de pulso diferencial
XPS – Espectroscopia fotoeletrônica por raios-X

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	Considerações gerais	20
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1	Sensores eletroquímicos.....	22
2.2	Eletrodos modificados.....	24
2.2.1	Uso de nanotubos de carbono na construção de sensores eletroquímicos.....	26
2.2.2	Biossensores de DNA	28
2.3	Nitroaromáticos	34
2.3.1	Uso de 5-Nitroindol para a construção de sensor eletroquímico.....	41
2.4	Espécies reativas de nitrogênio e oxigênio	42
2.4.1	Importância da detecção da 3-Nitro- <i>L</i> -tirosina.....	46
2.5	Importância da determinação dos ácidos ascórbico e úrico.....	49
3	OBJETIVOS	52
3.1	Geral	52
3.2	Específicos	52
4	EXPERIMENTAL (PARTE 1)	53
4.1	Regentes	53
4.2	Equipamentos e materiais	53
4.3	Preparação de solução estoque da 3NO ₂ TEE.....	54
4.4	Técnicas eletroquímicas	54

4.4.1	Voltametria cíclica	54
4.4.2	Voltametria de pulso diferencial	54
4.5	Limpeza do eletrodo de carbono vítreo (ECV)	55
4.6	Estudos eletroquímicos da 3NO₂TEE	55
4.7	Preparação da solução tampão acetato	55
4.8	Preparação do gel de dsDNA	56
4.9	Condicionamento e preparação do biossensor de dsDNA	56
4.10	Estudos em meio aprótico do éster etílico da 3-nitro-L-tirosina	57
4.10.1	Análise eletroquímica por VC	57
4.10.2	Espectroeletroquímica	57
4.10.3	Estudo da interação do éster etílico da 3-nitro-L-tirosina com hidróxido de tetrabutilamônio.....	58
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO (PARTE 1)	59
5.1	Estudos eletroquímicos da 3NO₂TEE em meio aprótico em eletrodo de pt.....	59
5.2	Espectroeletroquímica da 3NO₂TEE, em meio aprótico	61
5.3	Estudo da interação da 3NO₂TEE e TBAOH em meio aprótico	63
5.4	Racionalização mecanística para a redução em meio aprótico da 3NO₂TEE	65
5.5	Estudos eletroquímicos da 3NO₂TEE em meio prótico	67
5.6	Estudos eletroquímicos 3NO₂TEE com dsDNA	74
5.6.1	Estudo da interação da 3NO ₂ TEE em biossensor de DNA	74
5.7	Determinação da curva analítica	79
6	EXPERIMENTAL (PARTE 2)	82

6.1	Reagentes.....	82
6.2	Preparação das soluções estoque do AA e AU	82
6.3	Equipamentos para estudos eletroquímicos	82
6.4	Limpeza do eletrodo de carbono vítreo (ECV)	83
6.5	Tratamento dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT)	83
6.6	Estudo da eficiência eletrocatalítica (EEC) frente ao AA	84
6.6.1	Preparação das dispersões de MWCNT	84
6.6.2	Preparação das soluções de 5-NID	84
6.6.3	Variação do número de ciclos para a polimerização	84
6.6.4	Variação da velocidade de varredura para a polimerização.....	84
6.7	Preparação do sensor com MWCNT e 5-NID	85
6.8	Emprego do ECV/MWCNT/poli-at-5-NID na análise de AA e AU.....	85
6.9	Emprego do ECV/MWCNT/poli-at-5-NID em amostras de urina e soro.....	85
7	RESULTADOS E DISCUSSÃO (PARTE 2)	86
7.1	Dispersão dos nanotubos de carbono em DMF.....	86
7.2	Caracterização dos nanotubos funcionalizados.....	87
7.2.1	Espectroscopia Raman para MWCNT	87
7.3	Preparação do eletrodo modificado com o 5-nitroindol (5-NID)	88
7.4	Polimerização eletrooxidativa	88
7.5	Eletroativação do ECV/MWCNT/poli-5-NID	89

7.6	Estudo da estabilidade do ECV/MWCNT/poli-at-5-NID	90
7.7	Caracterização estrutural por Microscopia eletrônica de varredura do ECV/MWCNT e ECV/MWCNT/poli-at-5-NID	91
7.8	Microscopia de força atômica do ECV, ECV/poli-at-5-NID, ECV/MWCNT e ECV/MWCNT/poli-at-5-NID	92
7.9	Espectroscopia fotoeletrônica de raios-X (XPS)	94
7.10	Oxidação eletrocatalítica de AA e AU	95
7.11	Otimização dos parâmetros de ativação.....	97
7.12	Características cinéticas do ECV/MWCNT/ poli-at-5-NID.....	101
7.13	Estudos cronoamperométricos	105
7.14	Detecção amperométrica de AA	111
7.15	Análise de urina e soro para determinação de AA e AU	114
7.16	Teste de recuperação	115
7.16.1	Detecção amperométrica para determinação de AA e AU em amostra de soro e urina	115
8	CONCLUSÃO	120
	REFERÊNCIAS	121
	ANEXO	132

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

A eletroquímica é a ciência das reações de transferência de carga elétrica, que ocorrem sob a influência de um gradiente de potencial eletroquímico. A transferência de elétrons (TE) pode ocorrer homoganeamente, em solução, ou heterogeneamente na superfície de eletrodos. Sendo assim, os métodos eletroquímicos fazem uso da medida de uma propriedade elétrica, isto é possível, uma vez que muitas espécies químicas possuem a capacidade de sofrer reações de oxirredução, quando em contato com a superfície do eletrodo [BARD e FAULKNER, 2001; BRETT e BRETT, 2000].

Desse modo, as técnicas eletroquímicas podem ser empregadas em muitos campos das ciências naturais e tecnologias, associadas para a identificação e determinação de espécies de interesse biológico, farmacêutico e industrial, como se pode verificar pelas diversas obras publicadas nos últimos anos ou pelas revisões sobre métodos eletroquímicos de análises [JAHANBAKHSHI, 2016; WANG, 2000; BRETT, 1996; TAN, 2013; GIL, 2013; BOND, 1999; DICK, 1997; ARANDA, et al., 2005; SHRIVASTAVA, 2013; THAPLIYAL, 2015; AKBAR, 2016; HASANZADEH, 2013; AFKHAMI, 2016; KISS et al., 2016; LENIART, 2016; HÁJKOVÁ, 2016]. O emprego das técnicas como a voltametria e a amperometria merecem destaque, principalmente quando acopladas com análise em fluxo, cromatografia de alta eficiência e com eletroforese capilar [WIECZOREK, 2016; STANKOVIC, 2016; NASRAOUI, 2010; SAĞLAM, 2016; TROJANOWICZ, 2009; JIN, 1997].

Um dos parâmetros avaliados nos processos de transferência de elétrons é o potencial de redução. Trabalhos disponíveis na literatura estabelecem correlações entre E_{pc} (potencial de redução ou de pico catódico), em meio prótico e aprótico e atividades biológicas, demonstrando a relevância dos estudos eletroquímicos como ferramentas na elucidação de mecanismos de ação de vários fármacos contra diversas doenças, na previsão e planejamento de compostos biologicamente ativos [HILLARD et al., 2008; KOVACIC, 2014, SQUELLA et al., 2005].

Dentre os compostos com atividades biológicas, destacam-se os nitrocompostos. Esses compostos apresentam vias metabólicas bem delineadas

envolvendo mecanismos de transferência de elétrons catalisados por enzimas redutases que levam à formação de produtos de redução sequencial, como ânion radical nitro (Ar-NO_2^-), nitroso (Ar-NO), hidroxilamina (Ar-NHOH) e amina (Ar-NH_2) [PAULA et al., 2009; ANDRES, 2013; KOVACIC, 2014, SQUELLA et al., 2005].

Adicionalmente, alguns autores têm explorado o par redox hidroxilamina/nitroso eletrogerado na superfície do eletrodo como ferramenta para a construção de sensores para avaliação de substâncias de interesse biológico [LIMA et al., 2008; MUNTEANU et al. 2004; LIMA et al., 2009; SANTHIAGO et al., 2010].

Diante das boas características apresentadas por sensores à base de nitrocompostos como baixos limites de detecção e quantificação, estabilidade e reprodutibilidade, o presente trabalho teve como foco a construção de um sensor eletroquímico com 5-nitroindol, pois o mesmo apresenta um grupo nitro, o qual pode ser ativado eletroquimicamente *in situ*, por meio de redução irreversível de quatro elétrons do grupo nitro (NO_2) à hidroxilamina (NHOH). A hidroxilamina resultante pode ser oxidada reversivelmente ao correspondente composto nitroso (NO), formando, portanto, o par redox NO/NHOH na superfície eletródica, por meio de um processo redox de $2e^-/2H^+$ [SANTHIAGO et al., 2010]. Adicionalmente, a presença do grupo indol mostra-se favorável para processos de polimerização, com alguma semelhança ao pirrol, o que impede um dos obstáculos mais conhecidos para o uso de mediadores em superfícies eletródicas: a lixiviação. Desta forma, apresenta-se, na presente tese, o desenvolvimento de um sensor eletroquímico nanoestruturado a base de nanotubos de carbono e um filme polimérico eletrogerado *in situ* a partir do 5-nitroindol para detecção simultânea de AA e AU em amostras de urina e soro.

Outro objetivo do presente estudo foi a análise do comportamento eletroquímico em meios prático e aprótico do éster etílico da 3-nitro-L-tirosina ($3\text{NO}_2\text{TEE}$), bem como a construção de um biossensor de DNA para a sua determinação. É importante ressaltar que a nitrotirosina é um marcador biológico de amplo uso, relacionado à peroxinitração, em diagnóstico para doenças cardiovasculares, entre outras. Não existem relatos na literatura, da utilização de biossensor de DNA para determinação da 3-nitro-L-tirosina e seus derivados.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Sensores eletroquímicos

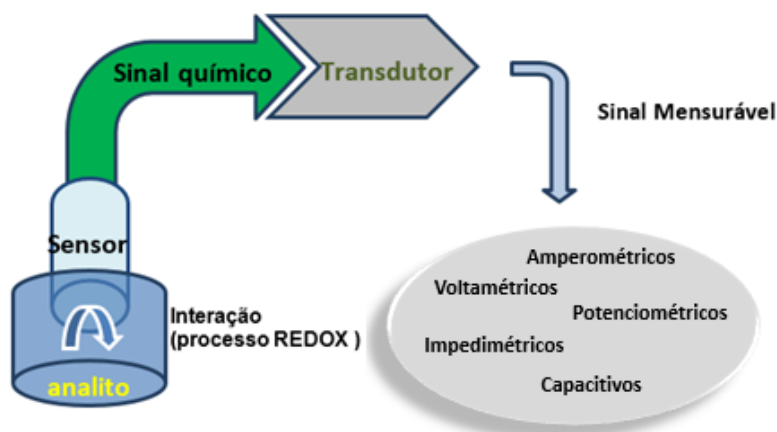
Os sensores são dispositivos que podem reconhecer um ou mais analitos por meio de uma reação química na interface sensor-amostra, podendo ser aplicados para amostras de origem biológica ou não [CAPELETTI, 2010; SANTHIAGO et al., 2010]. Estes dispositivos também podem eliminar a necessidade de tratamento prévio da amostra nas diferentes matrizes, sejam elas, de origem biológica, ambiental ou farmacológica.

Sensores consistem de um elemento de transdução, recoberto com uma camada de um elemento de reconhecimento para modificação da superfície, seja químico ou biológico. Esta camada interage com o analito e a mudança química resultante desta interação é traduzida pelo elemento de transdução em sinal elétrico [LOWINSOHN, 2006].

As informações obtidas no instrumento de medida podem estar relacionadas a uma reação química ou mesmo a uma propriedade química do analito. Além do transdutor, os sensores apresentam outras partes básicas: o receptor ou a fase sensora - região de reconhecimento, onde ocorre a reação química seletiva e o condutor. A fase sensora pode ser um corante ácido/básico, um trocador iônico, uma substância redox, uma substância fluorescente, um anticorpo, uma enzima, um receptor, DNA, fita simples ou dupla, entre outros. O transdutor pode ser classificado como: calorimétrico (calor), eletroquímico (corrente, condutividade, potencial), óptico (absorção, fluorescência, reflectância) ou piezoelétrico (alteração de massa) [THÉVENOT et al., 2001].

Na Figura 1, é possível observar um modelo esquemático dos principais componentes de um sensor eletroquímico, mostrando o caminho desde a interação do analito com a fase sensora, até a obtenção da resposta tanto qualitativa quanto quantitativa.

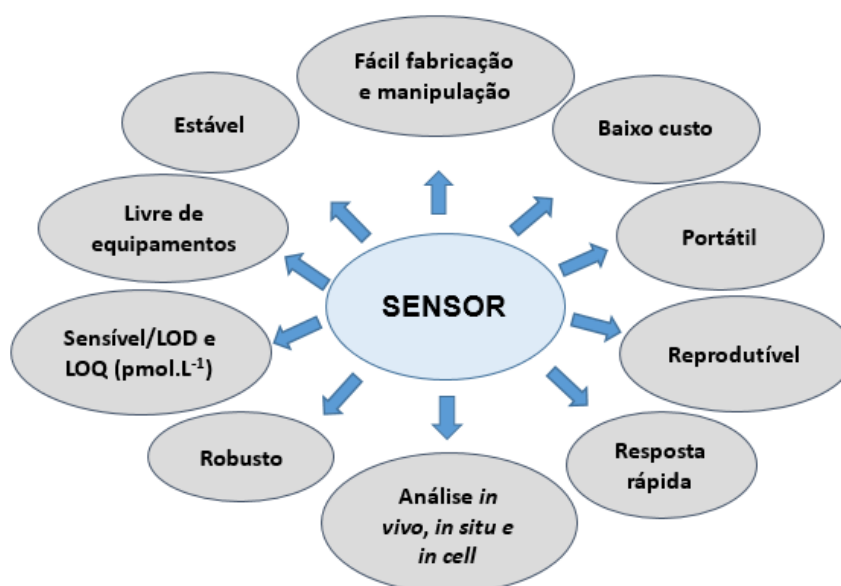
Figura 1. Modelo esquemático dos principais componentes de um sensor eletroquímico.



Fonte: Autor desta tese, 2016.

Os sensores eletroquímicos devem ter características analíticas relevantes, como robustez, alta seletividade, especificidade, reprodutibilidade, estabilidade, rapidez na obtenção dos resultados, limite de detecção e quantificação baixos, baixo custo de produção, facilidade de operação e de aprendizagem, portabilidade, independente de equipamentos dispendiosos, além da possível aplicação *in vivo*, *in situ* e *in cell* (Figura 2) [NIKOLAEV et al., 2015; TORKASHVAND et al., 2015; ZAIDI e SHIN, 2014; FAN et al., 2016].

Figura 2. Características desejáveis para o desenvolvimento de sensor.



Fonte: Autor desta tese, 2016.

2.2 Eletrodos modificados

O termo eletrodo quimicamente modificado (EQM) foi introduzido na eletroquímica por Murray e colaboradores em 1975 [MOSES *et al.*, 1975] para designar eletrodos com espécies quimicamente ativas, deliberadamente imobilizadas em suas superfícies, com o objetivo de pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo/solução. A modificação da superfície do eletrodo, sendo uma forma de impor e controlar sua reatividade e/ou seletividade, possibilita o desenvolvimento de eletrodos para vários propósitos e aplicações.

Os primeiros trabalhos envolvendo a preparação de eletrodos com superfícies modificadas surgiram no início da década de 70. Lane e Hubbard adsorveram na superfície de eletrodos de platina, várias olefinas funcionalizadas, explorando a propensão de grupos alcenos quimisorverem-se sobre este metal, verificando a capacidade do ácido 3-alil-salicílico coordenar ao ferro seletivamente, em função do potencial aplicado [LANE e HUBBARD, 1973].

A modificação química de eletrodos é um campo de interesse crescente em química analítica. Já na eletroquímica, foi demonstrado que eletrodos quimicamente modificados possuem vantagens distintas, em relação aos eletrodos convencionais em muitas áreas de aplicação, que incluem eletrocatalise e sensores eletroquímicos redox [BARSAN *et al.*, 2015; LUZ *et al.*, 2004; PEREIRA *et al.*, 2002].

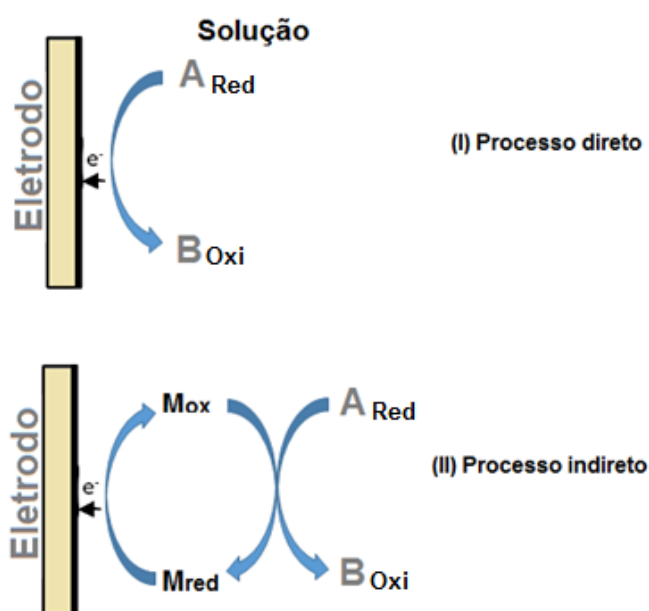
A grande maioria das aplicações analíticas de EQMs envolve técnicas voltamétricas ou amperométricas. Do ponto de vista analítico, a sensibilidade e/ou a seletividade de uma determinação deve aumentar com a utilização de um EQM para que seu uso seja justificado. Isto pode ser obtido por meio de um ou mais dos seguintes fenômenos: pré-concentração, eletrocatalise e exclusão de interferentes. Em geral, a obtenção de sensibilidades mais altas ocorre por pré-concentração da espécie de interesse ou por eletrocatalise, sendo que a aplicação de qualquer um destes princípios resulta em inerente aumento da seletividade [PEREIRA *et al.*, 2002].

Em relação à eletrocatalise, o objetivo é reduzir a energia de ativação em uma reação envolvendo transferência de elétrons. A oxidação ou redução de um

substrato que apresenta uma cinética de transferência de elétrons lenta, à superfície do eletrodo, é mediada por um sistema redox que pode trocar elétrons mais rapidamente com o eletrodo e o substrato (processo EC - eletroquímico-químico) ou na ordem inversa (processo CE-químico-eletroquímico), reduzindo o sobrepotencial de ativação. A redução do sobrepotencial de ativação aumenta a seletividade da medida porque permite a aplicação de potenciais de operação menos positivos ou menos negativos, sendo que a especificidade está inversamente relacionada à magnitude do potencial aplicado, reduzindo, ou mesmo eliminando, a possibilidade de que os potenciais de eletrólise de outras espécies presentes sejam atingidos [ONI et al., 2005].

Os mediadores redox podem ser espécies orgânicas (nitrocompostos, quinonas, etc), compostos organometálicos (ferrocenos, ftalocianinas, metaloporfirinas, etc) ou enzimas. Estas espécies atuam em solução ou no caso de EQMs, imobilizadas à superfície do eletrodo, facilitando a transferência de elétrons entre o analito e a superfície do eletrodo. Na Figura 3 é mostrado o processo de oxidação eletroquímica em um sistema mediado e não mediado [CHOUKAIRI et al., 2015; SILVA et al., 2012].

Figura 3. Comparação entre processos de oxidação: (I) direto e (II) indireto ou mediado. (A) e (B) representam o analito no seu estado reduzido e oxidado, respectivamente. Mred e Mox representam um mediador na sua forma reduzida e oxidada confinado na superfície do eletrodo.



Fonte: Autor desta tese, 2016.

No processo direto (I), ilustrado na figura 3, o analito no seu estado reduzido se aproxima da superfície do eletrodo por difusão e sofre oxidação na interface eletrodo-solução. Desta forma, se (A) for ácido ascórbico, o processo só irá ocorrer em elevados sobrepotenciais. No entanto, quando um mediador redox está presente na superfície do eletrodo (II) a conversão de (A) em (B) ocorre através de transferência de elétrons homogênea, com o mediador e não diretamente na superfície do eletrodo. Neste caso, a forma oxidada do mediador atua como um receptor de elétrons e oxida o analito. Em alguns casos, mesmo na presença de um mediador redox, não ocorre deslocamento catódico do potencial de oxidação do analito, mas a corrente associada ao processo é maior e promove, portanto, um ganho de sensibilidade [TAN et al., 2003; CHOUKAIRI et al., 2015; SILVA et al., 2012].

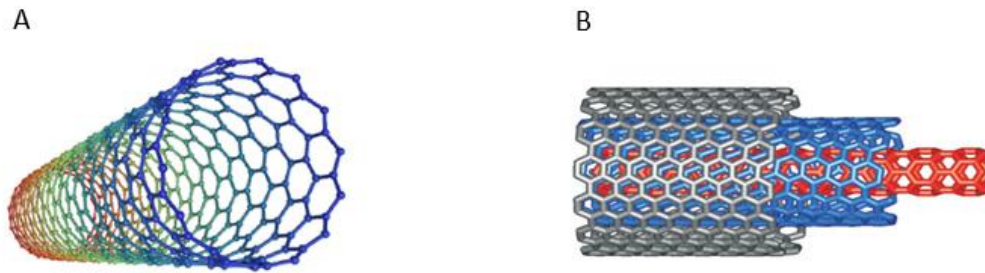
Na construção de sensores, os mediadores podem ser imobilizados tanto por aplicação direta, quanto pela formação de ligação química na superfície do eletrodo por diferentes métodos.

2.2.1 Uso de nanotubos de carbono na construção de sensores eletroquímicos

Os nanotubos de carbono (NTCs) são macromoléculas em forma de cilindro com um raio de alguns nanômetros [BALASUBRAMANIAN e BURGHARD, 2005]. Eles têm características intrínsecas, como estrutural, mecânica, eletrônica, estabilidade térmica e química, alta resistência, elasticidade, elevada área superficial e boa condutividade elétrica [WANG, 2005]. Todas estas propriedades tornam os nanotubos de carbono, um material especial para ser usado em dispositivos eletroquímicos.

Vários estudos centraram-se na síntese, purificação, a suspensão e funcionalização da superfície do NTCs. Dependendo dos métodos de síntese, os nanotubos de carbono podem ser produzidos como nanotubos de carbono de parede simples (single walled carbon nanotubes–SWCNT) Figura 4A, ou nanotubos de carbono de paredes múltiplas (multi-walled carbon nanotubes–MWCNTs) Figura 4B [BALASUBRAMANIAN e BURGHARD, 2005].

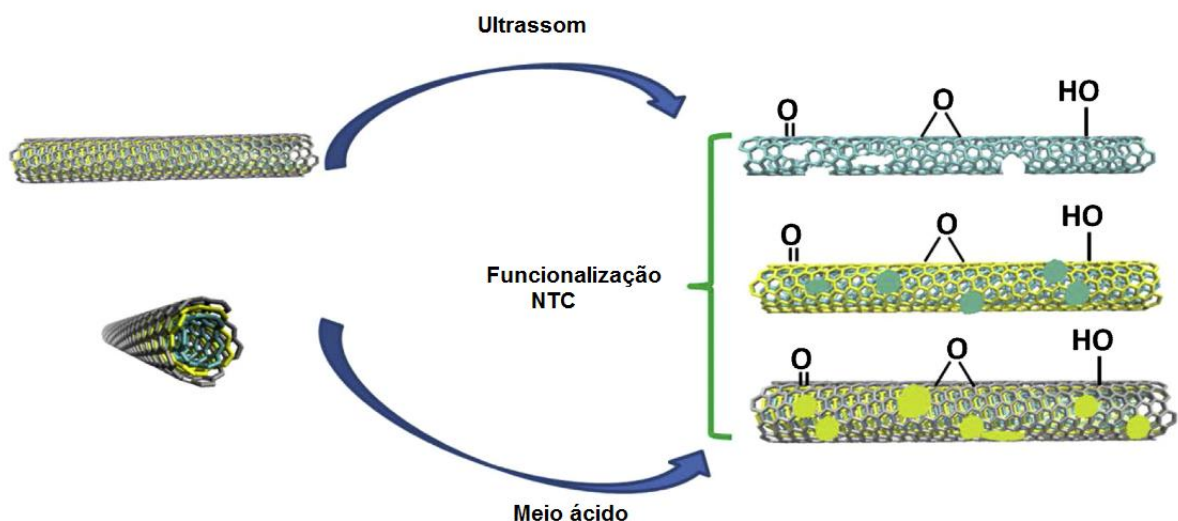
Figura 4. Representação esquemática: (A) SWCNT e (B) MWCNT.



Fonte: Adaptado de BALASUBRAMANIAN e BURGHARD, 2005.

Algumas propriedades desses nanotubos de carbono podem ser melhoradas a partir da funcionalização deste material como, por exemplo, por meio um pré-tratamento ácido (Figura 5). O tratamento causa mudanças na morfologia do NTC, diminuindo assim o tamanho e abrindo as extremidades bloqueadas dos nanotubos. Também, observou-se que as etapas de funcionalização podem aumentar o número de defeitos na estrutura da parede lateral dos nanotubos. Além disso, o tratamento dos NTCs pode causar o aparecimento de grupos funcionais oxigenados nas bordas dos NTCs [KIM e SIGMUND, 2004; GOULART, MORAES e MASCARO, 2016; BALASUBRAMANIAN e BURGHARD, 2005; LI e LEE, 2017].

Figura 5. Modificação química de nanotubos de carbono.



Fonte: Adaptado de LI e LEE, 2017.

Entre as aplicações dos NTCs pode-se citar a utilização como catalisadores materiais compósitos, sensores, filmes condutores, materiais nanobiotecnológicos e dispositivos nanoeletrônicos [PAN et al., 2007; CALVERT, 1999].

Por possuir um tamanho extremamente reduzido, alta condutividade, alta resistência mecânica e ser extremamente elástico, os NTCs se caracterizam como um material fundamental na construção de eletrodos. MWCNTs foram utilizados primeiramente para essa finalidade, atuando na promoção de uma reação bioeletroquímica [DAVIS et al., 1997]. Eletrodos utilizando SWCNTs também foram construídos com sucesso e apresentaram excelentes propriedades eletroquímicas [CAMPBELL e CROOKS, 1999].

A utilização de NTCs em eletrodos vem crescendo significativamente, principalmente no que diz respeito à sua utilização como substrato e agente modificador em eletrodos quimicamente modificados.

No entanto, apesar das grandes vantagens apresentadas acima, os nanotubos não suprem todas as necessidades em uma área tão crescente e promissora como a área de eletroanalítica, que a cada dia tem maiores desafios analítico-ambientais e analítico-biológicos, que requerem altas precisão e exatidão, bem como, o crescente número de analitos de interesse. Neste ponto, os EQMs, surgem como uma ferramenta eletroanalítica que se propõe a resolver ou amenizar e abranger tais dificuldades.

2.2.2 Biossensores de DNA

O desenvolvimento de biossensores têm impactado uma grande variedade de áreas de interesse científico e tecnológico, como por exemplo no campo da medicina ou saúde, análise de alimentos, investigação forenses e aplicações ambientais [RADKE; ALOCILJA, 2005; WANG, 2006; De OLIVEIRA; COSTA; Da FONSECA, 2006; MASCINI; TOMBELLI, 2008, GASTER et al., 2009, SHARMA et al., 2013; SINGH et al., 2014].

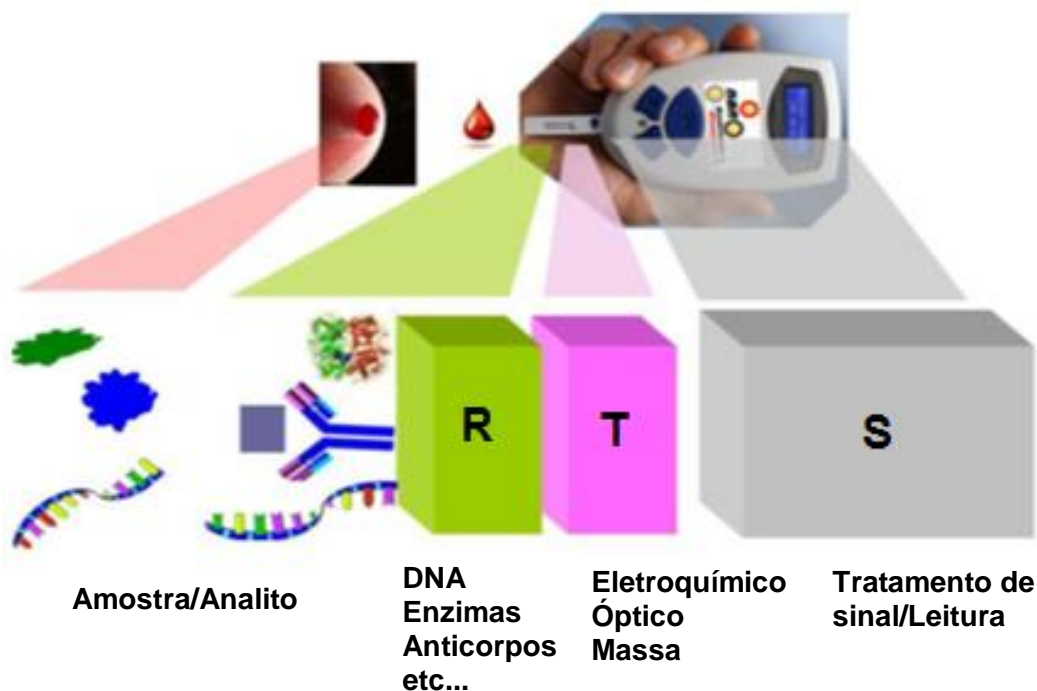
A aplicação da biotecnologia em medicina tem sido relevante nos últimos tempos, pois, ela pode levar à descoberta de novas formas de diagnosticar, tratar e

prevenir uma variedade de doenças. Técnicas desenvolvidas como biossensores, sondas de DNA e chips de DNA, constituem ferramentas úteis com possibilidades de serem usadas no diagnóstico [De OLIVEIRA, 2006]. No campo da Biotecnologia destaca-se o uso de biossensores eletroquímicos.

Um biossensor é um pequeno dispositivo que possui propriedades biológicas de reconhecimento para uso em bioanálise. Cada dispositivo conta com um elemento de reconhecimento biológico ligado a um transdutor físico que converte o sinal biológico em sinal elétrico, sendo proporcional à concentração do analito [DICULESCU et al., 2005; WANG, 2006; SHARMA, et al., 2003].

Para o desenvolvimento de um biossensor é essencial a presença de elementos sensíveis, os quais podem ser células inteiras, anticorpos, enzimas ou ácidos nucleicos que irão formar a camada de reconhecimento que estará integrada com o transdutor, via imobilização por adsorção, ligação cruzada ou covalente (Figura 6) [RAUF, 2005].

Figura 6. Representação esquemática de um biossensor.



Fonte: Adaptado de MERKOÇI, 2016.

Os biossensores eletroquímicos combinam o poder analítico de métodos eletroquímicos com a especificidade do processo de reconhecimento biológico [PALEČEK et al., 1998]. Eles são classificados em amperométricos, condutimétricos e potenciométricos, desenvolvidos com o intuito de diagnosticar as diversas doenças. Uma das biomoléculas mais importantes é sem dúvida o ácido desoxirribonucléico (DNA) [De OLIVEIRA, 2006].

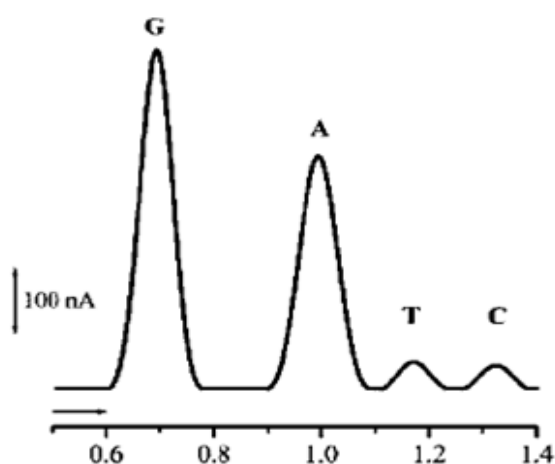
O DNA é uma macromolécula estruturalmente polimórfica que, dependendo da sequência de nucleotídeos e/ou condições ambientes, pode adotar uma variedade de conformações. A estrutura de dupla hélice de DNA consiste de duas fitas, formadas por grupos fosfatos e pentoses ligadas alternadamente por uma ponte fosfodiéster. Ele é responsável pela informação hereditária, coordena a síntese biológica de proteínas e enzimas através de processos de transcrição e replicação da informação genética em células vivas [RAUF et al., 2005]. Esta capacidade é garantida pela manutenção específica das suas bases púricas (guanina e adenina) e pirimidinas (citosina e timina) [BRETT, 2004].

Os biossensores de DNA têm sido aplicados com sucesso tanto para determinação eletroanalítica de fármacos, quanto para o estudo da interação dos mesmos com o DNA [RAUF et al., 2005]. Nesses dispositivos, o analito se insere entre as fitas do DNA modificando sua conformação levando a exposição das bases, que por sua vez, serão passíveis de oxidação [MONTANARI, 2009].

As técnicas analíticas usuais requerem muitas etapas, tempo e equipamentos caros, ao passo que os biossensores são rápidos, simples, econômicos e podem ser usados em áreas remotas onde a facilidade do uso de instrumentos sofisticados não está disponível [WANG et al., 2001].

A eletrooxidação do DNA, em meio ácido, está relacionada à oxidação dos resíduos das bases púricas (adenina e guanina), sendo as bases pirimídicas (timina e citosina) eletroinativas nessas condições. De modo geral, em pH 7,4, guanina é oxidada em +0,7 V (vs. Ag/AgCl) e adenina em +0,97 V [BOUSSICAULT e ROBERT, 2008] (Figura 7).

Figura 7. Voltamogramas de pulso diferencial com correção de linha de base para uma mistura equimolar com 20 μM de guanina, adenina, timina e citosina em tampão fosfato, pH 7,4, em carbono vítreo.

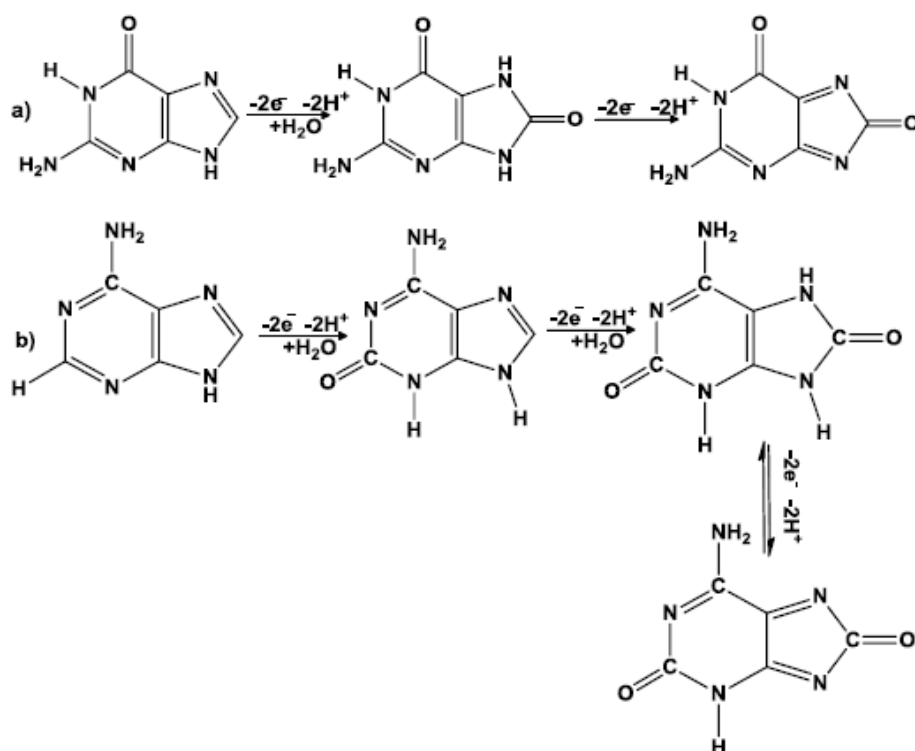


Fonte: Adaptado de BOUSSICAULT e ROBERT, 2008.

Sob diversas condições, as moléculas de DNA são propensas a vários danos, fundamentalmente ao interagirem com algumas moléculas levando à alteração na sequência específica das bases o que provoca perturbações moleculares, que levam ao mau funcionamento da célula e alterações patológicas nos organismos vivos [DICULESCU, 2004; YOLA; ÖZALTIN, 2011]. Os radicais livres e exposição à radiação ionizante provoca danos oxidativos ao DNA gerando vários produtos na estrutura da dupla hélice tais como 8-oxoguanina, 2,8-oxoadenina, etc., que são mutagênicos [DICULESCU, 2004].

Genericamente, dos trabalhos realizados sobre reações eletroquímicas dos ácidos nucléicos, apenas as bases guanina (G) e adenina (D) mostraram sofrer oxidação na superfície do eletrodo, cujo mecanismo segue dois passos envolvendo a perda total de quatro elétrons e quatro prótons para a guanina e seis elétrons e seis prótons para a adenina (Figura 8) [WANG; LIU; DONG, 2001].

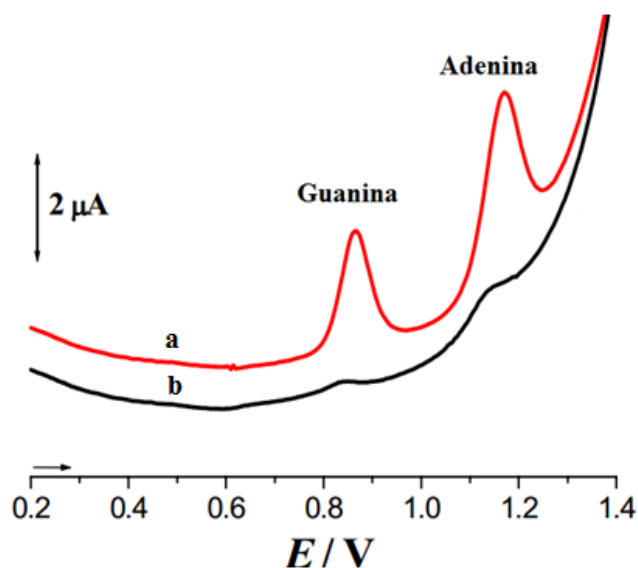
Figura 8. Mecanismo de oxidação para as bases, (a) guanina e (b) adenina



Fonte: Adaptado de WANG, LIU e DONG, 2001.

A Figura 9 mostra os voltamogramas de oxidação das fitas dupla (dsDNA) e simples (ssDNA), onde é possível notar a presença de duas ondas anódicas referentes as bases guanina e adenina. Contudo, as correntes de pico das bases no dsDNA, apresentam um valor inferior em relação à das bases do ssDNA, ilustrando uma dificuldade significativa quanto à transferência de elétrons a partir do interior da estrutura rígida da cadeia dupla para a superfície de eletrodo, contrariamente à estrutura flexível da cadeia simples que apresenta suas bases oxidáveis próximas à superfície do eletrodo [DICULESCU et al., 2005].

Figura 9. Voltamograma de pulso diferencial obtido com eletrodo de carbono vítreo modificado com DNA ($60 \mu\text{g mL}^{-1}$), tampão acetato ($0,1 \text{ M}$), pH 4,5: (a) ssDNA e (b) dsDNA.



Fonte: Adaptado de DICULESCU; PAQUIM; BRETT, 2005.

Existem várias possibilidades pelas quais moléculas pequenas ou fármacos podem seletivamente se ligar ao DNA, destacando-se a intercalação; ligação em fendas maiores e/ou menores; alquilação, etc. [PINDUR; JANSEN; LEMSTER, 2005]. Na intercalação, a substância é inserida entre os pares (fitas) do DNA, ocorrendo simultaneamente o desenrolamento e alongamento da dupla hélice enquanto a ligação em fendas ocorre covalentemente ou por interações eletrostáticas sem perturbar a estrutura dupla de DNA em grande extensão [De ABREU, 2008].

O uso de biossensores de DNA tem tido várias aplicações para fins eletroanalíticos na determinação de metais pesados (Hg^{2+} , Ag^+ , Cu^{2+} e Pb^{2+}) [SAIDUR et al., 2016], HIV [GONG et al., 2017], da capacidade anti-oxidante [BARROSO et al., 2016], de toxinas produzidas por bactérias [LOW et al., 2017; HAJIHOSSEINI et al., 2016], de proteínas, de fármacos anti-câncer, de radicais livres, de radiação, entre outros [DILESCU et al., 2016].

2.3 Nitroaromáticos

Do ponto de vista biológico, os nitroaromáticos formam uma classe importante de compostos biologicamente ativos, despertando, dessa forma, forte interesse na investigação da sua ação molecular como fármacos e/ou candidatos a fármacos, utilizando diversos métodos de análise [ANDRES et al., 2013].

Os nitrocompostos têm uma aplicação diversificada, constituindo matéria prima para a síntese de medicamentos, corantes, perfumes, fertilizantes, plásticos, explosivos e na construção de sensores. O maior interesse nessa classe de compostos fundamenta-se na dualidade da sua ação biológica, pois, por um lado são avaliados como compostos nocivos e por outro lado como compostos com ação medicinal, atraindo assim atenção ao longo de décadas [BADGUDJAR et al., 2007]. Muitos são mutagênicos e alguns são cancerígenos [PUROHIT; BASU, 2000; KOVACIC; SOMANATHA, 2014]; outros são medicamentos importantes [ANDRES, 2013; KOVACIC, 2014]. Em particular, vários nitroaromáticos são amplamente utilizados como agentes antimicrobianos para o tratamento de infecções protozoárias anaeróbias potencialmente graves como tricomoníase, amebíase, giardíase, doenças de chagas, etc., e infecções bacterianas [TOCHER, 1997; VALDEZ et al., 2009; LÖFMARK et al., 2010; TOWNSON et al., 1994; LI et al., 2007; BUSATTI et al., 2013].

Estudos eletroquímicos de nitrocompostos datam do início de 1900, quando Haber reportou as etapas envolvidas na redução do nitrobenzeno, entretanto, este grupo de compostos continua a gerar interesse na comunidade científica, visto que vários nitrocompostos são produzidos com finalidade terapêutica, como já visto, e, conseqüentemente, são introduzidos em organismos vivos e metabolizados, com envolvimento, na maioria das vezes, de processos redox [SQUELLA et al., 2005; MOSCOSO et al., 2011; LOPES et al., 2015].

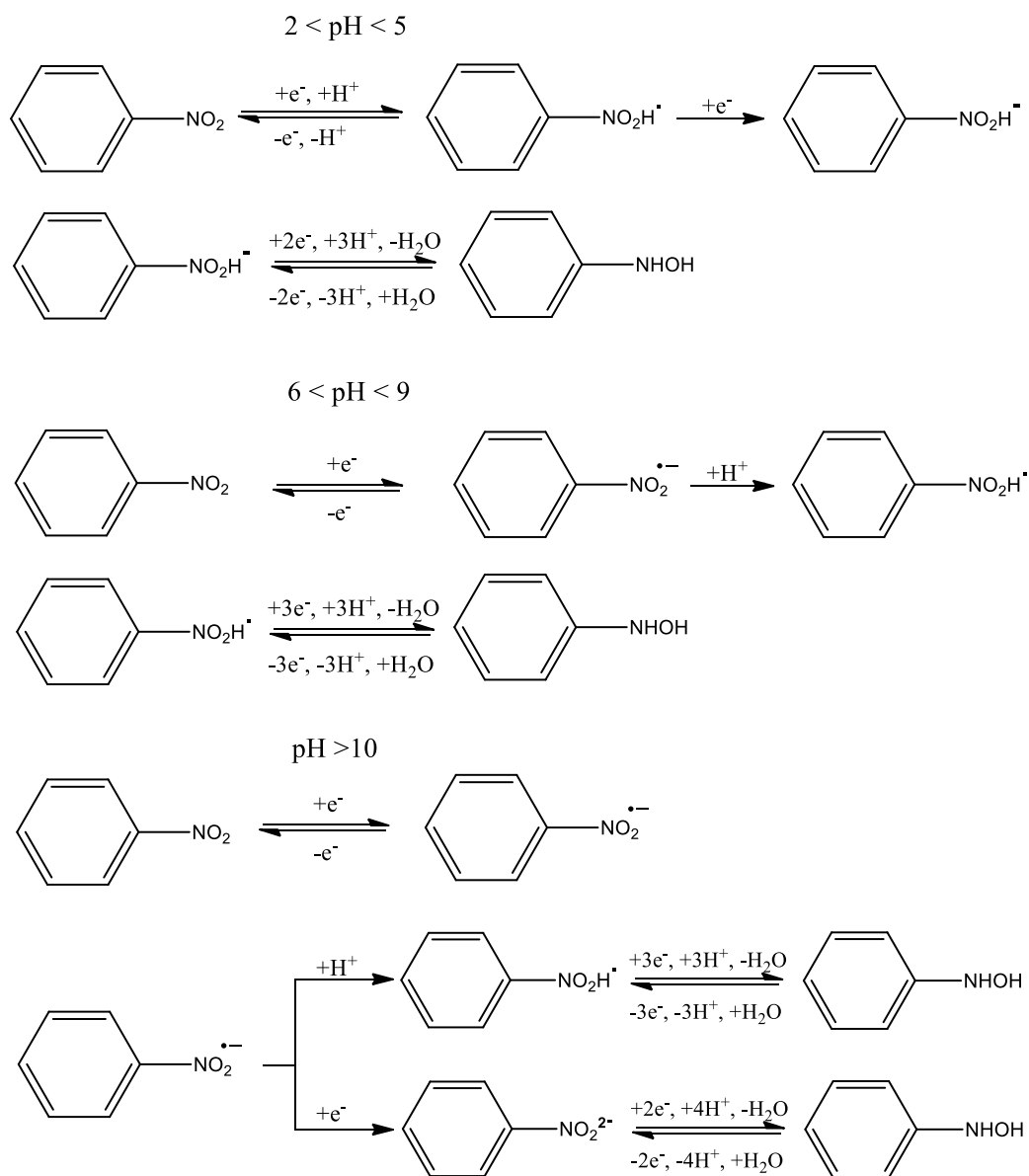
Há indícios de que os intermediários reativos formados em meio anaeróbio como Ar-NO_2^- , Ar-NHOH e $\text{Ar-NO}_2\text{H}^\bullet$, podem interagir com o DNA, provocando danos [CARBAJO, 2002; MANDAL, 2004; PAULA, 2009; BOLLO et al., 2010, SQUELLA et al., 2005]. Dessa forma, a redução eletroquímica de nitrocompostos tem desempenhado um papel importante no desenvolvimento da eletroquímica orgânica [FICHTER, 1942].

Diante da contínua investigação eletroquímica de nitrocompostos, é possível observar que o mecanismo de redução de diferentes classes de nitroaromáticos envolve uma série de adições monoelétrônicas que podem estar acopladas a reações químicas subsequentes, responsáveis pelos diferentes perfis voltamétricos obtidos durante o processo de redução, o que produz, em termos gerais, essencialmente o ânion radical nitro ($\text{Ar-NO}_2^{\cdot-}$), o nitroso (Ar-NO), a hidroxilamina (Ar-NHOH) e amina (Ar-NH_2), correspondentes. Os produtos eletrogerados dependem particularmente do meio reacional em que são gerados e, conseqüentemente, de sua reatividade e estabilidade. Há forte dependência com o pH do meio.

Na Figura 10, são esquematizados os mecanismos para a redução de nitrobenzeno em diferentes meios (ácido, básico ou neutro) [HAMMERICH, 2016].

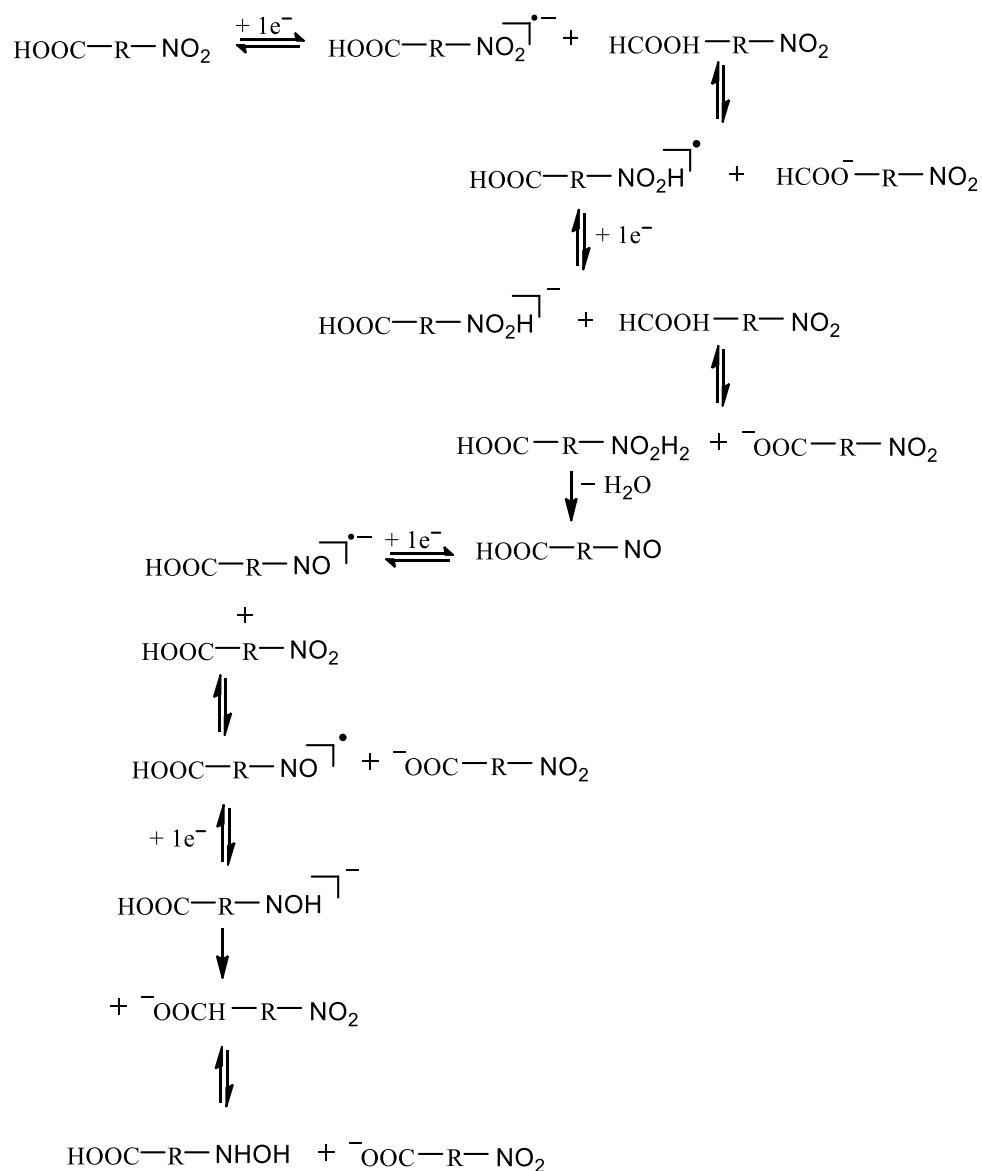
A redução dos compostos nitroaromáticos em soluções aquosas é realizada em uma única etapa irreversível de 4 elétrons e quatro prótons, levando à hidroxilamina, contrariamente ao que acontece em meios mistos, em que esta redução ocorre em etapas separadas: uma primeira onda de 1 elétron quasi-reversível ao ânion radical nitro, seguida por uma nova redução em potenciais mais negativos para a hidroxilamina, refletindo uma limitação cinética imposta pela protonação termodinamicamente desfavorável do ânion radical, enquanto em solventes apróticos puros, a segunda redução corresponde a um processo totalmente irreversível que leva à formação do ânion radical nitroso, entre outros produtos, sem no entanto evidências da formação da hidroxilamina [ADRES; ECMANN; SMITH, 2013].

Figura 10. Mecanismos propostos para a redução eletroquímica do nitrobenzeno em diferentes valores de pH.



Fonte: Adaptado de [HAMMERICH, 2016].

Existe um caso particular de redução do grupo nitroaromático, em meio aprótico, quando a molécula possui um grupo ácido dissociável, tais como um ácido carboxílico, um fenol, ou um grupo $-\text{NH}$ em nitroimidazóis. Ocorre uma variação da reação de protonação. Nesses casos, e na ausência de adição deliberada de ácidos, o radical ânion inicialmente formado é protonado pelo substrato, em um mecanismo conhecido como autoprotoneação Figura 11.

Figura 11. Mecanismo típico de auto-protonação.

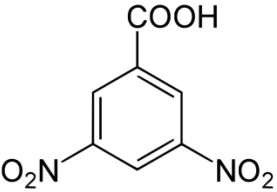
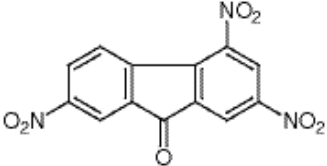
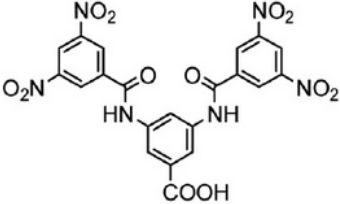
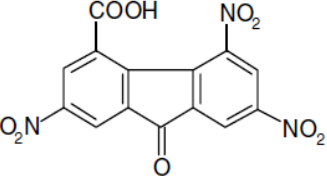
Equação geral resumida:

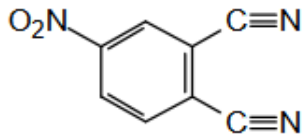
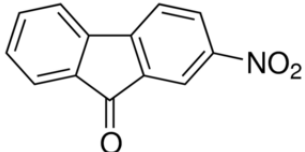
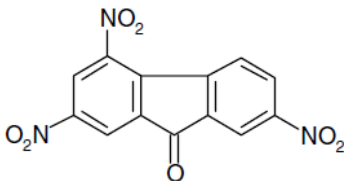
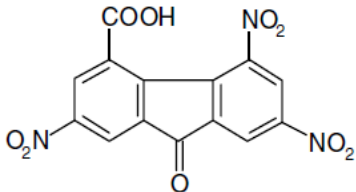


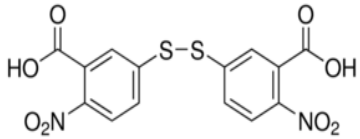
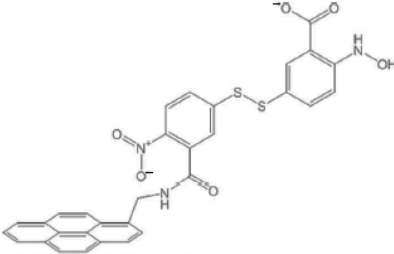
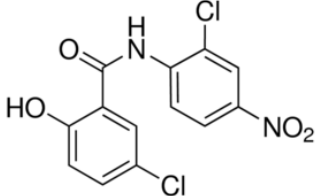
Fonte: Adaptado de [HAMMERICH, 2016].

Nitroaromáticos como a 4-nitroftalonitrila, 2,4,7-trinitro-9-fluorenona, ácido 3,5-dinitrobenzóico, têm sido empregados como mediadores redox para a determinação de compostos de interesse biológico. A Tabela 1 mostra alguns trabalhos, utilizando a voltametria cíclica e a amperometria para determinação de NADH, *L*-cisteína, *L*-glutamina, com seus respectivos limites de detecção e faixa linear.

Tabela 1. Aplicação de diferentes nitroaromáticos como mediadores redox.

Mediador	Estrutura	Analito	Sensor	Técnica	pH	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Referências
Ácido 3,5-dinitrobenzóico		glutaciona	ECV/MWCNT-CHIT/DNBA	Amperometria	7,0	2,0 - 35	0,6	CORREIA et al. 2013
		NADH	ECV/MWCNT/PEI/DNBA	VC	8	4,0 - 42,0	1,2	SANTHIAGO et al. 2009
		NADH	ECV/MWCNT/DNBA	VC	7,0	—	—	MOSCOSO et al., 2016
2,4,7- Trinitro-9-fluorenona		NADH	ECV/TNF	VC	8,0	-----	-----	MANO et al. 2001
3,5-Bis-(3,5-dinitrobenzolanilino) ácido benzoico		NADH	ECV/D-NO ₂	VC	7,0	-----	-----	PAEZ et al. 2009
4-Ácido carboxílico-2,5,7-trinitro-9-fluorenona		NADH	ECV/TFCA	VC	8,0	-----	-----	MANO et al. 2000
		Substrato de desidrogenases	ECV/TFCA	Amperometria	8,0	-----	-----	MANO et al. 2001
		Glucose/NADH	ECV/TFCA	VC	8,0	-----	-----	MANO et al. 2001

4-Nitroftalonitrila		NADH	EPC/4NPHN	Amperometria	7,0	0,8 - 8,5	0,25	LIMA et al. 2008
		L-glutaciona	EPC/4NPHN	Amperometria	7,0	0,8 - 83,0	2,7	
		Cisteína	EPC/4NPHN	Amperometria	7,0	0,8 - 13,3	0,25	
2-Nitro-9-fluorena		NADH	ECV/NF	VC	8,0	5 - 200	-----	MANO et al. 1999
2,4,7-trinitro-9-fluorena		NADH	EPC-ZP/TNF	VC	7,0	5 - 260	0,4	MUNTEAN et al., 2004
4-ácido carboxílico-2,5,7-trinitro-9-fluorena		NADH	EPC-ZP/4ATNF	VC	7,0	5 - 120	0,6	

5,5'-Ditiobis(2-ácido nitrobenzólico)		L-cisteína	ECV/MWCNT/ PEI- NPAu/DTNB	Amperometria	7,0	9,0 - 250	2,7	SANTHIAGO et. al. 2010
5,5'-Ditiobis(2-ácido nitrobenzólico)pireno		NADH	ECV/MWCN// DTNB-pyr	VC	7,0	-	0 - 400	GIROUD, et al., 2017.
Niclosamida		NADH	ECV/MWCNT/ NIC	Amperometria	7,0	10 - 280	3,0	LOPES et al. 2015

Fonte: Autor desta tese, 2016.

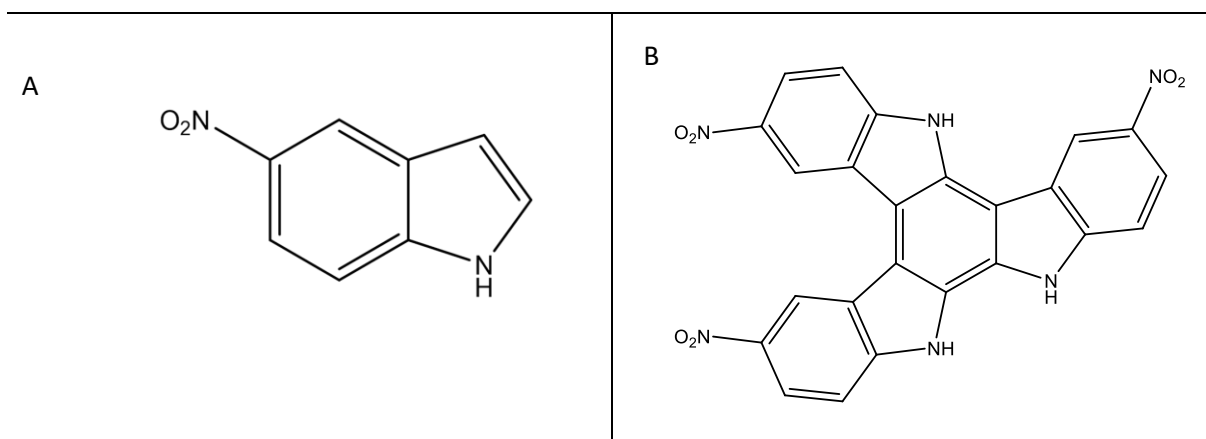
Nota: ECV: eletrodo de carbono vítreo. EPC: eletrodo de pasta de carbono. CHIT: quitosana. DNBA: Ácido 3,5-dinitrobenzólico. TNF: 2,4,7- Trinitro-9-fluorenona. D-NO₂: 3,5-Bis-(3,5-dinitrobenzolanino) ácido benzoico. TFCA: 4-Ácido carboxílico- 2,5,7-trinitro-9-fluorenona. 4NPHN: 4-Nitroftalonitrila. NF: 2-Nitro-9-fluorenona. TNF: 2,4,7-trinitro-9-fluorenona. 4ATNF: 4-ácido carboxílico-2,5,7-trinitro-9-fluorenona. DTNB: 5,5'-Ditiobis(2-ácido nitrobenzólico). DTNB-pyr: 5,5'-Ditiobis(2-ácido nitrobenzólico)pireno. NIC: Niclosamida. PEI: Polietilenamina. NPAu: Nanopartículas de Au.

2.3.1 Uso de 5-Nitroindol para a construção de sensor eletroquímico

A importância dos derivados de indol reflete-se no grande número de publicações científicas relacionadas com estes compostos em diferentes áreas de conhecimento.

Compostos aromáticos nitro-substituídos, tais como 5-nitroindol (Figura 12 A), têm recebido uma atenção significativa como potenciais análogos de nucleobases universais, devido à sua capacidade de formação de ligação de hidrogênio [GALLEGO; LOAKES, 2007]. Esta classe de compostos também foi usada para preparar filmes poli-indólicos com potenciais aplicações em vários domínios, tais como eletrônicos, eletrocatalise, materiais de ânodo em baterias, revestimento anticorrosivo e em farmacologia [XU et al., 2005]. Derivados nitroindólicos também têm atraído atenção, devido à perspectiva de sua futura utilização industrial, desempenhando um papel importante como intermediários na produção de pesticidas. Como resultado das inúmeras aplicações possíveis para estes compostos, um número crescente de estudos está sendo realizado, relacionado às questões ambientais, de segurança e de prevenção de risco, por exemplo, em citotoxicidade [KARALI, 2002].

Figura 12. (A) estrutura do monômero 5-nitroindol e (B) estrutura do trímero do 5-nitroindol.



Fonte: Adaptado de KOKKINIDIS, 1996.

O estudo de eletrodos modificados com polímeros formados por eletropolimerização de compostos orgânicos tornou-se um campo de crescente interesse na eletroquímica devido à sua potencial aplicação [DELETIOĞLU et al., 2010; KOKKINIDIS; KELAIDOPOULOU, 1996].

Nos últimos anos, várias moléculas orgânicas, tais como pirrol, carbazol, indol têm recebido uma atenção crescente como revestimentos de material, porque eles são facilmente eletrografitados na superfície formando filmes condutores [TALBI et al., 2001]. Dessa forma, a família indol recebeu grande interesse devido às suas vantagens, especialmente, por ter boa estabilidade térmica e elevada atividade redox [TALBI, 1998, NIE et al., 2007]. Quando moléculas com grupo indol e seus derivados são expostos à oxidação eletroquímica em diversos eletrólitos, são produzidos polímeros sobre a superfície do eletrodo (Figura 12 B), vários trabalhos tem usado as técnicas de $^1\text{HRMN}$, FTIR e RAMAN para caracterizar o trímero formado [XU et al., 2006; DELETIOĞLU et al. 2010; TALBI et al., 1998].

2.4 Espécies reativas de nitrogênio e oxigênio

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre o sistema antioxidante e pró-oxidante. Ele está relacionado com muitas condições patológicas e está associada com a disfunção mitocondrial, apoptose, ou morte celular. As espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) têm função na sinalização redox e são produzidos como subprodutos de processos metabólicos normais em todos os organismos aeróbios, e estão presentes em concentrações muito baixas em células [TEIXEIRA et al., 2016; BUTTERFIELD et al., 2007].

A produção de EROs e de ERNs é parte integrante do metabolismo humano e é observada em várias condições fisiológicas (Tabela 2). Essas espécies têm importante função biológica, como na fagocitose, fenômeno em que são produzidas para eliminar o agente agressor. Por outro lado, quando sua produção é exacerbada, o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio [GOULART et al., 2007; DULCE et al., 2016].

Tabela 2. Espécies reativas de nitrogênio (ERN), oxigênio (ERO) e seus potenciais formais (E^0).

	Representação das espécies		Par redox	E^0 vs. NHE	
ERN	Radicais	NO \cdot	Óxido Nitrico	NO $^+$ /NO \cdot	+1,21 V
		NO $_2\cdot$	Dióxido de nitrogênio	NO $_2\cdot$ /NO $_2^-$	+0,99 V
	Não-radicais	ONOO $^-$	Peroxinitrito	ONOO/ONOO $^-$	+0,20 V
		ONOOH	Ácido peroxinitroso		
		NO $_2^+$	Cátion nitrônio	NO $_2^+$ /NO $_2\cdot$	+1,56 V
ERO	Radicais	O $_2^{\cdot-}$	Superóxido	O $_2$ /O $_2^{\cdot-}$	-0,33 V
		\cdot OH	Hidroxila		
	Não-radicais	1 O $_2$	Oxigênio singleto		
		H $_2$ O $_2$	Peróxido de Hidrogênio	H $_2$ O $_2$ /O $_2$	-0,15 V

Fonte: Autor desta tese, 2016.

Espécies reativas de nitrogênio, provenientes do óxido nítrico (NO), têm um papel importante em muitas doenças tais como a artrite reumatóide [PHILLIPS, *et al.*, 2010], aterosclerose [NAPOLI *et al.*, 2006], câncer [NAKAMURA *et al.*, 2006; ARANDA *et al.*, 2012; XU *et al.*, 2002; MASRI *et al.*, 2005] e também em várias perturbações neurodegenerativas [IRAVANI *et al.*, 2006]. Em particular, verificou-se que ERNs induzem a morte neuronal na doença de Parkinson [MIHM *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2006; NIKAM *et al.*, 2009; AQUILANO *et al.*, 2008] e também em outras patologias neurodegenerativas.

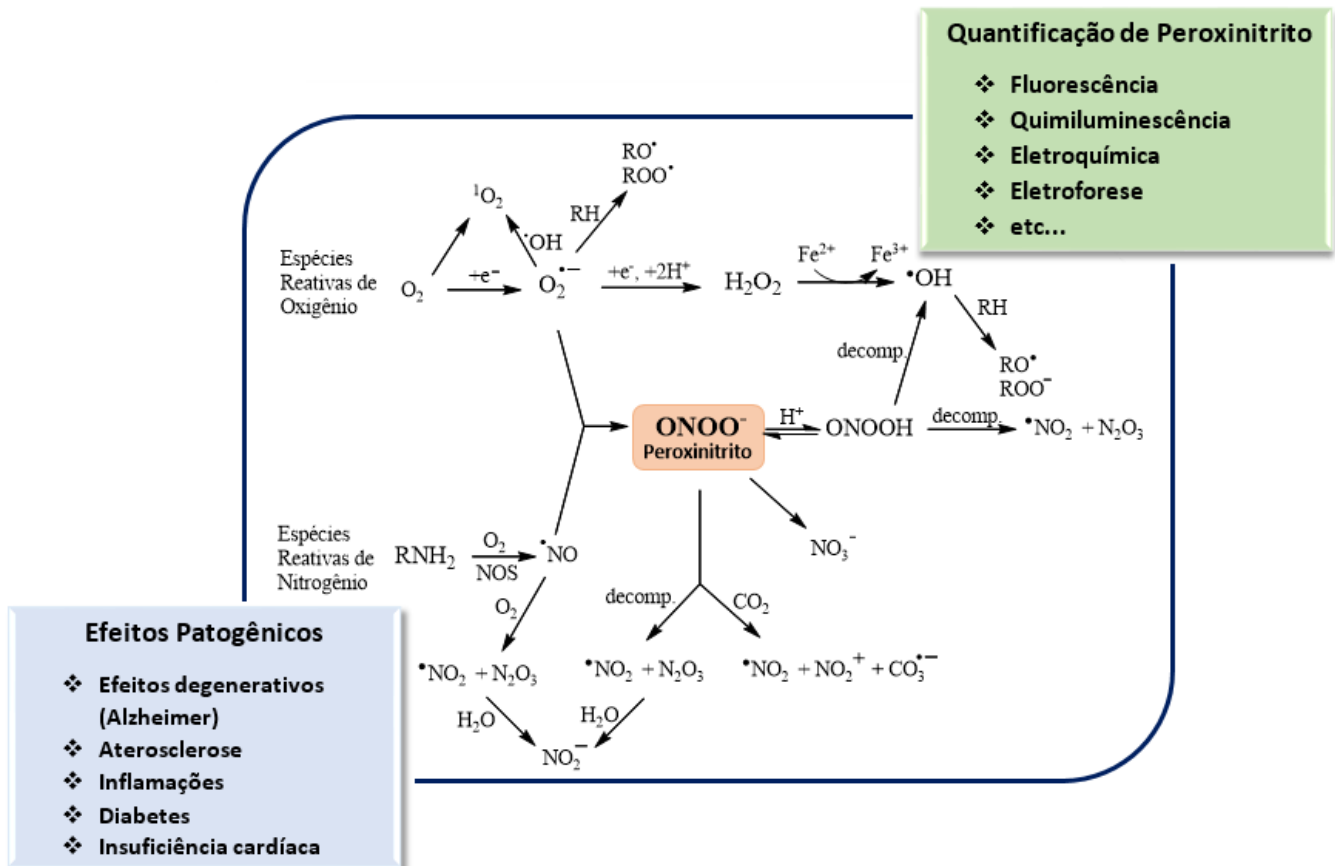
O NO é altamente reativo e interage com várias moléculas, uma delas sendo o radical ânion superóxido (O $_2^{\cdot-}$), formado durante o estresse oxidativo. A reação de NO e O $_2^{\cdot-}$ *in vivo* é extremamente rápida ($k = 0.4 - 1.9 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) e resulta na formação de peroxinitrito (ONOO $^-$) [ABE *et al.*, 1995; BUTTERFIELD *et al.*, 2007].

A formação de peroxinitrito intracelular está assim associada à produção elevada de NO e a sua difusão para locais de formação de superóxido. Embora um nível bem controlado de peroxinitrito seja essencial para a integridade celular, em condições patológicas tais como infecção bacteriana, há uma produção de grandes quantidades de peroxinitrito além de outras ERO e ERN. Os estudos clínicos sugerem que os níveis anormais de peroxinitrito estão correlacionados com a citotoxicidade aguda e podem contribuir para muitas doenças, incluindo, acidente vascular cerebral, doença inflamatória do intestino e várias doenças neurodegenerativas [PACHER et al., 2007; SZABO et al., 2007; AMATORE et al., 2008], cardiovasculares ou inflamatórias e diabetes (Figura 13) [PETEU et al., 2014].

O ONOO^- sofre três principais vias de degradação em condições fisiológicas: se decompõe diretamente no radical nitrito (NO_2^\cdot) e ânion nitrato (NO_3^-) ou através da formação intermediária de seu ácido conjugado (ácido peroxinutroso ($\text{O}=\text{N}-\text{O}-\text{OH}$), $\text{pK}_a = 6,8$) e a subsequente formação de radicais NO_2^\cdot e OH^\cdot e interage rapidamente com CO_2 , glutathione, hemoproteínas, peroxiredoxina, metais, tióis, etc [SIERACKI et al., 2013]. Em pH 7,4, pode danificar uma grande variedade de componentes moleculares nas células, incluindo o DNA e as proteínas, devido às suas propriedades oxidantes e de nitração.

Considerando esta demanda urgente e o grande interesse em desenvolver instrumentos de quantificação específicos de ONOO^- , a detecção e quantificação de ONOO^- em sistemas biológicos são, portanto, uma tarefa desafiadora, mas muito importante para a compreensão da implicação de ONOO^- na lesão oxidativa.

Figura 13. Peroxinitrito: formação, reatividade, quantificação e efeitos patogênicos.



Fonte: Adaptado de PETEU et al., 2014.

A vasta complexidade do ambiente real *in vivo* é ainda um dos principais obstáculos para a avaliação quantitativa do peroxinitrito, uma vez que tipicamente este interage com mais de um alvo, devido à sua alta reatividade. Em pH fisiológico, o peroxinitrito pode reagir com um número de biomoléculas, oxidando e nitrando moléculas celulares chave, tais como DNA, proteínas, e lipídeos, comprometendo a integridade e a funcionalidade e causando danos ao DNA [DUNCAN, 2003].

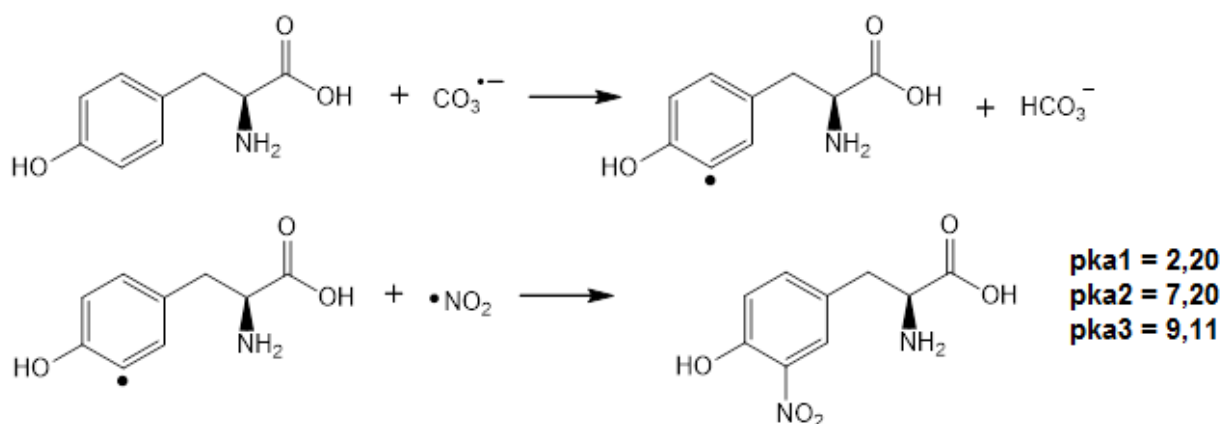
A detecção de peroxinitrito requer, portanto, o desenvolvimento de metodologias que podem competir com as reações rápidas com CO_2 , glutathiona e hemoproteína. A maioria dos métodos de detecção precoce são indiretos, com foco na detecção de produtos de reação. A nitrotirosina, entre outros produtos nitrados, como o nitrotocoferol, tem sido considerada há muito tempo como biomarcador da formação de peroxinitrito *in vivo* [HALLIWELL, 1997; SIERACKI et al., 2013].

2.4.1 Importância da detecção da 3-Nitro-*L*-tirosina

Embora o peroxinitrito em si seja instável, a sua decomposição pode conduzir à formação de 3-nitro-*L*-tirosina (3-NT) por reação com resíduos de tirosina livres ou ligados a proteínas. Como resultado, a 3-NT é um produto final estável e tem sido proposto como biomarcador promissor para a determinação de danos oxidativos mediados por peroxinitrito [DALLE-DONNE et al., 2006; CONVENTZ et al., 2007; RICHARDS et al., 2006; HALLIWELL, 1997; DUNCAN, 2003]. Os biomarcadores tem características passíveis de avaliação e mensuração, como indicadores de processos biológicos normais, processos patogênicos ou de resposta farmacológica [LABAER, 2005].

A nitração do anel aromático em resíduos de tirosina livres ligados à proteína é o produto principal do ataque do peroxinitrito, embora ele não reaja diretamente com tirosina. Em vez disso, forma radicais secundários, tais como $\text{CO}_3^{\cdot-}$ e $\cdot\text{NO}_2$, que são, de fato responsáveis pela oxidação e nitração. O mecanismo de nitração de tirosina em sistemas biológicos é um processo que envolve duas etapas (Figura 14) [TEIXEIRA et al., 2016].

Figura 14. Reação proposta para nitração da tirosina e os valores de pka1, pka2 e pka3.



Fonte: Adaptado de TEIXEIRA, 2016.

3-nitro-*L*-tirosina

Aumento dos níveis de 3-NT livre foram detectados em tecidos de acometidos com doenças neurodegenerativas e também em fluidos biológicos de pacientes com desordens neurológicas, tais como a doença de Parkinson [BUTTERFIELD et al.,

2007; TSIKAS, 2012; MIHM et al., 2001]. Além disso, dados recentes sugerem um papel neurotóxico direto deste aminoácido modificado que pode causar uma perda seletiva dos neurônios [BLANCHARD-FILLON et al., 2006].

Várias técnicas altamente sensíveis têm sido utilizadas para identificar e quantificar 3-NT tanto em fluidos quanto em tecidos biológicos na faixa de picomolar e nanomolar, dentre as técnicas pode-se destacar o uso da cromatografia líquida, cromatografia gasosa acoplados a espectrometria de massas, espectrofotometria no UV-Vis e teste de ELISA (Tabela 3) [POURFARZAM et al., 2013; YANG, et al., 2010; GUVENÇ et al., 2014].

Tabela 3. Diferentes métodos para detecção de 3-NT em amostras biológicas.

	Amostra	Método de detecção	Curva padrão/LOD	LOQ	Referências
3-NT ligada a proteína	Plasma	ELISA	10-500 nM/ND	ND	DIETRICH-MUSZALSKA et al, 2012
3-NT ligada a proteína	Plasma	ELISA	10 µM-10 mM	ND	KHAN et al., 2008
3-NT-ligada a proteína	Plasma e soro	ELISA	1,82 pmol/mg proteína	4,29 pmol/mg proteína	WEBER et al., 2012
3-NT ligada a proteína	Soro	ELISA	2,0 nM	ND	KHAN, et al, 2006
3-NT em resíduos de proteína	Soro bovino, albumina	HPLC/DAD 280 e 357 nm	4,3 pmol	ND	YANG, et al., 2010
3-NT e Tir	Tecido cerebral	HPLC/DAD 278 nm	6,7 nM	ND	GUVENÇ et al., 2014
3-NT e Tir	Plasma	HPLC/ UV 540 nm	0,5 nM	ND	ZHANG et al., 2007
3-NT livre	Plasma	HPLC/UV 470 e 540 nm	0,2 nM	0,6 nM	POURFARZAM et al., 2013
3-NT livre	Soro	HPLC/ UV 274 nm	0,20 nM		KHAN et al., 2006
3-NT livre	Plasma	LC-MS/MS	0,034 nM	0,112 nM	HUI et al., 2012
3-NT, 3-BT, DBT	Urina	LC/MS/MS	1,0 nM		KATO et al., 2009
3-NT	Plasma	GC-MS/MS	0,03 nM	0,3 nM	SODERLING et al., 2013

Nota: DAD: arranjo de diodo. HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência. LC: cromatografia líquida. UV: ultravioleta. MS: espectrometria de massas. ELISA: ensaio imunoenzimático. EDC: detector eletroquímico. Tir: tirosina. 3-NT: 3-nitrotirosina. 3-BT: 3bromotirosina. DBT: Dibromotirosina.

O uso da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada à detecção eletroquímica tem sido amplamente utilizada para a medição do 3-NT livre e ligado à proteína. A alta sensibilidade dessa técnica levou ao seu uso bem-sucedido em estudos no plasma e no líquido cefalorraquidiano, onde as concentrações relatadas estão na faixa de nanomolar. No entanto, são necessários potenciais elevados para oxidar o 3-NT [SKINNER et al., 1997; TOHGI et al., 1999].

De acordo com a Tabela 4, os níveis de 3-NT em condições patológicas são ligeiramente mais elevados em comparação com os níveis em indivíduos saudáveis. Esta observação é, de fato, válida para várias amostras biológicas, independentemente do método de quantificação utilizados. A 3-NT foi detectada em vários tecidos e fluidos biológicos, incluindo o plasma, soro, urina, amostras de tecidos e outras amostras biológicas [TEIXEIRA et al., 2016].

Tabela 4. Faixas de concentração de 3-NT encontrados em diferentes amostras biológicas.

Amostra	Amostra biológica	Método	Concentração	Referências
12 voluntários saudáveis e não fumantes	Plasma	GC/NCI-MS/MS	0,74 ± 0,31nM	SODERLING et al.
6 voluntários saudáveis	Plasma	GC-MS	5,447 ± 2,783 nM	TSIKAS et al.
20 voluntários saudáveis e não fumantes	Plasma	LC-MS/MS	4,54 ± 2,75 nM	ZHANG et al.
18 fumantes saudáveis	Plasma	LC-MS/MS	17,42 ± 11,6 nM	
50 pacientes sem histórico de doenças cardíacas	Plasma	HPLC- fluorescência (470 nm)	4,4 ± 1,8 nM	
50 pacientes DAC estáveis	Plasma	HPLC- fluorescência (470 nm)	12,8 ± 3,9 nM	POURFARZAM <i>et al.</i>
50 pacientes com DAC instáveis	Plasma	HPLC- fluorescência (470 nm)	14,8 ± 4,8 nM	

25 voluntários não fumantes saudáveis do sexo feminino	soro	ELISA	1,1 ± 0,81 μM	KHAN et al.
24 pacientes com lúpus	soro	ELISA	96,52 ± 21,12 μM	
17 pacientes com doença de Alzheimer	Líquido cefalorraquidiano	GC/NCI-MS/MS	0,44 ± 0,031 nM	RYBERG et al.
14 pacientes com ELA	Líquido cefalorraquidiano	GC/NCI-MS/MS	0,38 ± 0,034 nM	
Artrite reumatoide ativa	soro	HPLC	0,49 ± 0,27 μM	KUR, 1994
Artrite reumatoide inicial	soro	HPLC	0,18 ± 0,007 μM	

Fonte: Adaptado de TEIXEIRA, 2016.

Nota: HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência; GC: cromatografia gasosa; NCI: ionização química negativa; MS: espectrometria de massa; LC: cromatografia líquida; ELISA: ensaio imunoenzimático; DAC: doença arterial coronariana; ELA: Esclerose lateral amiotrófica.

Os resultados encontrados na Tabela 4 mostraram claramente a importância da construção de um método eficaz para a detecção da 3-NT, uma vez que ela está relacionada com algumas doenças. Pesquisas encontradas na literatura demonstraram que os níveis plasmáticos de 3-NT estão elevados em pacientes com doença arterial coronariana (DAC). Em relação à aterosclerose, verificou-se que as artérias ateroscleróticas têm níveis mais elevados de 3-NT do que os vasos sanguíneos não ateroscleróticos. Além disso, há várias doenças relacionadas a problemas cardiovasculares tais como a inflamação do miocárdio, insuficiência cardíaca e aterosclerose [MERGOLA et al., 2013].

2.5 Importância da determinação dos ácidos ascórbico e úrico

O ácido *L*-ascórbico (AA, vitamina C) é um antioxidante que desempenha um papel importante no funcionamento do metabolismo humano. O AA (Figura 15 A) é uma vitamina solúvel em água que está envolvido em várias reações bioquímicas nas células e tecidos. Ele é encontrado no fluido celular do sistema nervoso central e no soro. É um nutriente essencial para os seres humanos. Além disso, o AA não só ajuda a promover o desenvolvimento saudável da célula, a absorção de cálcio e o

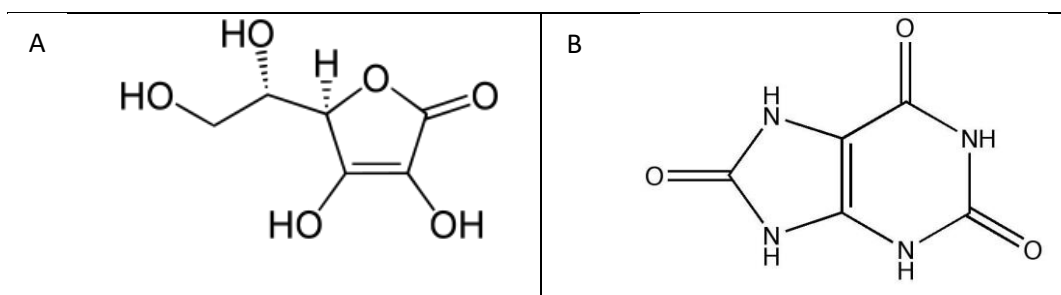
crescimento do tecido normal, mas também pode ser um medicamento para o escorbuto, intoxicação por drogas, doença hepática, reações alérgicas e aterosclerose [YU et al., 2015; FERIN et al., 2013; CHOUKAIRI et al., 2015; MUKDASAI et al., 2015; SILVA et al., 2012].

Sob condições fisiológicas, o AA é um doador de elétrons, o que permite a reação com os radicais biologicamente relevantes e outros oxidantes, tais como o ânion superóxido, oxigênio singlete, etc. Além disso, pode regenerar a vitamina E (α -tocoferol). A vitamina C também atua como um cofator para enzimas envolvidas na biossíntese de colágeno e carnitina, participa na conversão do neurotransmissor dopamina para norepinefrina e no metabolismo da tirosina [FERIN et al., 2013].

O ácido úrico AU (Figura 15 B) é uma biomolécula importante derivado do metabolismo das purinas e quando é encontrado em quantidades elevadas no soro e urina pode fornecer informações sobre algumas doenças importantes (gota, dano renal, leucemia, doenças infecciosas, etc.) [VULCU et al., 2013].

Estudos *in vitro* indicaram a importância do AU como uma substância antioxidante, atuando como um sequestrante poderoso de oxigênio singlete e dos radicais hidroxila [FERIN et al., 2013; YU et al., 2015]. Para uma pessoa saudável a concentração de (AU) no soro é na faixa de 240 - 520 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A determinação da quantidade de AU em fluidos biológicos ocupa um lugar muito importante no diagnóstico de várias doenças [CHOUKAIRI et al., 2015].

Figura 15. Estrutura dos ácidos L-ascórbico e úrico.



Fonte: Autor desta tese, 2016.

AA e AU, geralmente, coexistem em matrizes biológicas reais, especialmente no soro, sangue e urina. Dessa forma, o desenvolvimento de um método seletivo e

sensível para a determinação simultânea dos mesmos é altamente desejável para aplicações analíticas e em diagnóstico [SILVA et al., 2012; CHOUKAIRI et al., 2015].

Vários métodos têm sido apresentados por diferentes pesquisadores para a determinação de AA e UA em amostras biológicas, tais como: métodos espectrofotométricos, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com detecção eletroquímica (EQ) ou ultravioleta (UV) e eletroforese capilar (EC) acoplado com UV [FERIN et al., 2013]. Além dessas técnicas, há muitos relatos, na literatura científica, do uso de técnicas eletroquímicas como voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial e amperometria para determinação simultânea desses analitos.

Diante disso, nesse trabalho, numa primeira etapa, foram utilizadas as técnicas eletroquímicas VC e VPD para estudar o comportamento eletroquímico do éster etílico da 3-nitro-*L*-tirosina (3NO₂TEE) em meios prótico (tampão fosfato e acetato) e aprótico (DMF) e, em seguida, um biossensor de DNA foi construído para quantificar o nitrocomposto.

Numa segunda etapa, foi desenvolvido um sensor eletroquímico nanoestruturado a base de nanotubos de carbono (MWCNT) e um filme polimérico eletrogerado *in situ* a partir de 5-nitroindol para determinação simultânea de AA e AU. Como foi visto, eles são importantes antioxidantes, presentes em amostras de urina e soro.

É importante salientar que não há relatos na literatura sobre a utilização de biossensor de DNA para determinação da 3-nitro-*L*-tirosina e seus derivados.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Este trabalho visa o desenvolvimento de um sensor nanoestruturado a base de nanotubos de carbono e poli-5-indol e um biossensor de dsDNA para determinação de compostos de interesse biológico.

3.2 Específicos

- Elucidar o mecanismo eletroquímico de redução da 3NO₂TEE, utilizando a voltametria cíclica em meio aprótico (DMF/TBAPF₆) e realizar o estudo espectroeletroquímico.
- Realizar o estudo eletroquímico da 3NO₂TEE, em meio aquoso, em diferentes valores de pH;
- Realizar a análise eletroquímica da interação entre 3NO₂TEE com dsDNA para a construção do biossensor e desenvolver um método de quantificação da 3NO₂TEE em concentrações nanomolares;
- Preparar um eletrodo quimicamente modificado à base de nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) e de 5-NID oxidado, designado ECV/MWCNT/poli-5-NID;
- Caracterizar o MWCNT após o tratamento ácido pela técnica de RAMAN;
- Investigar o comportamento eletroquímico do ECV/MWCNT/poli-5-NID na ausência e presença de AA e AU;
- Verificar a estabilidade e repetibilidade das medidas e no preparo do sensor;
- Calcular parâmetros cinéticos na ausência de AA e AU;
- Investigar o comportamento electrocatalítico do sensor ECV/ MWCNT/poli-5-NID na detecção de AA e AU;
- Caracterizar a superfície do sensor por meio das técnicas MEV, AFM e XPS;
- Obter curva analítica para detecção de AA e AU na plataforma nanoestruturada ECV/MWCNT/poli-5-NID bem como LOD, LOQ e faixa linear de resposta;
- Determinar as concentrações de AA e AU em diferentes amostras biológicas.

4 EXPERIMENTAL (PARTE 1)

4.1 Regentes

Os seguintes reagentes foram obtidos de seus respectivos fornecedores e utilizados sem tratamento prévio: o éster etílico da 3-nitro-L-tirosina e hidróxido de tetrabutílamônio (TBAOH) foram obtidos da Sigma-Aldrich, fosfato de sódio monobásico monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), fosfato de sódio dibásico diidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), acetato de sódio foram obtidos da Vetec.

Para os estudos eletroquímicos e em biossensor de DNA, o ácido desoxirribonucleico de fita dupla (dsDNA) de timo de bezerro e *N,N*-dimetilformamida (DMF) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

O hexafluorofosfato de tetrabutílamônio (TBAPF_6) usado como eletrólitos de suporte em meio aprótico, foi seco à pressão reduzida e à temperatura de 40 °C.

Todos os reagentes químicos utilizados foram de grau analítico. Todas as soluções foram preparadas em água ultrapura (18,2 M Ω .cm) de um sistema de purificação Milli-Q da Millipore Inc.

4.2 Equipamentos e materiais

Um potenciostato modelo PGSTAT30 da AUTOLAB, interfaceado a um microcomputador (GPES 4,9), foi empregado para as medidas eletroquímicas. O espectrofotômetro modelo 8453 da Agilent foi utilizado para o estudo da $3\text{NO}_2\text{TEE}$ em meio aprótico, para interação da $3\text{NO}_2\text{TEE}$ com TBAOH e determinação da concentração do gel de dsDNA.

As medidas foram realizadas usando 5,0 mL de solução com diferentes valores de pH. A eliminação de oxigênio dissolvido foi feita pelo borbulhamento de um fluxo de $\text{N}_{2(g)}$, nas soluções, durante 10 minutos, antes das análises.

4.3 Preparação de solução estoque da 3NO₂TEE

Em um eppendorf, foram pesados 0,73 mg da substância e adicionado 250 µL de tampão acetato pH 4,5. Para a realização dos estudos eletroquímicos foi retirada uma alíquota de 50 µL dessa solução e adicionada em 5,0 mL de tampão acetato pH 4,5, para obter uma concentração de 100 µM.

4.4 Técnicas eletroquímicas

4.4.1 Voltametria cíclica

As técnicas voltamétricas como voltametria cíclica (VC) e voltametria de pulso diferencial (VPD) vem sendo utilizadas para elucidar os mecanismos de redução eletroquímica dos nitrocompostos possibilitando avaliar a semelhança deste processo com o produzido via enzimática.

A voltametria cíclica (VC) é uma técnica de varredura reversa de potencial, em que o potencial aplicado ao eletrodo é variado numa velocidade conhecida e, ao atingir o potencial final desejado, a varredura é revertida ao valor inicial, na mesma velocidade, ela é usada geralmente para estudar a transferência de elétrons entre a molécula e eletrodo, sendo aplicada para determinar as propriedades redox dos analitos a serem estudados. A VC é uma das técnicas mais empregadas nas análises, pois permite obter rapidamente uma quantidade extraordinária de informações sobre as reações de transferência de elétrons, analisar a reatividade química das espécies eletrogeradas e identificar espécies presentes em solução, com a obtenção de dados cinéticos e, por fim, auxilia na elucidação do mecanismo eletródico em questão [BRETT, 1996; BARD, 2001].

4.4.2 Voltametria de pulso diferencial

A voltametria de pulso diferencial (VPD) é uma técnica muito usada em medidas em níveis traço, de espécies orgânicas e inorgânicas, em que, o degrau de potencial é a base deste tipo de voltametria [WANG, 2000b]. Na voltametria de pulso diferencial, pulsos de amplitude fixos sobrepostos a uma rampa de potencial crescente são aplicados ao eletrodo de trabalho. Em VPD, a corrente é medida duas

vezes, sendo uma antes da aplicação do pulso e outra ao final do pulso, onde a primeira corrente é instrumentalmente subtraída da segunda. Em seguida, a diferença das correntes é plotada em função do potencial aplicado, e o voltamograma resultante consiste de picos de corrente de forma gaussiana, cujas áreas são diretamente proporcionais à concentração do analito.

4.5 Limpeza do eletrodo de carbono vítreo (ECV)

O ECV foi polido com alumina ($0,3 \mu\text{m}$), lavado com água milli-Q, levado ao ultrassom por 1 min, em etanol e lavado com água novamente. A limpeza do eletrodo foi verificada por voltametria cíclica, utilizando $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ e $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 1 mM, em KCl 0,1 M, sistema bem reversível em potenciais adequados. Em seguida, o ECV foi lavado com água e secado a temperatura ambiente.

4.6 Estudos eletroquímicos da $3\text{NO}_2\text{TEE}$

Em experimentos onde se utilizou a técnica de voltametria cíclica, variou-se a velocidade de varredura de 5 a 400 mV/s, enquanto que em voltametria de pulso diferencial, a velocidade de varredura foi de 5 mV/s. Para os estudos da $3\text{NO}_2\text{TEE}$ em meio aprótico foi utilizado hexafluorofosfato de tetrabutilamônio (TBAPF_6 , $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) como eletrólito de suporte e *N,N*-dimetilformamida (DMF). A faixa de potencial trabalhado variou de +1,5 a -1,2 V, no sentido catódico, e -1,2 a +1,5 V, no sentido anódico.

Para a realização das análises eletroquímicas em meio prótico, foi usado como eletrólito suporte solução tampão fosfato (pH 7,4). Este foi preparado utilizando fosfato de sódio monobásico 1,5 g (NaH_2PO_4) e fosfato de sódio dibásico 0,95 g (Na_2HPO_4), dissolvidos em 200 mL água ultrapura. O valor de pH da solução foi determinado em pH-metro modelo Quimis Q400A [CHRISTIAN, 1994].

4.7 Preparação da solução tampão acetato

A solução tampão acetato ($0,075 \text{ mol.L}^{-1}$, força iônica $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$) foi preparada por meio da mistura das soluções de ácido acético (HOAc) $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e acetato de sódio (NaOAc) $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$, cuidadosamente preparadas com água ultrapura (padrão Milli-Q) fervida para garantir a ausência de microorganismos que

possam causar danos a molécula de DNA. Obteve-se um pH final de 4,5, faixa ótima para análises em biossensor de DNA.

4.8 Preparação do gel de dsDNA

O gel de dsDNA foi preparado após solubilização de 1,5 mg de dsDNA em 125 μL de tampão acetato pH 4,5, e submetidos à refrigeração por 48 h, para completa formação do gel de DNA.

A pureza do DNA foi determinada usando o espectrofotômetro no Uv-Vis (modelo 8453 da Agilent). Nessa análise foi acompanhada a razão entre as bandas 260 e 280 nm (A_{260}/A_{280}), que apresentou um valor de 1,8, indicando que o DNA estava suficientemente isento de proteína. A concentração molar do DNA foi determinada espectrofotometricamente com o acompanhamento da banda em 260 nm, utilizando o coeficiente de extinção molar de $6600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Nessa análise retirou-se 2,0 μL do gel de dsDNA onde foi diluído em 2,0 mL de tampão acetato e adicionando a uma cubeta de quartzo [RADI et al., 2014].

4.9 Condicionamento e preparação do biossensor de dsDNA

Após a limpeza do eletrodo, foi feito o condicionamento para assegurar a imobilização do dsDNA. Este condicionamento foi realizado por meio da técnica de Voltametria de Pulso Diferencial (VPD), varrendo-se uma faixa de potencial (0 a +1,4 V), em velocidade de $0,005 \text{ V.s}^{-1}$ em um mínimo de três ciclos até completa estabilização da superfície eletródica (organização da dupla camada elétrica). Uma vez executado esse procedimento, o eletrodo se encontra polarizado positivamente, permitindo assim interações eletrostáticas entre este e os grupos fosfato do dsDNA

Após o condicionamento, foram adicionados sobre o eletrodo de carbono vítreo, alíquotas com diferentes volumes de dsDNA até um volume final de 10 μL . O gel sobre o eletrodo foi seco com um leve fluxo de N_2 para formar um filme, este ECV/dsDNA foi utilizado para os estudos eletroquímicos. Após adição de dsDNA na superfície do ECV, o eletrodo foi deixado imerso por 15 min em uma solução de tampão acetato pH 4,5, contendo 100 μM $3\text{NO}_2\text{TEE}$, em seguida, foi feito um novo condicionamento com aplicação do potencial de redução do grupo nitro e feita

varredura de potencial no sentido anódico de 0 a +1,4 V com uma velocidade de 0,005 V.s⁻¹.

O estudo do tempo de condicionamento do ECV/dsDNA foi efetuado aplicando -0,5 V (pH 4,5) e -0,6 V (pH 7,4), durante 60, 120, 240 e 300 s e feita varredura de potencial no sentido anódico de 0 a +1,4 V.

Para determinação da melhor concentração de dsDNA na superfície do ECV, foi feito o estudo em que a concentração de DNA variou de 9,5 a 95 19 mmol L⁻¹. Após cada adição do gel de DNA e efetuadas as análises eletroquímicas, foi necessário realizar a limpeza e o condicionamento do eletrodo para posterior adição de outra alíquota do gel.

A construção da curva analítica foi realizada utilizando 19 mmol L⁻¹ de dsDNA na superfície do eletrodo com diferentes concentrações da 3NO₂TEE.

4.10 Estudos em meio aprótico do éster etílico da 3-nitro-*L*-tirosina

4.10.1 Análise eletroquímica por VC

Os estudos eletroquímicos foram realizados por voltametria cíclica (VC) no sentido catódico (0,5 a -1,2 V) e no sentido anódico (-0,5 a 1,5 V) com velocidade de varredura de 0,100 V s⁻¹. Para o estudo da velocidade de varredura, foram efetuadas velocidades de 0,010 a 0,400 V s⁻¹. Nesse experimento foi utilizado eletrodo de disco de Pt como eletrodo de trabalho. $c = 100 \mu\text{mol L}^{-1}$.

4.10.2 Espectroeletroquímica

Os estudos eletroquímicos da 3NO₂TEE ($c = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) foram realizados por voltametria cíclica (VC) no sentido catódico (0,0 a -1,4 V) com velocidade de varredura de 0,100 V s⁻¹, sem aplicação de potencial de condicionamento e aplicando um potencial de -0,9 V durante 5, 30, 60, 90 e 120 s. A faixa de comprimento de onda utilizada nesse experimento foi de 250 a 800 nm. Para a realização desse experimento foi utilizado um eletrodo de rede de Pt (1,0 cm²) como eletrodo de trabalho, uma cubeta de quartzo (caminho óptico de 2 mm) como cela eletroquímica.

4.10.3 Estudo da interação do éster etílico da 3-nitro-L-tirosina com hidróxido de tetrabutilamônio

Os estudos eletroquímicos da 3NO₂TEE ($c = 1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$) foram realizados por voltametria cíclica (VC) no sentido catódico ($E = 0,5$ a $-2,5 \text{ V}$) com velocidade de varredura de $0,100 \text{ V.s}^{-1}$, sem adição de TBAOH e com adição de $1,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de TBAOH, utilizando o eletrodo de carbono vítreo como eletrodo de trabalho.

Para o estudo espectrofotométrico da 3NO₂TEE ($c = 0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) no UV-vis foi adicionado $6,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de TBAOH em uma cubeta de quartzo (caminho óptico de 1,0 cm).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO (PARTE 1)

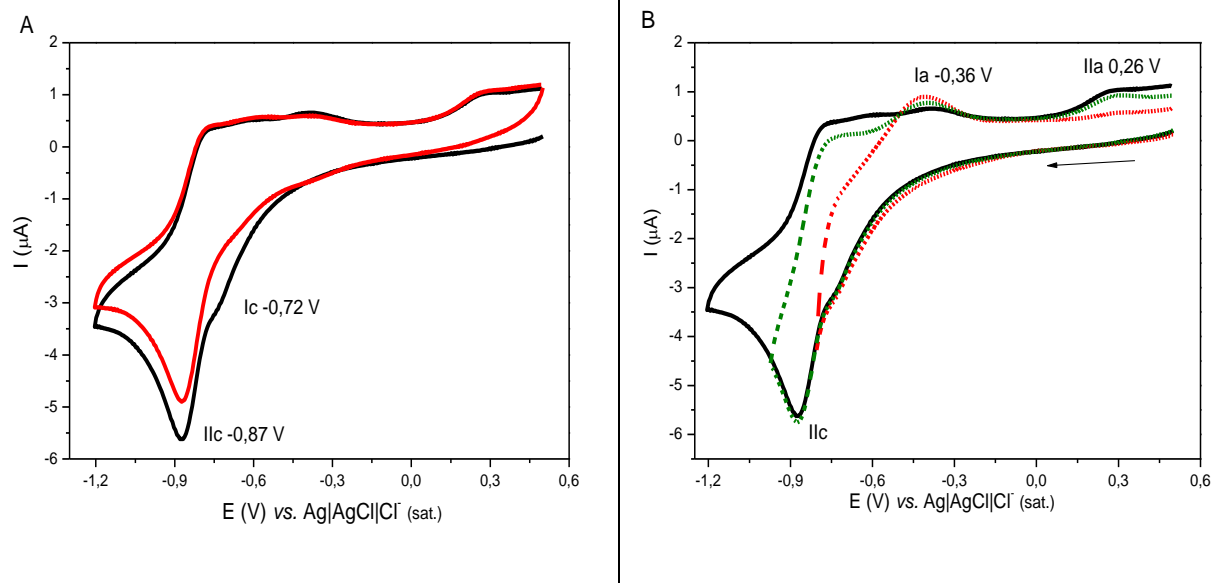
Os resultados desenvolvidos nesse trabalho foram divididos em duas partes para melhor entendimento. Na parte um foram feitos os estudos eletroquímicos da 3NO₂TEE em meios prótico e aprótico, bem como o desenvolvimento de um biossensor de dsDNA para detecção eletroquímica do éster etílico da 3-nitro-*L*-tirosina. Na parte dois será abordado a construção de um sensor eletroquímico a base de nanotubos de carbono e polímero da 5-nitroindol para detecção de ácido ascórbico e ácido úrico em amostra de urina e soro.

5.1 Estudos eletroquímicos da 3NO₂TEE em meio aprótico em eletrodo de Pt

Os estudos eletroquímicos da 3NO₂TEE, em meio aprótico, foram realizados, com a utilização de VC e VPD. Nesse estudo, fez-se o uso de DMF/TBAPF₆ (0,1 mol L⁻¹). O processo eletroquímico de redução de 3NO₂TEE, em meio aprótico, em eletrodo de Pt, é típico de nitroaromáticos [BOLLO et al., 2003; ARGUELLO et al., 2001] portadores de substituintes ácidos é representado por um ombro Ic ($E_{plc} -0,72$ V) e uma onda bem definida (IIc), em potencial $E_{pIIc} = -0,87$ V. Em ciclos sucessivos, nota-se que a onda Ic desaparece, mostrando que a espécie original foi consumida na superfície do eletrodo (Figura 16 A).

A Figura 16 B mostra, a partir de potenciais de inversão adequados, após Ic ($E_{\lambda} = -0,72$ V) e IIc ($E_{\lambda} = -0,87$ V), observam-se dois picos de oxidação (Ia e IIa). O pico anódico Ia é eletrogerado a partir de Ic e IIa ($E_{pIIa} = 0,26$ V), por sua vez, somente a partir da redução em IIc (Figura 16 B).

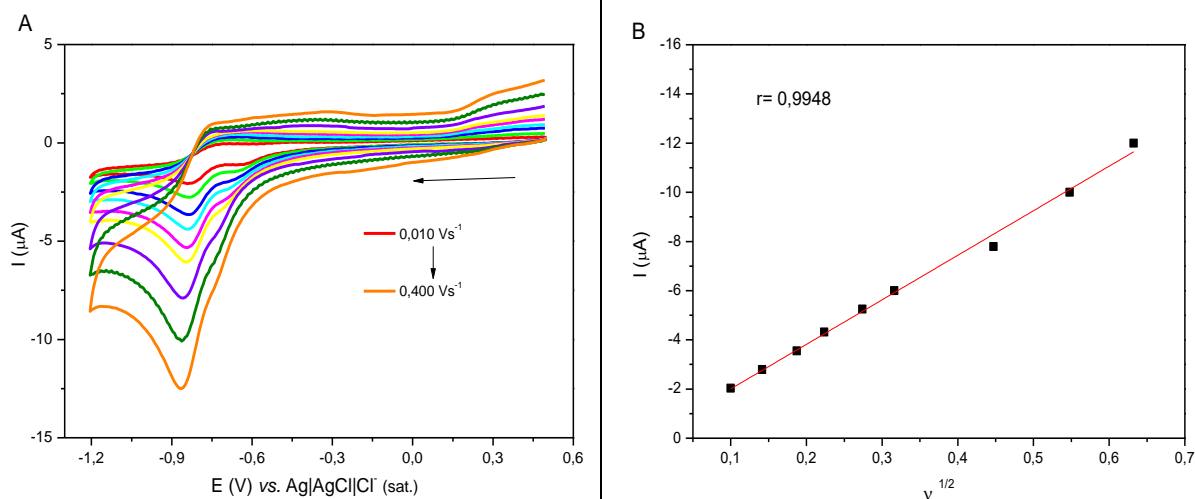
Figura 16. Voltamogramas cíclicos de $3\text{NO}_2\text{TEE}$ ($c = 100 \mu\text{M}$), em DMF/TBAPF_6 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), (---) primeiro ciclo; (---) Segundo ciclo (A) e (B) corte 1 (---) e corte 2 (---). Faixa de potencial + 0,5 V a -1,2 V. Pt, v : $0,100 \text{ V s}^{-1}$.



Fonte: Autor desta tese, 2016.

A partir do estudo voltamétrico (Figura 17A) também foram obtidos os valores de intensidade de corrente para a segunda onda de redução em função da raiz quadrada da velocidade de varredura (I_{pc} vs. $v^{1/2}$). A linearidade dos pontos mostra que o transporte de massa através da solução até a superfície eletródica, é controlado por difusão (Figura 17 B).

Figura 17. Voltamogramas cíclicos de $3\text{NO}_2\text{TEE}$ ($c = 100 \mu\text{M}$), em DMF/TBAPF_6 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), Pt. Faixa de potencial 0,5 a -1,2 V (A) e I_{pllc} vs. $v^{1/2}$ (B).



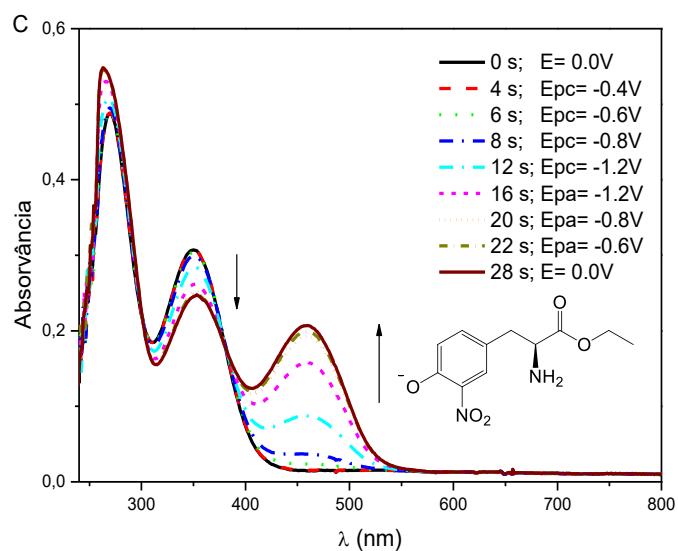
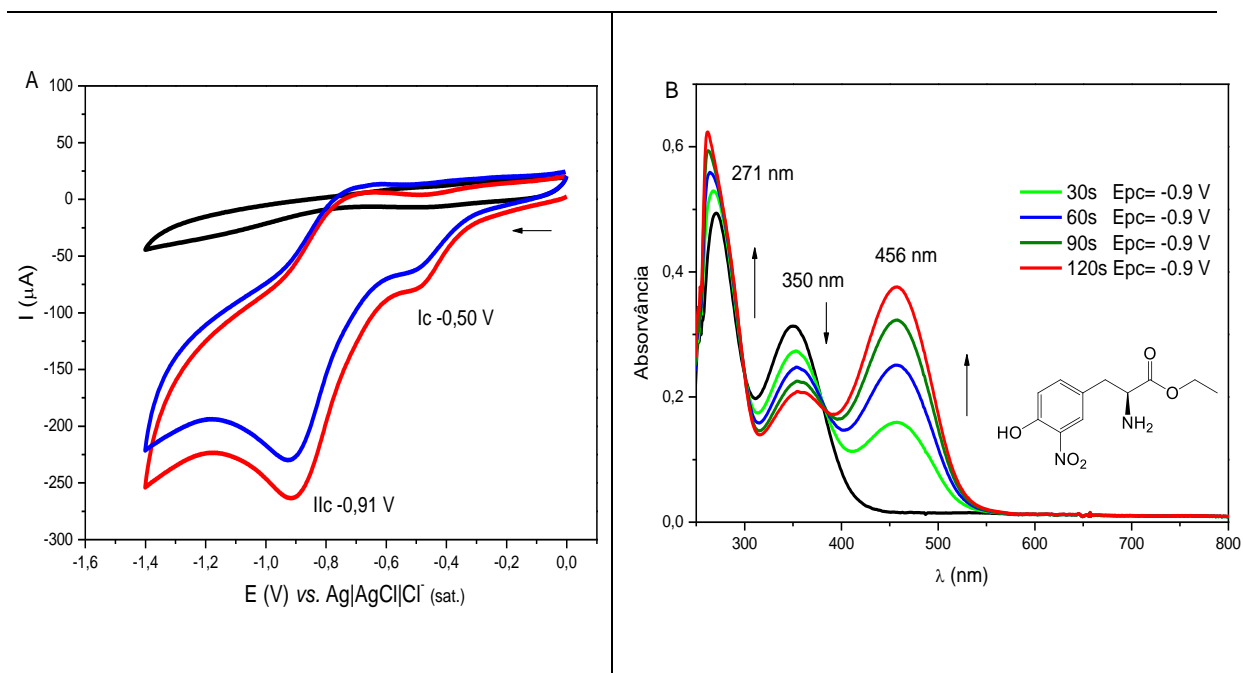
Fonte: Autor desta tese, 2016.

5.2 Espectroeletróquímica da 3NO₂TEE, em meio aprótico

A espectroeletróquímica foi realizada para auxiliar na elucidação do mecanismo de redução, com análise espectroscópica no UV-Vis dos intermediários produzidos via eletrólise em potencial relativo a I_c ($E_{plc} = -0,50$ V) e posteriormente em II_c ($E_{pllc} = -0,910$ V) (Figura 18 A). Nesse experimento, o potencial era mantido em valores constantes e espectros UV-Vis eram obtidos em tempos variados, de 30 em 30 s até 120 s.

A Figura 18 B mostra o espectro UV-Vis para a 3-NO₂TEE. Nessa análise, no tempo 0, observa-se a presença de duas bandas em 271 e 350 nm, antes da aplicação do potencial em -0,9 V. Essas bandas são referentes às transições eletrônicas $\pi - \pi^*$ (271 nm) do anel aromático e $n - \pi^*$ (350 nm) da hidroxila fenólica. Após aplicação de potencial de redução em -0,9 V, durante 30, 60, 90 e 120 s houve o aumento da banda em 271 nm, com deslocamento hipsocrômico (261 nm), o decréscimo da banda em 350 nm, com deslocamento batocrômico (356 nm) e o surgimento e aumento consecutivo da banda em 456 nm, referente à formação da base conjugada de 3NO₂TEE [SQUELLA et al., 2006]. Na Figura 18 C foi possível acompanhar o comportamento espectrofotométrico durante a varredura catódica de potencial. O compartimento espectroscópico é similar ao apresentado no experimento de eletrólise. Houve surgimento da banda em 456 nm, comprovando a formação da base conjugada, após a primeira onda de redução (-0,5 V), quando a varredura atingiu o potencial de -0,6 V (6 s), além, da diminuição da banda em 354 nm, indicando que o 3NO₂TEE estava sendo consumido durante a varredura. Esse comportamento também foi observado após a redução na segunda onda catódica ($E_{plc} = -0,91$ V).

Figura 18. Espectro-eletróquímica da 3NO₂TEE em meio aprótico (DMF/TBAPF₆, 0,1 mol L⁻¹). Rede de Pt como eletrodo de trabalho; (A) E = 0,0 V a -1,4 V; v = 0,100 V s⁻¹ (---) eletrólito de suporte, (---) primeiro ciclo, (---) segundo ciclo e (B) espectro de UV-Vis, (---) sem aplicação de E, (---) 30, (---) 60, (---) 90 e (---) 120 s em -0,9 V vs. Ag/AgCl/Cl⁻



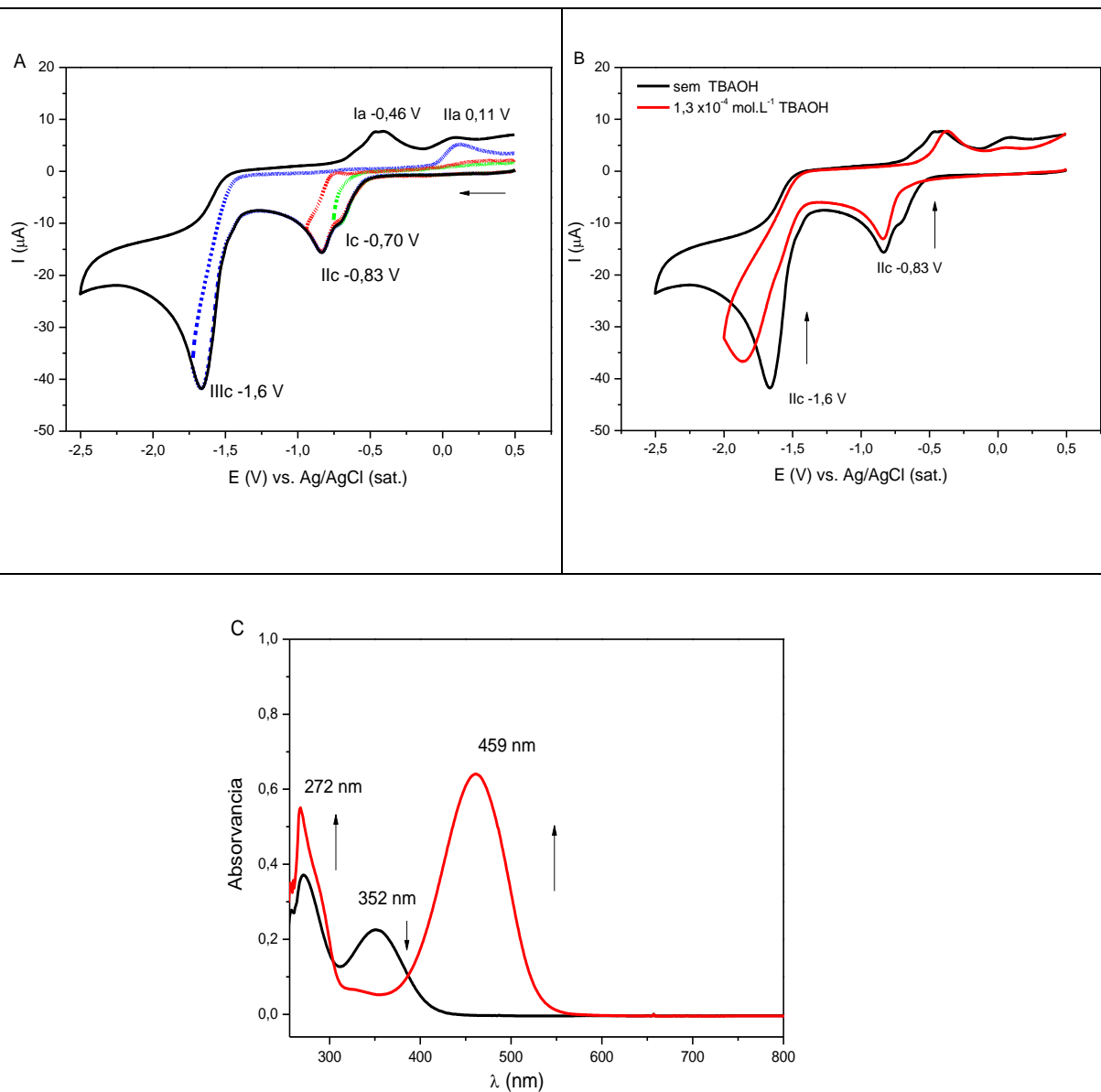
Fonte: Autor desta tese, 2016.

5.3 Estudo da interação da 3NO₂TEE e TBAOH em meio aprótico

Na análise voltamétrica da 3NO₂TEE em meio aprótico, utilizando eletrodo de carbono vítreo (ECV) (Figuras 19 A e B), o perfil voltamétrico é representado por 3 picos (Ic, IIc e IIIc), o primeiro deles, em $E = -0,7$ V, mal definido, pela proximidade com a onda IIc, em $-0,83$ V. A terceira onda de redução localiza-se em $-1,6$ V e é mais pronunciada que as outras. Além disso, ela é responsável para o surgimento da onda IIa em $0,11$ V. Na segunda varredura, a primeira onda desaparece e a terceira tem seu perfil modificado, com deslocamento catódico do potencial. Os picos IIc e IIIc são típicos de redução de nitroaromáticos e a presença de Ic sugere o mecanismo de autoprotoneação. Para confirmar, o uso de bases é fundamental, no caso, o hidróxido de tetrabutilamônio (TBAOH). Ao adicionar TBAOH ($1,3 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹), houve o desaparecimento de Ic, com permanência das ondas IIc e IIIc.

A análise espectrofotométrica (Figura 19 C) foi realizada com o material original e o resultante da adição da base. As duas bandas em 272 e 350 nm relativas ao 3NO₂TEE são observadas. O perfil modifica-se, após adição da base ($6,6 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ TBAOH), com o surgimento da banda em 459 nm, referente à formação da base conjugada e a diminuição da banda referente a transição $n - \pi^*$ da hidroxila fenólica que foi consumida durante o processo.

Figura 19. (A) VC da 3NO₂TEE em meio aprótico (DMF/ TBAPF₆, 0,1 mol L⁻¹), E = 0,5 V a -2,5 V, (B) (---) sem TBAOH, (---) 1,3 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ TBAOH, v = 0,100 V s⁻¹ ECV, c = 1,0 mmol L⁻¹ 3NO₂TEE e (C) espectro no UV-Vis (---) 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ 3NO₂TEE e (---) 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ 3NO₂TEE com 6,6 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ TBAOH.

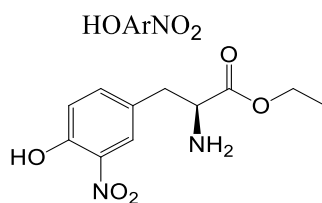


Fonte: Autor desta tese, 2016.

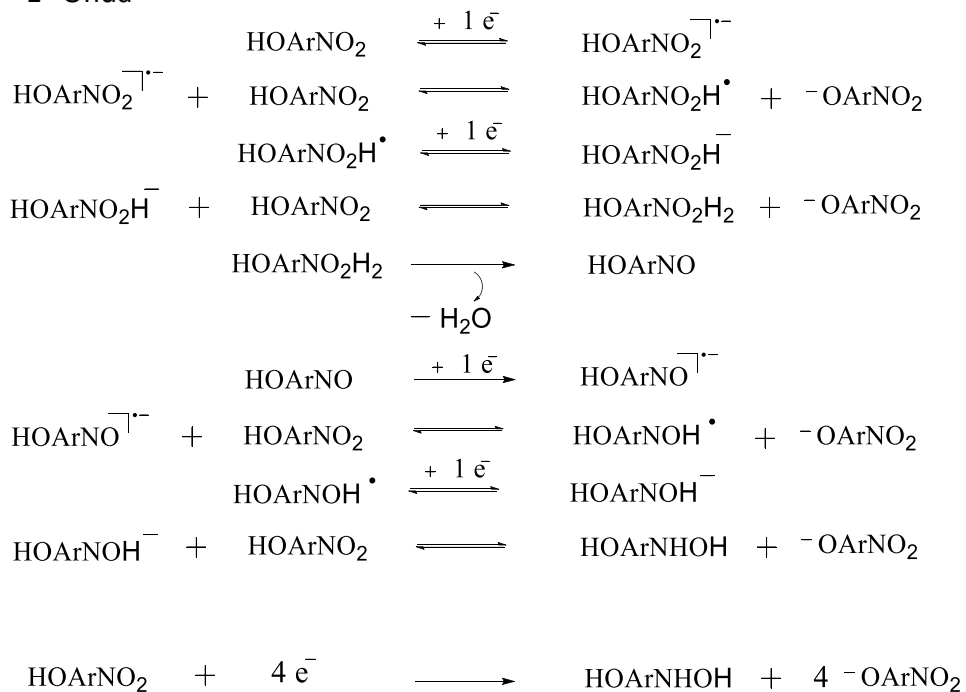
5.4. Racionalização das etapas para a redução em meio aprótico da 3NO₂TEE

Com a finalidade de racionalizar os resultados encontrados, à 3NO₂TEE será representado pela sigla HOArNO₂, sendo o –OH representativo do grupo fenólico e o –NO₂ do grupo nitroaromático, os mais importantes no processo redox. Os resultados experimentais relacionados com a primeira onda de redução de (HOArNO₂) refere-se ao processo de geração do radical-ânion-nitro (HOArNO₂^{•-}), que, devido à sua característica básica, sofre protonação a partir da substância original (HOArNO₂), caracterizando o processo de auto-protonação, formando o radical (HOArNO₂[•]) e a respectiva base conjugada (⁻OArNO₂). Nota-se que a onda Ic ($E_{pIc} = -0,72$ V) desaparece em ciclos posteriores e que a sua correspondente IIa é referente à formação da hidroxilamina (HOArNHOH) ($E_{pIIa} = -0,38$ V) (Figura 19 B). A segunda onda é atribuída à redução da base conjugada (⁻OArNO₂) onda IIc, (-0,87 V) envolvendo $4e^-/4H^+$, gerando a espécie (⁻OArNHOH) (Figura 20).

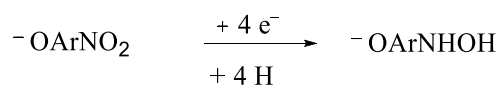
Figura 20. Etapas de redução da 3NO₂TEE, com auto-protonação, em meio aprótico.



1ª Onda



2ª Onda

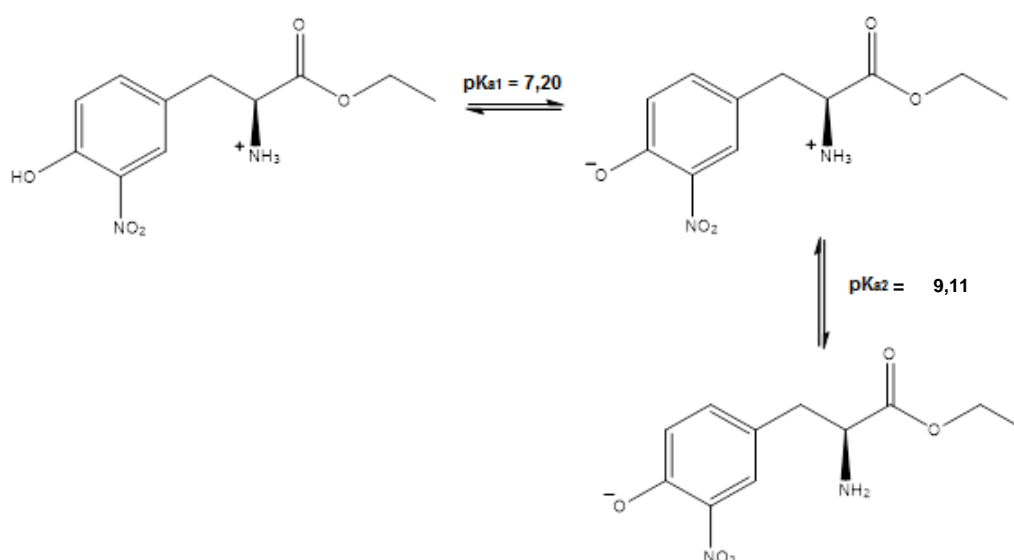


Fonte: Autor dessa tese, 2016.

5.5 Estudos eletroquímicos da 3NO₂TEE em meio prótico

A Figura 21 mostra o processo de dissociação de 3NO₂TEE e os respectivos valores de pK_{a1}= 7,20 referente à desprotonação da hidroxila fenólica, e o pK_{a2}= 9,11 do cátion amônio para gerar as bases conjugadas. Esses dados são importantes, pois, o comportamento eletroquímico da substância é dependente do pH do meio.

Figura 21. Equações de dissociação de 3NO₂TEE e respectivos valores de pK_{a1} e pK_{a2}



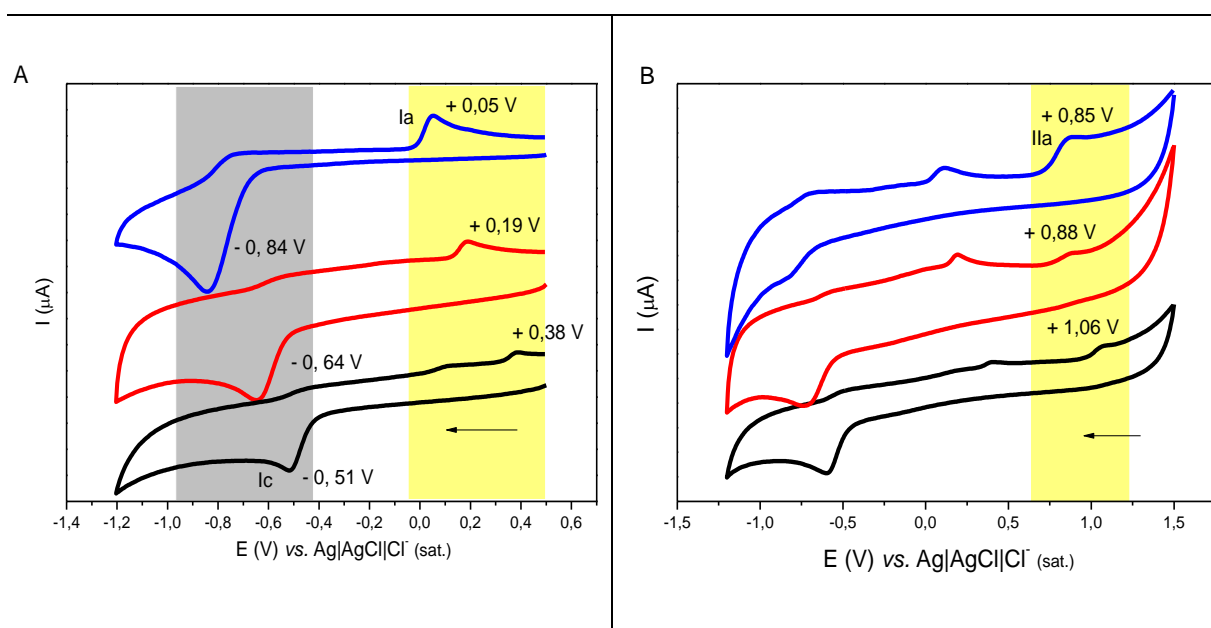
Fonte: Autor dessa tese, 2016.

A Figura 22 mostra os voltamogramas cíclicos de 3NO₂TEE ($c = 100 \mu\text{M}$), sob diferentes valores de pH (4,5; 7,4 e 10,0). O experimento mostrado na Figura 22 A foi obtido, com varredura entre $E = +0,50 \text{ V}$ e $-1,20 \text{ V}$, no sentido catódico. Na primeira varredura de potencial, nota-se o surgimento de um pico catódico (I_c) que corresponde à redução característica de nitroaromáticos, em soluções aquosas, que ocorre em uma única etapa, em processo irreversível, $E_{pIc} = -0,51 \text{ V}$ (pH 4,5), $E_{pIc} = -0,64 \text{ V}$ (pH 7,4) e $E_{pIc} = -0,84 \text{ V}$ (pH 10,0). Esse deslocamento de potencial para valores mais negativos com o aumento do pH se deve a uma maior dificuldade para a redução do nitro, envolvendo um consumo de $4 e^- / 4 H^+$, que leva à formação da hidroxilamina e liberação da água [AGRAWAL, A.; TRATNYEK, P. G. 1996; ADRES; ECMANN; SMITH, 2013]. Observa-se um pico anódico irreversível (I_a) em $E_{pa} = +0,38 \text{ V}$ (pH 4,5), $E_{pa} = +0,19 \text{ V}$ (pH 7,4) e $E_{pa} = +0,05 \text{ V}$ (pH 10,0) que

corresponde à oxidação da hidroxilamina eletrogerada durante o processo de redução [ANDRES et al., 2013].

O pico IIa em $E_{pa} = +1,06$ V, $+0,88$ V e $+0,85$ V para os valores de pH 4,5, 7,4 e 10,0, respectivamente (Figura 22 B), está relacionado com a oxidação irreversível do grupo fenólico presente na molécula e este se desloca para valores menos positivos com o aumento do pH. Isto acontece porque o processo de oxidação é facilitado em valores de pH maiores.

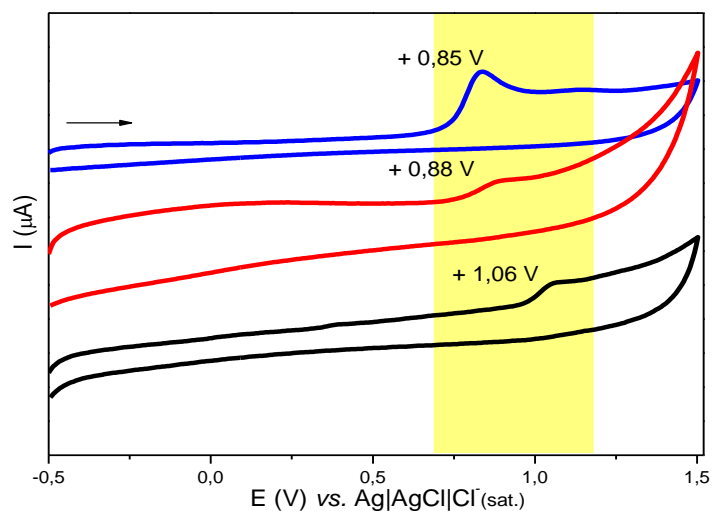
Figura 22. VC de 3NO₂TEE (c = 100 μM), em tampão acetato 0,10 M, pH 4,5, (---), tampão fosfato pH 7,4 (---) e 10,0 (---), ECV, $v = 0,100$ V s⁻¹. E = + 0,5 V a - 1,2 V, (B) E = +1,5 V a -1,2 V.



Fonte: Autor desta tese, 2016.

Na Figura 23, observa-se a presença de uma única onda anódica referente à oxidação da hidroxila fenólica. Na faixa de potencial escolhida ($-0,5$ a $+1,5$ V) não foi possível evidenciar a presença de outros grupos susceptíveis à oxidação, uma vez que não houve redução do grupo nitro.

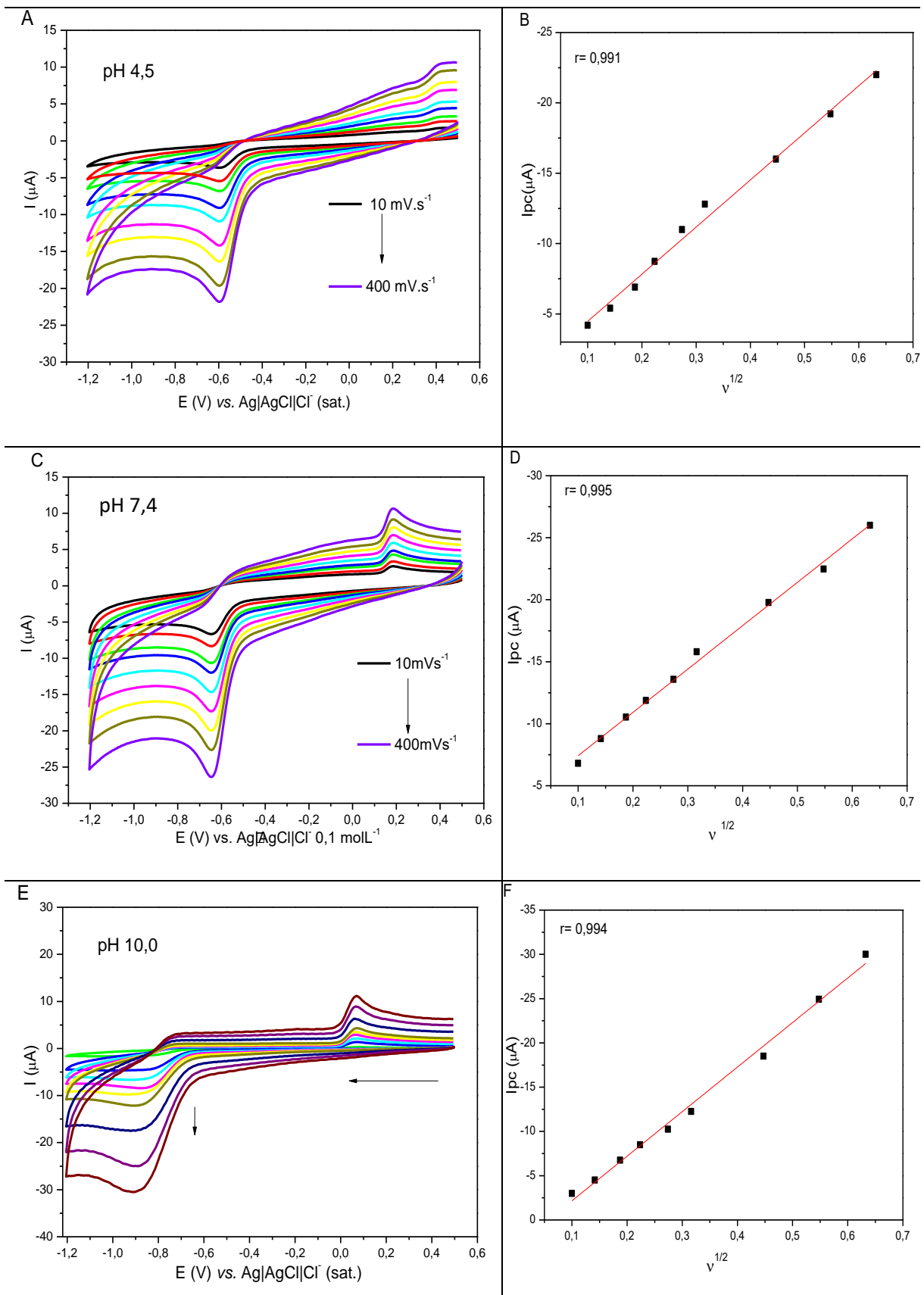
Figura 23. VC de 3NO₂TEE (c = 100 μM), em tampão acetato 0,10 M, pH 4,5, (---), tampão fosfato pH 7,4 (---) e 10,0 (---). E= - 0,5 V a + 1,5 V, v 0,100 V s⁻¹, ECV.



Fonte: Autor desta tese, 2016.

A partir do estudo voltamétrico em diferentes valores de pH (4,5, 7,4 e 10,0) (Figuras 24 A, C e E) foram obtidos os valores de intensidade de corrente para a primeira onda de redução em função da raiz quadrada da velocidade de varredura (I_{pc} vs. $v^{1/2}$). A linearidade dos pontos mostra que o transporte de massa através da solução até a superfície do eletrodo, é controlado por difusão (Figuras 24 B, D e F).

Figura 24. VC de 3NO₂TEE ($c = 100 \mu\text{M}$), $E = 0,5 \text{ V}$ a $-1,2 \text{ V}$, $v = 0,010$ a 400 V s^{-1} , pH 4,5 (A e B), 7,4 (C e D) e 10,0 (D e E). ECV. (B, D e F) i_{pc} vs. $v^{1/2}$.

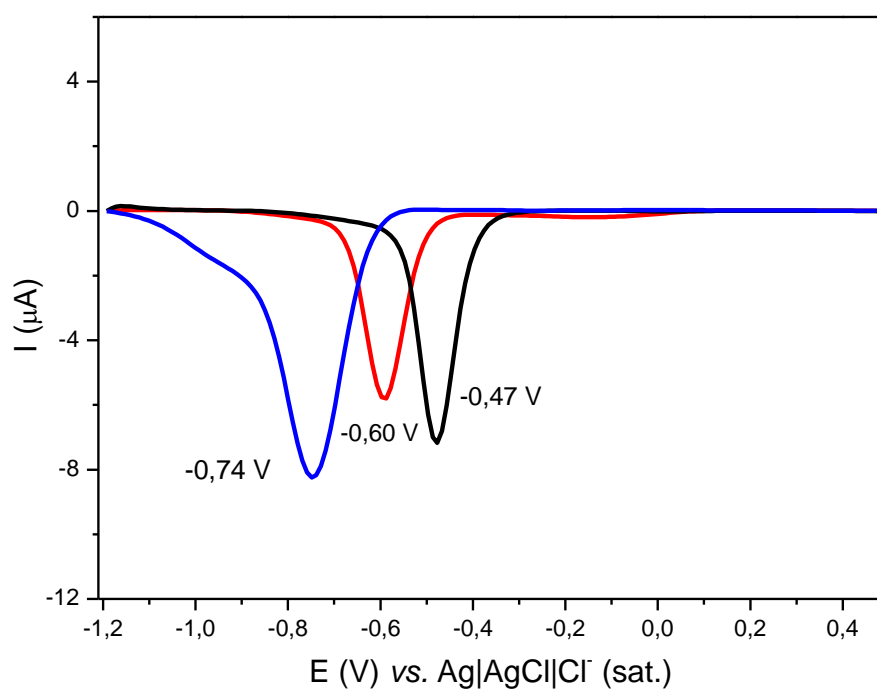


Fonte: Autor desta tese, 2016.

A VPD foi utilizada em adição à VC para estudar o comportamento da 3NO₂TEE, na redução e na oxidação, em diferentes faixas de potencial.

Na Figura 25, observa-se a onda Ic referente à redução do grupo nitro, como foi observado por voltametria cíclica, e que esta sofre deslocamento para valores mais negativos com o aumento do pH, indicando que o processo de redução é dificultado [ABREU, et al., 2002].

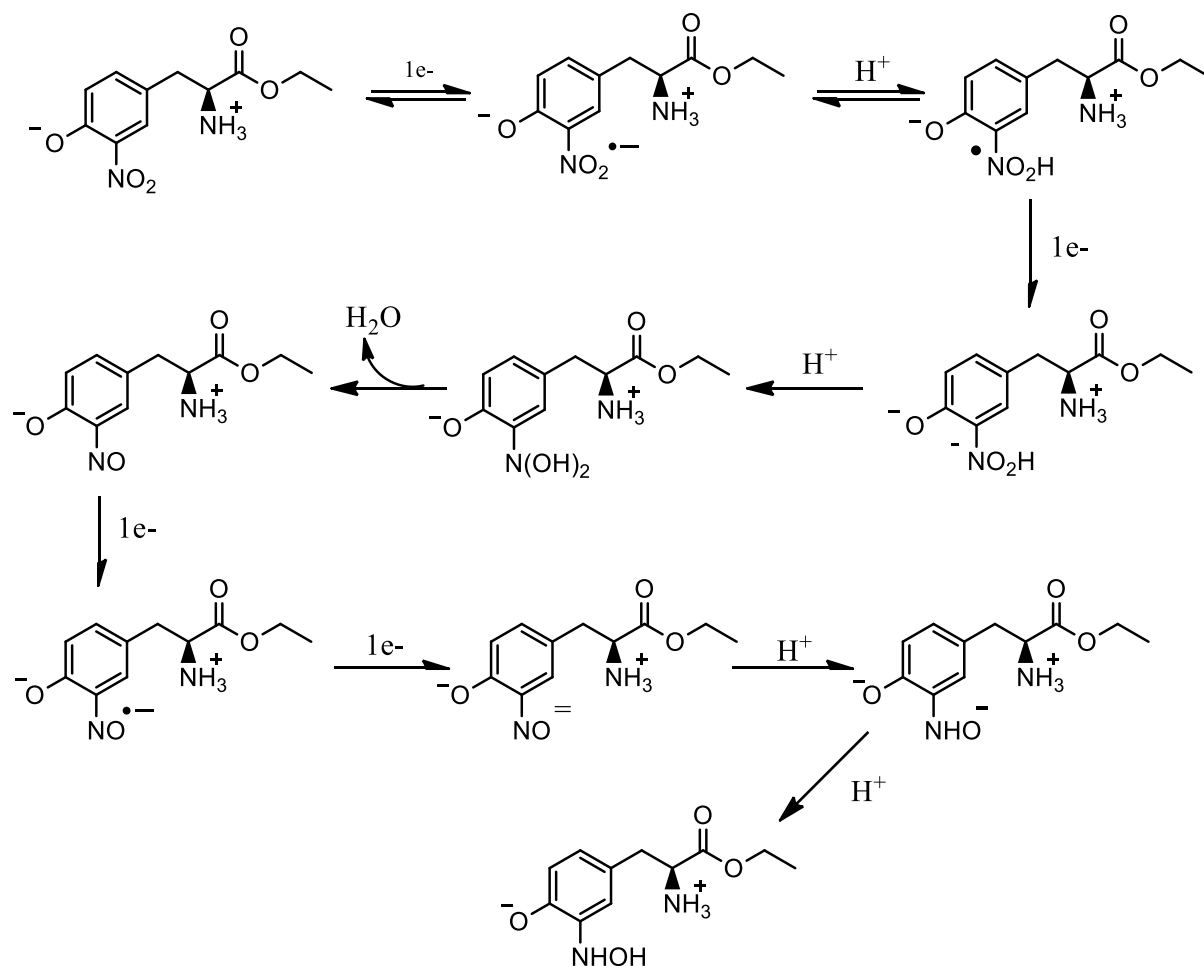
Figura 25. VPD de 3NO₂TEE (c = 100 μM), em tampão acetato 0,10 M, pH 4,5 (---), tampão fosfato pH 7,4 (---) e 10,0 (---). E= 0,5 V a -1,2 V, v = 0,005 V s⁻¹, ECV.



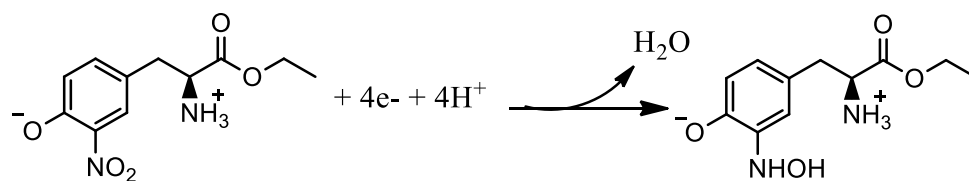
Fonte: Autor desta tese, 2016.

A racionalização mecanística para a redução da 3NO₂TEE em meio aquoso pH 7,4 pode ser resumida na Figura 26, que inclui mecanismo eletroquímico-químico-eletroquímico (ECE), com transferências de elétrons, protonações e desidratação.

Figura 26. Racionalização mecânica da redução eletroquímica da 3NO₂TEE em pH 7,4.



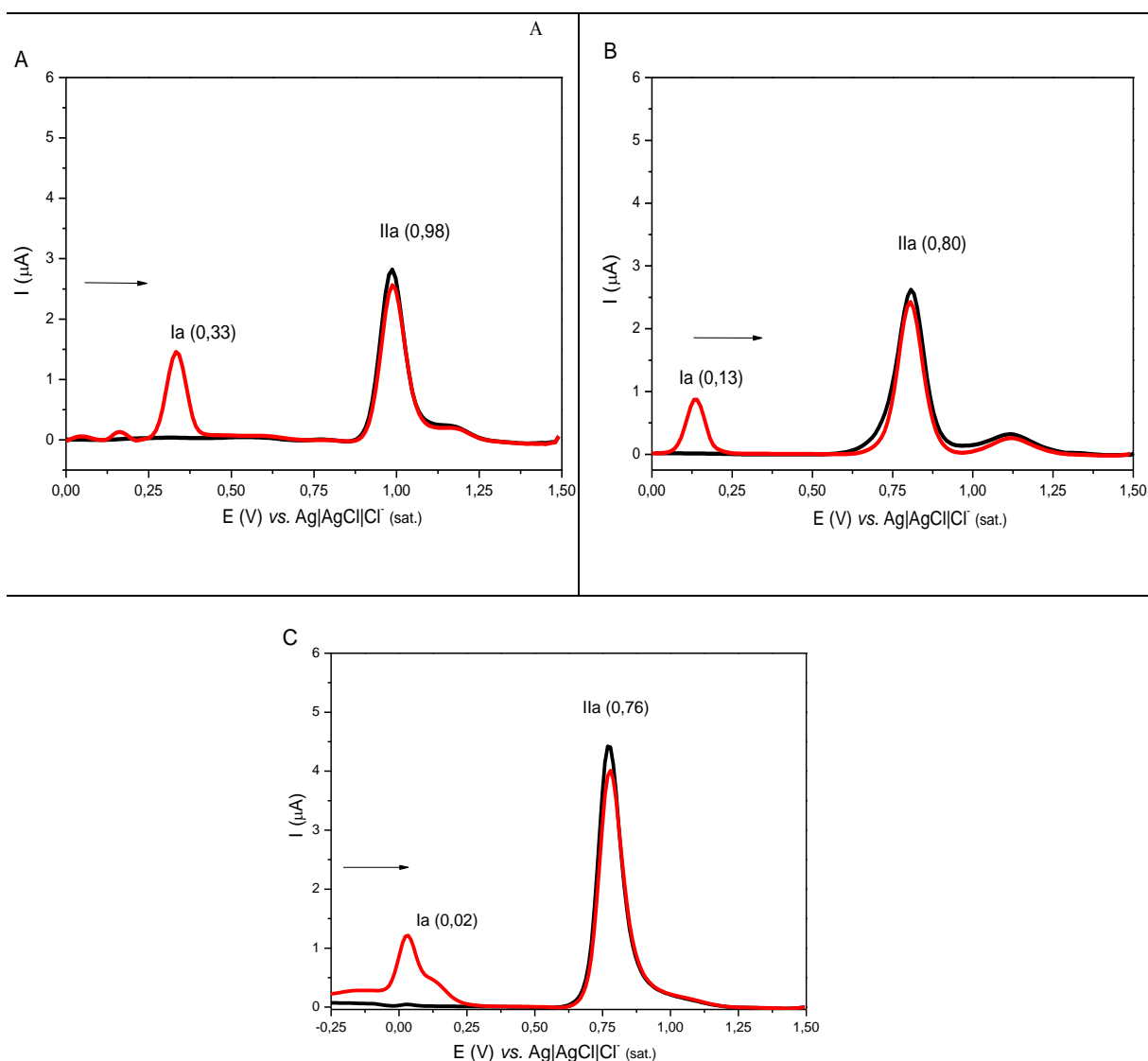
Esse mecanismo pode ser resumido em:



Fonte: Adaptado de ANDRES et al., 2013.

Na Figura 27, utilizando VPD, foi feita uma varredura no sentido anódico sem a aplicação do potencial de redução do nitro, onde foi possível observar apenas uma onda de redução referente à oxidação da hidroxila fenólica. Em seguida, condicionou-se o eletrodo com aplicação do potencial de redução do nitro durante 120 s, nos seguintes potenciais ($E_p = -0,50$ V, $E_p = -0,6$ V e $E_p = -0,75$ V), em tampão acetato, pH 4,5 e tampão fosfato pH 7,4 e 10,0, respectivamente. Assim, foi possível verificar o surgimento do pico Ia (0,33 V, 0,13 V e 0,02 V) referente à formação e oxidação da hidroxilamina, e que este desloca-se para potenciais menos positivos, à medida que o valor do pH do meio aumenta.

Figura 27. VPD de $3\text{NO}_2\text{TEE}$ ($c = 100 \mu\text{M}$), (A) tampão acetato pH 4,5; (B e C) tampão fosfato pH 7,4 e 10,0. (---) sem condicionamento; (---) 120 s de condicionamento, ECV. $v = 0,005 \text{ V s}^{-1}$. (A e B) $E = 0,0 \text{ V}$ a $-1,2 \text{ V}$ e (C) $E = -0,25 \text{ V}$ a $+1,5 \text{ V}$.



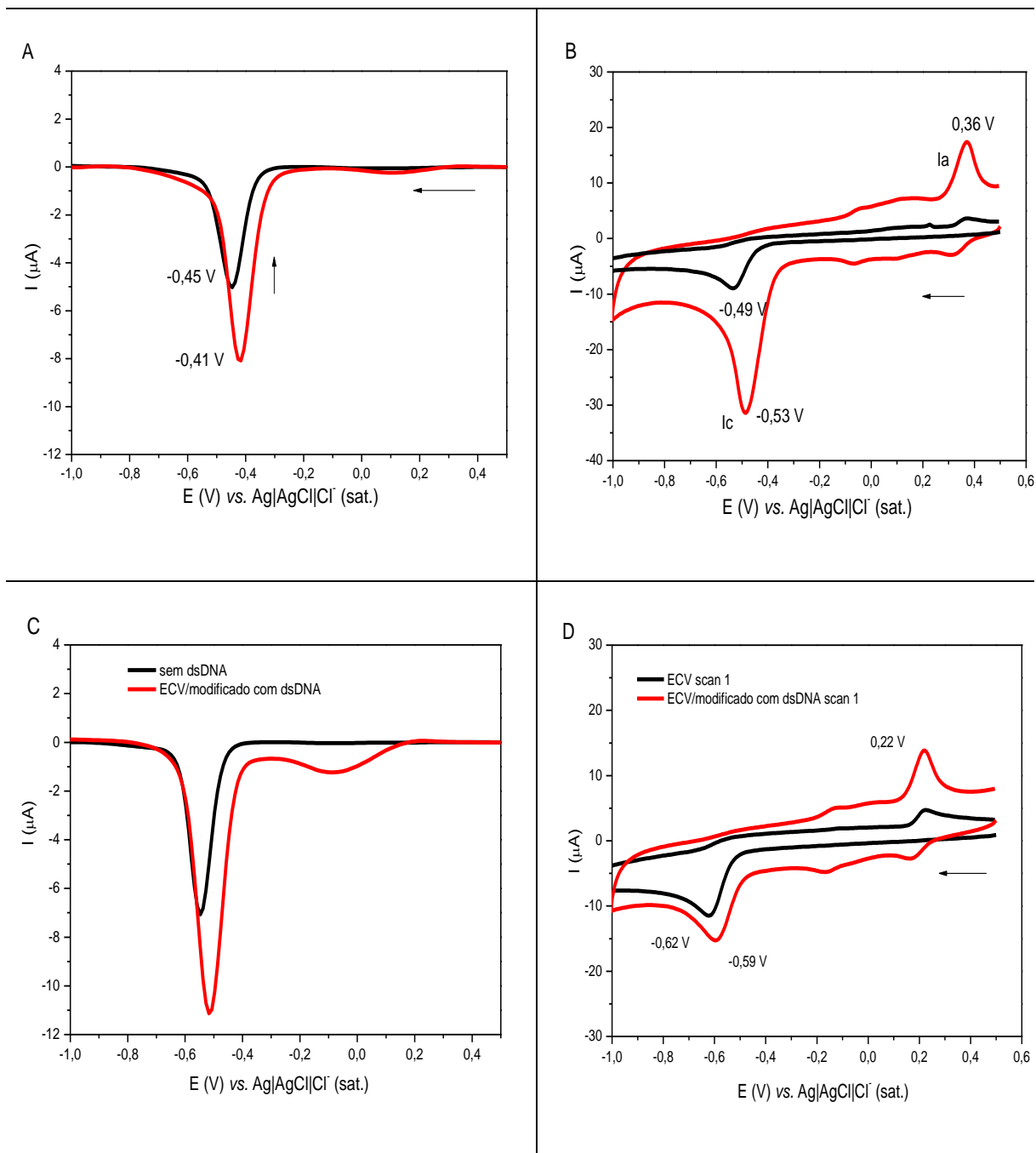
5.6 Estudos eletroquímicos 3NO₂TEE com dsDNA

5.6.1 Estudo da interação da 3NO₂TEE em biossensor de DNA

A reatividade da 3NO₂TEE frente à biomolécula do DNA foi investigada utilizando um filme de dsDNA, preparado em tampão acetato, pH 4,5, depositado sobre a superfície de um eletrodo de carbono vítreo para formar o biossensor de dsDNA.

As Figuras 28 A e C mostram os voltamogramas de pulso diferencial para a redução de 3NO₂TEE sem dsDNA e com 19,0 mmol L⁻¹ dsDNA. Quando foi utilizado ECV modificado com dsDNA na superfície do eletrodo e deixado interagir por 15 min, houve aumento significativo nas correntes de pico catódico e um ganho de potencial em cerca de 40 mV (pH 4,5) e 30 mV (pH 7,4) na redução do grupo nitro. Nas Figuras 28 B e D, verificam-se um ganho de corrente significativo quando o eletrodo foi modificado com dsDNA, indicando que o dsDNA causa uma pré-concentração da substância na superfície do eletrodo, podendo ser atribuído as interações entre as cargas negativas do grupo fosfato do DNA e a carga positiva da 3NO₂TEE.

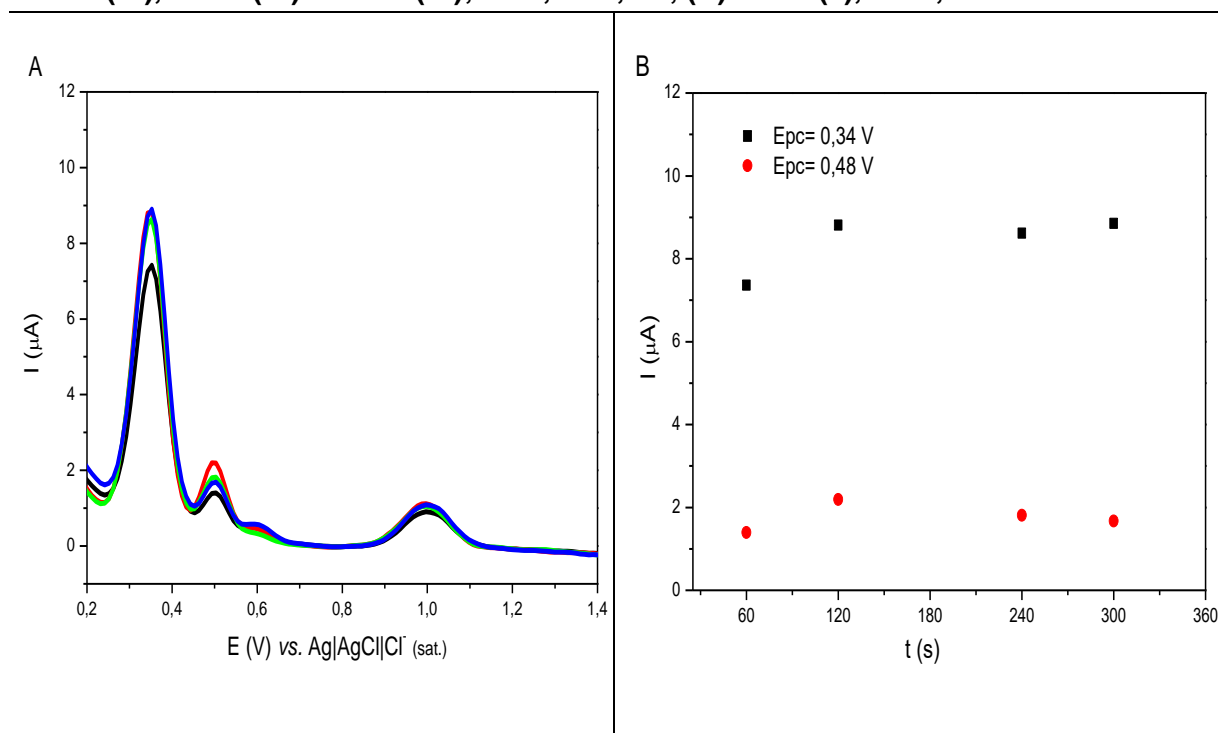
Figura 28. VPD e VC de 3NO₂TEE (c = 100 μM). (A e C) VPD (---) sem dsDNA, (---) ECV/dsDNA (19,0 mmol L⁻¹). E= 0,5 V a -1,0 V. v = 0,005 V s⁻¹. (B e D) VC (---) scan 1 sem dsDNA e (---) varredura 1 ECV/dsDNA (19,0 mmol L⁻¹). E= 0,5 V a -1,0 V. v: 0,100 V s⁻¹. A e B (pH 4,5) C e D (pH 7,4).



Fonte: Autor desta tese, 2016.

Com o intuito de verificar o melhor tempo de condicionamento para a construção do biossensor (Figura 29 A), foi necessário deixar o biossensor imerso na solução contendo 3NO₂TEE, e transcorrido o tempo de contato estabelecido de 15 min. Efetuaram-se as medidas eletroquímicas utilizando a voltametria de pulso diferencial, para averiguar possíveis modificações no perfil eletroquímico. Após essa etapa, foram aplicados diferentes tempos de condicionamento no potencial correspondente à redução do grupo nitro em tampão acetato (pH 4,5) e, logo em seguida, foi realizada varredura em potencial no sentido anódico (Figura 29 B).

Figura 29. VPD de 3NO₂TEE (*c* = 100 μM), em tampão acetato 0,10 M, pH 4,5; ECV/dsDNA (57 mmol L⁻¹). (A) Condicionamento *E*_{pc} = -0,50 V aplicado por: 60 s (---), 120 s (---), 240 s (---) e 300 s (---); *E* = 0,2 a 1,4 V; (B) *I* vs. *t* (s), *v* = 0,005 V s⁻¹

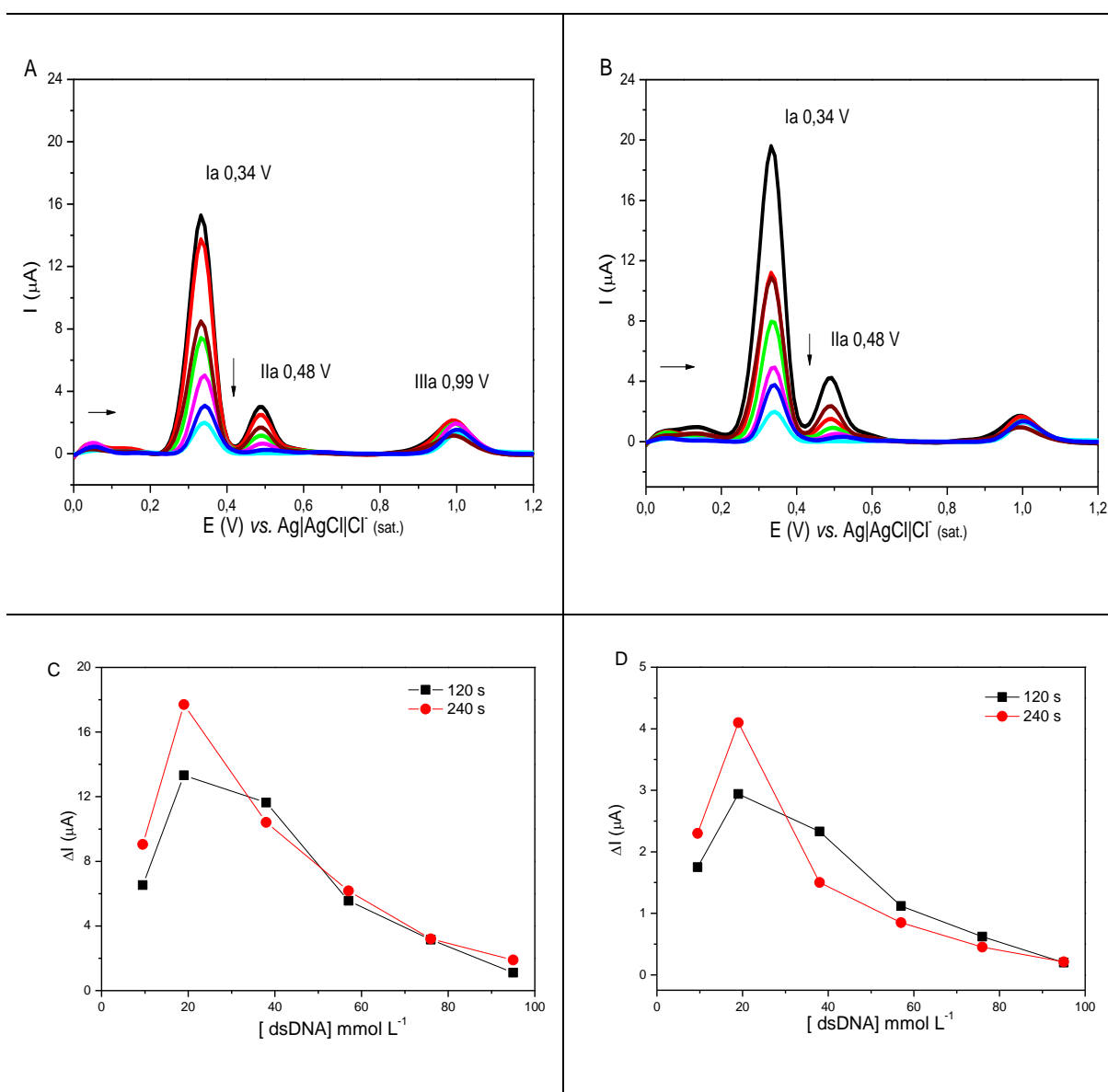


Fonte: Autor desta tese, 2016.

As Figuras 30 A e B mostram os estudos da interação em diferentes concentrações de dsDNA para a construção do biossensor na presença do 3NO₂TEE. Nesse estudo, foi aplicado um potencial de condicionamento (*E*_{pc} = -0,50 V) durante 120 e 240 s. A partir desse experimento, observa-se que com a adição de 19 mmol L⁻¹ de dsDNA na superfície do eletrodo houve um aumento significativo das correntes dos picos Ia (0,34 V) e IIa (0,48 V). No entanto, em sucessivas adições de

dsDNA, as correntes dos referidos picos diminuíram, devido a um possível e parcial bloqueio da superfície do eletrodo, dificultando a resposta eletroquímica (Figuras 30 C e D). Antes de cada modificação, foram feitas a limpeza e o condicionamento do eletrodo. Esse procedimento foi útil para garantir uma melhor resposta para os estudos eletroquímicos em sequência.

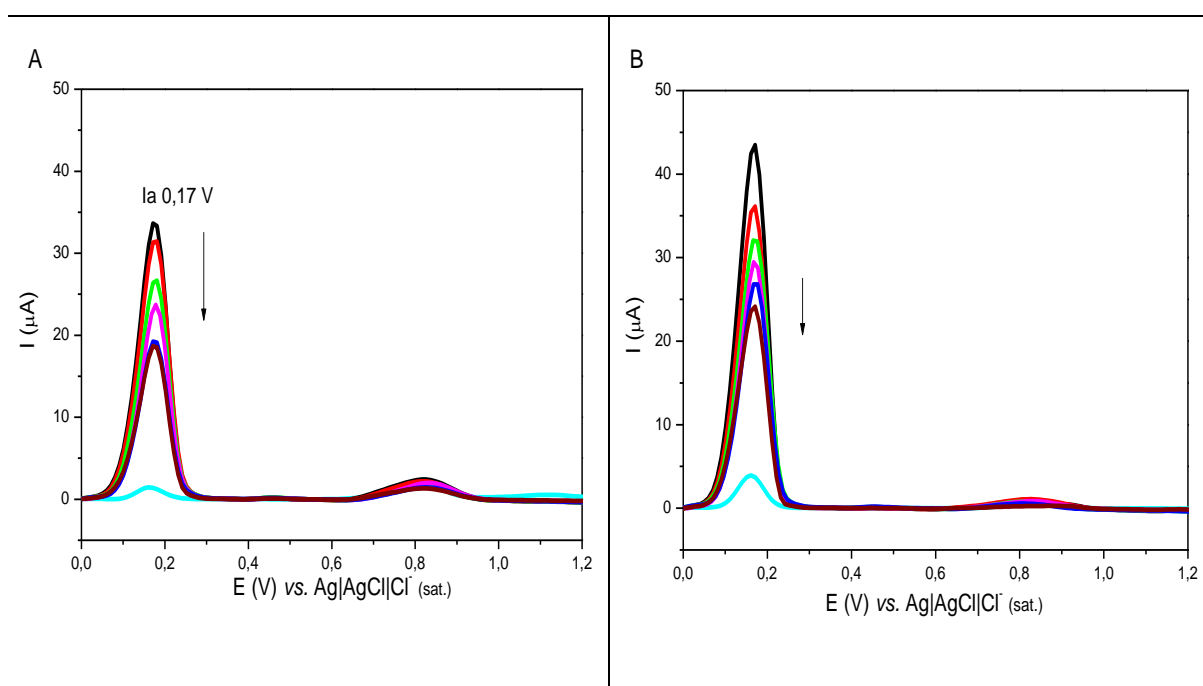
Figura 30. VPD de $3\text{NO}_2\text{TEE}$ ($c = 100 \mu\text{M}$), em tampão acetato $0,10 \text{ M}$, $\text{pH } 4,5$; ECV/ dsDNA ($E_{\text{pc}} = -0,50 \text{ V}$), (A) 120 s e (B) 240 s de condicionamento. (A e B) sem dsDNA (---), $9,5 \text{ mmol L}^{-1}$ (---), 19 mmol L^{-1} (---), 38 mmol L^{-1} (---), 57 mmol L^{-1} (---), 76 mmol L^{-1} (---) e 95 mmol L^{-1} (---) de dsDNA; Faixa de potencial: $0,0 \text{ V}$ a $1,2 \text{ V}$; (C) ΔI_{a} vs. [dsDNA] e (D) ΔI_{a} vs. [dsDNA]; 120 s (---) e 240 s (---), $v = 0,005 \text{ V s}^{-1}$.

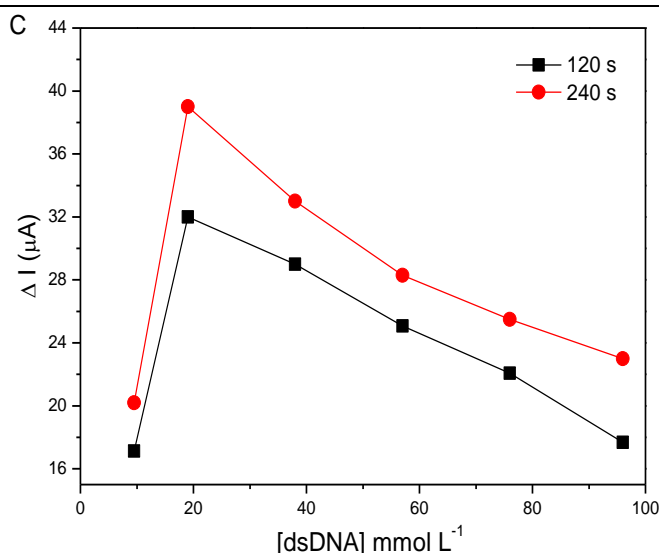


Fonte: Autor desta tese, 2016.

A Figura 31 mostra diferentes tempos de condicionamento para a construção do biossensor, em tampão fosfato pH 7,4 (Figuras 31 A e B). Para isso, foi necessário deixar o biossensor imerso na solução, e em seguida, efetuaram-se as medidas eletroquímicas utilizando VPD. Como visto anteriormente (Figura 30), quando foi adicionado 19 mmol L^{-1} de dsDNA na superfície do eletrodo houve um aumento significativo das correntes dos picos Ia e após consecutivas adições de dsDNA, houve uma diminuição significativa na corrente do pico Ia. Isto provavelmente ocorreu devido a um possível bloqueio da superfície do eletrodo. A Figura 31 C mostra a variação da corrente de pico anódica em função da concentração de DNA na superfície do ECV, aplicando 120 e 240 s de condicionamento para o biossensor proposto.

Figura 31. VPD de $3\text{NO}_2\text{TEE}$ ($c = 100 \mu\text{M}$), em tampão fosfato $0,10 \text{ M}$, pH 7,4; ECV/dsDNA ($E_{pc} = -0,58 \text{ V}$), (A) 120 s e (B) 240 s de condicionamento. Sem dsDNA (---), $9,5 \text{ mmol L}^{-1}$ (---), 19 mmol L^{-1} (---), 38 mmol L^{-1} (---), 57 mmol L^{-1} (---), 76 mmol L^{-1} (---) e 95 mmol L^{-1} (---) de dsDNA; $E = 0,0 \text{ V}$ a $1,2 \text{ V}$; (C) ΔI_a vs. [dsDNA], 120 s (---) e 240 s (---). $v = 0,005 \text{ V s}^{-1}$.





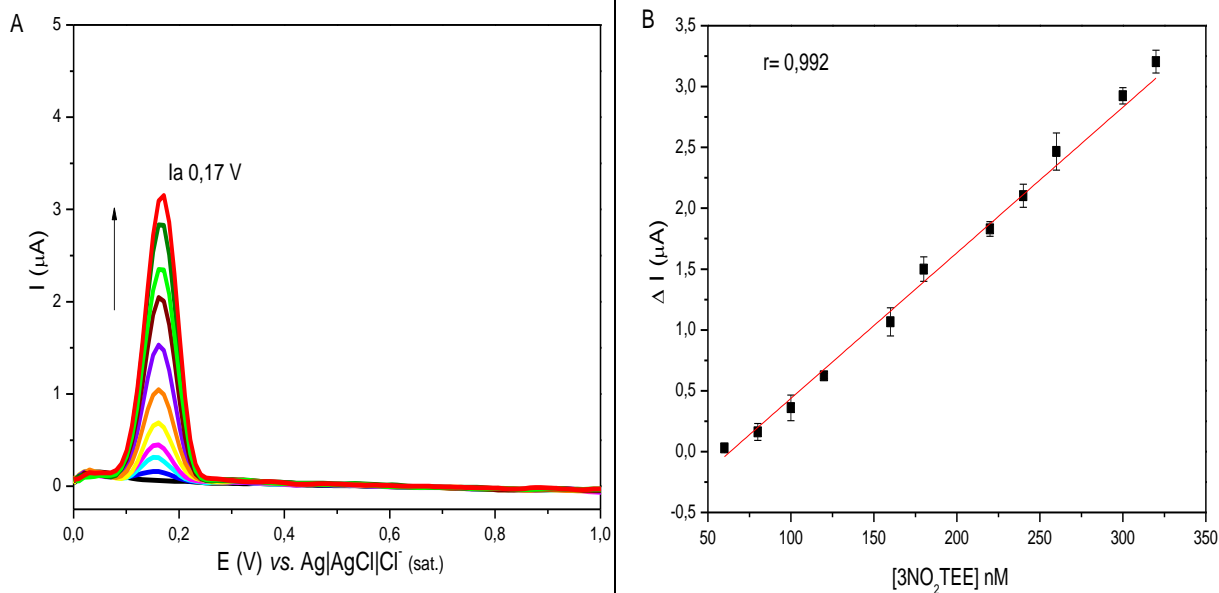
Fonte: Autor desta tese, 2016.

5.7 Determinação da curva analítica

Para obter a curva analítica de $3\text{NO}_2\text{TEE}$, no biossensor em estudo, foram utilizadas diferentes concentrações do analito, em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4). Antes de cada adição de dsDNA na superfície do eletrodo, foram feitas a limpeza e o condicionamento para garantir uma melhor resposta para obtenção dos dados analíticos. Após essa etapa, foi aplicado um potencial de condicionamento ($E_{\text{pc}} = -0,55 \text{ V}$) durante um período de 240 s e em seguida, foi feita a varredura no sentido anódico. A curva analítica foi construída com o acompanhamento do aumento da corrente do pico Ia ($0,17 \text{ V}$) (Figura 32 A).

Assim, o ECV/dsDNA para $3\text{NO}_2\text{TEE}$ mostrou uma faixa linear de 60 a 320 nmol L^{-1} , com um coeficiente de correlação de 0,992 (Figura 32 B).

Figura 32. VPD de 3NO₂TEE, em tampão fosfato 0,10 M, pH 7,4; ECV/dsDNA (19 mmol L⁻¹), t_{cond} 240s. (A) sem 3NO₂TEE (---), 60 nmol L⁻¹ (---), 80 nmol L⁻¹ (---), 100 nmol L⁻¹ (---), 120 nmol L⁻¹ (---), 160 nmol L⁻¹ (---), 180 nmol L⁻¹ (---), 220 nmol L⁻¹ (---), 240 nmol L⁻¹ (---), 260 nmol L⁻¹ (---), 300 nmol L⁻¹ (---) e 320 nmol L⁻¹ (---) 3NO₂TEE; E = 0,0 V a 1,0 V. v = 0,005 V s⁻¹; (B) ΔI_a vs. [3NO₂TEE].



Fonte: Autor desta tese, 2016.

Os limites de detecção e quantificação encontrados foram determinados usando uma razão $3 \sigma/b$ e $10 \sigma/b$, sendo σ , o desvio padrão do valor médio para dez análises em VPD do branco e b o coeficiente angular da curva analítica, determinado de acordo com as recomendações da IUPAC (Analytical Methods Committee, 1987).

Diante disso, os resultados encontrados com um derivado da nitrotirosina é uma prova de conceito e indicam que o biossensor desenvolvido nesse trabalho pode ser aplicado para detecção de 3-NT, em amostras reais.

O biossensor de DNA utilizado no presente trabalho mostra claramente os primeiros resultados eletroquímicos para detecção in situ de 3NO₂TEE e a

possibilidade do uso do biossensor como um biomarcador promissor para danos gerados por peroxidonitrito.

A construção do biossensor de DNA foi avaliada com o uso das técnicas de voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial. O estudo de tempo de condicionamento foi útil para avaliação da melhor resposta para o desenvolvimento do biossensor, indicando uma melhor resposta quando foram aplicados 240 s. Assim, o ECV/dsDNA mostrou uma faixa linear de 60 a 320 nmol L⁻¹

A curva analítica para 3NO₂TEE foi feita utilizando VPD, sob condições de pH neutro, apresentou boa sensibilidade e o limite de detecção e quantificação encontrados foram 58 nmol L⁻¹ e 200 nmol L⁻¹.

6 EXPERIMENTAL (PARTE 2)

6.1 Reagentes

Os seguintes reagentes foram obtidos de seus respectivos fornecedores e utilizados sem tratamento prévio: 5-nitroindol (5-NID), ácido ascórbico (AA) e ácido úrico (AU) foram obtidos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), fosfato de sódio monobásico monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), fosfato de sódio dibásico diidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), hidróxido de sódio (NaOH), ácido clorídrico (HCl) e ácido nítrico (HNO_3) foram obtidos da Vetec.

Todos os reagentes químicos utilizados foram de grau analítico. Todas as soluções foram preparadas em água ultrapura (18,2 M Ω .cm) de um sistema de purificação Milli-Q da Millipore Inc.

Os nanotubos de carbono de paredes múltiplas (do inglês *multi-walled carbon nanotubes*, MWCNT), obtidos da Sigma, passaram por tratamento prévio com ácido nítrico. As dispersões dos nanotubos foram feitas no ultrassom (Key ULTRASONIK).

6.2 Preparação das soluções estoque do AA e AU

A solução de AA foi preparada pela adição de 1,76 mg em 1,0 mL de tampão fosfato pH 7,0 para obter uma concentração de $1,0 \times 10^{-2}$ M. O AU foi preparado adicionando 1,68 mg em 500 μL de NaOH (0,1 M), e em seguida, foi adicionado 500 μL de tampão fosfato pH 7,0, afim de obter uma concentração de $1,0 \times 10^{-2}$ M.

6.3 Equipamentos para estudos eletroquímicos

Para os estudos eletroquímicos foi utilizado um potenciostato modelo PGSTAT30 da AUTOLAB, interfaceado a um microcomputador (software:GPES 4,9) e foi empregado para as medidas eletroquímicas. Além disso, nos estudos amperométricos foi empregado um eletrodo de disco rotatório (EDR), com velocidade de rotação de 100 rpm.

A morfologia dos MWCNT após funcionalização e MWCNT/poli-5NID foi avaliada utilizando um microscópio eletrônico de varredura da Shimadzu e o metalizador da Quorum, utilizando a tensão de aceleração de 10kV e um banho de ouro no ECV/MWCNT/poli-5NID. As análises foram obtidas no Instituto Federal de Alagoas-IFAL, Campus Maceió.

Foram realizadas medidas de AFM no ECV, ECV/MWCNT após funcionalização e MWCNT/poli-5NID. Estas medidas foram realizadas no microscópico de força atômica Nanosul Modelo FlexAFM do Laboratório Nacional de nanotecnologia (LNNano) em Campinas. O modo de operação foi por contato intermitente com scan rate: 0,5 - 1Hz.

Os experimentos foram realizados no Renishaw inVia Raman Microscope com laser de 785 nm. O modo de operação foi por espectro estático (centro 1500 cm^{-1}), com 1 s de exposição, 10% da potência do laser e 50 acumulações.

6.4 Limpeza do eletrodo de carbono vítreo (ECV)

O ECV foi polido com alumina (0,3 μm), lavado com água milli-Q, levado ao ultrassom por 1 min, em etanol e lavado com água novamente. A limpeza do eletrodo foi verificada por voltametria cíclica, utilizando $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ e $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 1 mM, em KCl 0,1 M, sistema bem reversível em potenciais adequados. Em seguida, o ECV foi lavado com água e secado a temperatura ambiente.

6.5 Tratamento dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT)

Em um balão de fundo redondo de 50 mL foram pesados 50 mg de nanotubos de carbono de paredes múltiplas. A seguir, adicionou-se 20 mL de ácido nítrico concentrado, promovendo, principalmente, a abertura das extremidades e a inserção de grupos superficiais (carboxílicos e hidroxílicos, por exemplo). Deixou-se o sistema em aquecimento entre 140 - 150 $^{\circ}\text{C}$, sob refluxo, durante 4 h. Transferiu-se a mistura para um funil de Buchner no qual foi filtrada e lavada sucessivamente com água Milli-Q, até obter uma solução com valor de pH 7,0 [STOBINSKI *et al.* 2010].

6.6 Estudo da eficiência eletrocatalítica (EEC) frente ao AA

6.6.1 Preparação das dispersões de MWCNT

Em quatro eppendorfs, foram pesados 0,5, 1,0, 2,5 e 5,0 mg de MWCNT (obtido do tratamento com ácido nítrico) e adicionado a cada um 1,0 mL de DMF. Esta mistura ficou sob agitação no ultrassom por 2 h para uma melhor dispersão. Após essa etapa, na superfície do ECV, foram adicionadas cinco alíquotas de 1,0 μL de cada dispersão de MWCNT com auxílio de uma micropipeta, em cada adição, o DMF foi evaporado lentamente em estufa a 80 $^{\circ}\text{C}$, durante 10 minutos, para só então serem adicionadas as próximas frações, em seguida, os cinco ECV/MWCNT preparados foram colocados na solução da 5-NID para a polimerização na faixa de potencial de 0 a 1,2 V. Posteriormente, foram realizadas as análises eletroquímicas frente ao AA na faixa de potencial de -0,4 a 0,4 V.

6.6.2 Preparação das soluções de 5-NID

Inicialmente, foram pesados 1,0, 2,0, 2,7 e 3,4 mg da 5-NID e dissolvidas em 4,0 mL de HCl 0,1 M. Após essa etapa, cada eletrodo (ECV/MWCNT) foi colocado nas soluções de 5-NID para a polimerização na faixa de potencial de 0 a 1,2 V, e posteriormente, os ECV/MWCNT/poli-at-5-NID foram utilizados na presença de AA ($E = -0,4$ a 0,4 V), em solução.

6.6.3 Variação do número de ciclos para a polimerização

Para obter as melhores condições na preparação do sensor, também, foi necessário variar o número de ciclos durante a polimerização. O número de ciclos estudados durante a polimerização foi: 5, 10, 15, 20 e 25. Após esse procedimento, o ECV/MWCNT/poli-at-5-NID foi utilizado na presença de AA ($E = -0,4$ a 0,4 V).

6.6.4 Variação da velocidade de varredura para a polimerização

As velocidades de varredura estudadas na polimerização foram: 10, 20, 30, 40 e 50 mV s^{-1} . Após esse procedimento, o ECV/MWCNT/poli-at-5-NID foi utilizado na presença de AA ($E = -0,4$ a 0,4 V) com o objetivo de obter a melhor eficiência eletrocatalítica.

6.7 Preparação do sensor com MWCNT e 5-NID

Na superfície do ECV foram adicionadas cinco alíquotas de 1,0 μL da dispersão de MWCNT ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$) com o auxílio de uma micropipeta. Em cada adição, o DMF foi evaporado lentamente em estufa a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 minutos para só então serem adicionadas as próximas frações. Após essa etapa, o eletrodo ECV/MWCNT foi levado a uma solução contendo $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$ da 5-NID onde 20 ciclagens foram realizadas na faixa de 0,0 a 1,2 V vs. Ag/AgCl/Cl⁻, em 4,0 mL de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, em velocidade de $0,020 \text{ V s}^{-1}$. O eletrodo quimicamente modificado foi caracterizado por diferentes técnicas, conforme mostrado a seguir, no ítem 6.10.

6.8 Emprego do ECV/MWCNT/poli-at-5-NID na análise de AA e AU

O ECV/MWCNT/poli-at-5-NID foi imerso em 5,0 mL de tampão fosfato pH 7,0, sob atmosfera de nitrogênio. A eliminação de oxigênio dissolvido foi feita pelo borbulhamento de um fluxo de $\text{N}_2 \text{ (g)}$, nas soluções, durante 10 minutos, antes das análises eletroquímicas. Em seguida, foram adicionadas alíquotas de AA e AU, em diferentes concentrações e os sinais foram comparados com o sinal do branco (ausência dos analitos). Nestes experimentos foi selecionada uma faixa de potencial entre -0,4 a 0,4 V vs. Ag/AgCl, por voltametria cíclica no sentido anódico, a uma velocidade de varredura de $0,005 \text{ V s}^{-1}$.

6.9 Emprego do ECV/MWCNT/poli-at-5-NID em amostras de urina e soro

A amostra de urina foi diluída 25 vezes em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) pH 7,0, antes das análises eletroquímicas. Em seguida, o ECV/MWCNT/poli-at-5-NID foi imerso em tampão fosfato, na presença de alíquotas de urina.

Assim como realizado para amostra de urina, a amostra de soro foi diluída 25 vezes em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) pH 7,0, antes das análises eletroquímicas. Em seguida, o ECV/MWCNT/poli-at-5-NID foi imerso em tampão fosfato, na presença de soro. Esses experimentos foram realizados com o intuito de obter resposta eletroquímica para AA e AU.

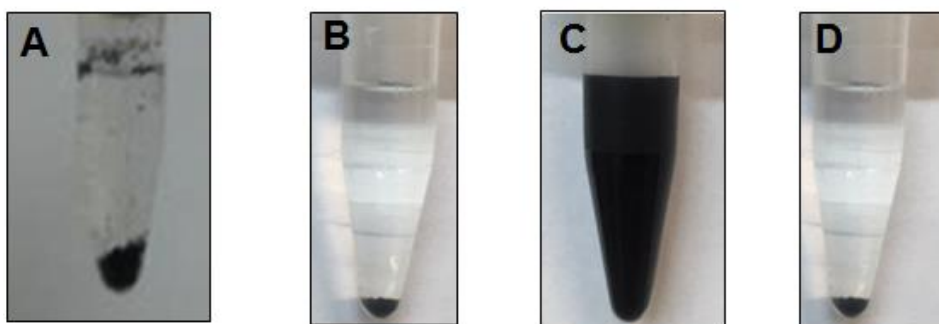
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO (PARTE 2)

7.1 Dispersão dos nanotubos de carbono em DMF

O ultrassom foi utilizado na dispersão dos nanotubos em DMF, pois promove a separação dos agregados de tubos unidos por interações de Van der Waals. Na Figura 33 observam-se os NTCs, após tratamento ácido (Figura 33 A) e sem o tratamento (Figura 33 B) em 0 min no ultrassom. No entanto, ao analisar a Figura 33 C, percebe-se que os NTCs funcionalizados foram dispersos com sucesso em DMF após um período de 2 h no ultrassom, fato evidenciado pela cor escura da suspensão, diferente do que acontece com os nanotubos não tratados. Mesmo após o período de 2 h no ultrassom, esses não formaram dispersão em DMF (Figura 33 D).

A modificação química nos nanotubos de carbono está relacionada com a formação de grupos carboxílicos em sítios defeituosos dos NTCs promovida pela oxidação em meio ácido.

Figura 33. Formação da dispersão do MWCNT/DMF ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$): (A) MWCNT após o tratamento ácido com 0 min no ultrassom, (B) MWCNT sem tratamento com 0 min no ultrassom, (C) MWCNT após o tratamento ácido e 2 h no ultrassom, (D) MWCNT sem tratamento e 2 h no ultrassom.



Fonte: Autor desta tese, 2016.

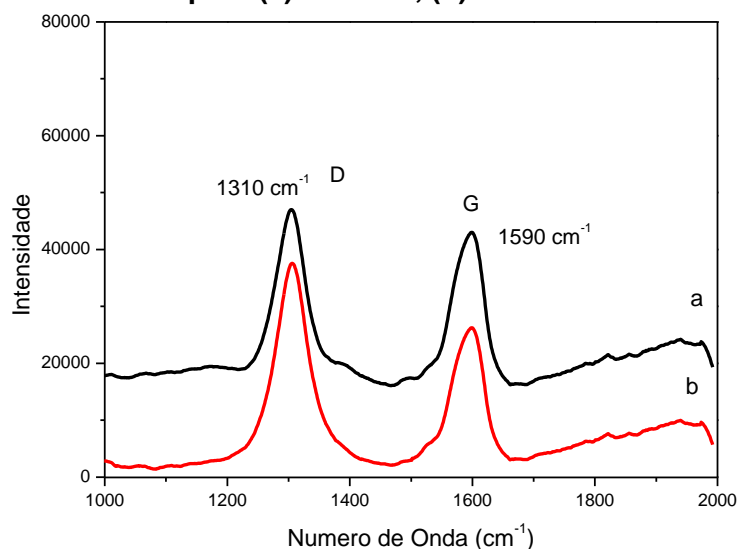
7.2 Caracterização dos nanotubos funcionalizados

7.2.1 Espectroscopia Raman para MWCNT

Um espectro típico de uma amostra de nanotubos de carbono possui, em geral, duas bandas bem características: a banda G (tangential mode), centrada em cerca de 1580-1590 cm^{-1} , associada aos modos de vibração tangencial, e a banda D (disorder induced), centrada em aproximadamente 1350 cm^{-1} , associada a defeitos e/ou desordem [LOBO *et al.*, 2005]. A banda D é característica de carbono desordenado, sendo que sua largura e intensidade são fatores que variam com o grau de desordem do material. Assim, a análise da forma, posição e intensidade relativa destas bandas permite obter o grau de pureza e/ou defeitos na amostra.

O grau de desordem na estrutura dos nanotubos de carbono pode ser estimado através da razão entre as intensidades relativas das bandas D e G (I_D/I_G) [PAIVA *et al.*, 2004]. Quanto menor o valor da razão I_D/I_G , maior o grau de grafitação, ou seja, menor será a concentração de defeitos estruturais nos tubos (carbonos sp^3); quanto maior o valor I_D/I_G maior será a extensão da funcionalização química. Na Figura 34 estão mostrados os espectros para os nanotubos de carbono de paredes múltiplas não funcionalizados e funcionalizados. Através desses espectros foram calculadas as razões I_D/I_G e verificada a ocorrência de modificação química.

Figura 34. Espectros Raman para (a) MWCNT, (b) MWCNT funcionalizado.



Fonte: Autor desta tese, 2016.

Para os nanotubos de carbono sem funcionalização, a razão I_D/I_G foi igual a 1,21. Para os nanotubos de carbono funcionalizados, a razão I_D/I_G foi igual a 1,43. A avaliação das intensidades relativas das bandas D e G sugere a presença de defeitos nos nanotubos de carbono induzidos pela funcionalização química e que o tratamento com HNO_3 promoveu uma maior desordem e modificação química nos NTCs [SILVA, 2007].

7.3 Preparação do eletrodo modificado com o 5-nitroindol (5-NID)

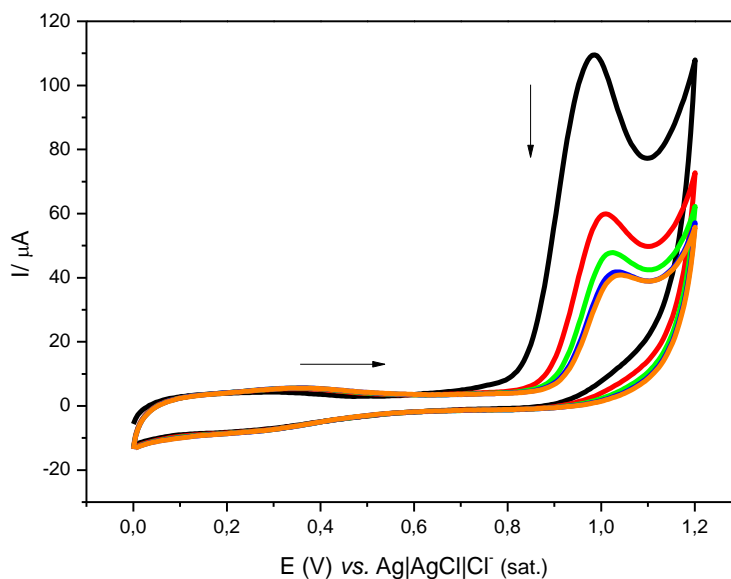
Inicialmente, foi feito o estudo eletroquímico para determinar as melhores condições na produção do sensor. Também foram utilizadas as técnicas de microscopia eletrônica de varredura, força atômica e XPS para a caracterização da superfície modificada.

7.4 Polimerização eletrooxidativa

A Figura 35 mostra os voltamogramas cíclicos correspondentes à eletropolimerização de 5-NID, utilizando várias varreduras de potencial de 0 a 1,2 V. A primeira varredura de potencial mostra uma onda anódica referente à oxidação do monômero em 0,98 V. O processo anódico é irreversível, pois não há pico correspondente ao processo reverso.

Durante a varredura de potencial, é possível observar o aumento de corrente a partir de 0,8 V vs. Ag/AgCl/Cl⁻. Entretanto, após sucessivas varreduras de potencial, observa-se que há uma perda gradual da eletroatividade como evidenciado pela diminuição gradativa na corrente dos voltamogramas cíclicos, na medida em que ocorre a oxidação do monômero e a deposição do polímero. Não há mudança no potencial de oxidação. O filme polimérico não condutor obtido foi utilizado em experimentos posteriores.

Figura 35. Voltamogramas cíclicos para o processo de eletropolimerização da 5-nitroindol ($3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\nu = 0,020 \text{ V s}^{-1}$; ECV/MWCNT ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$).

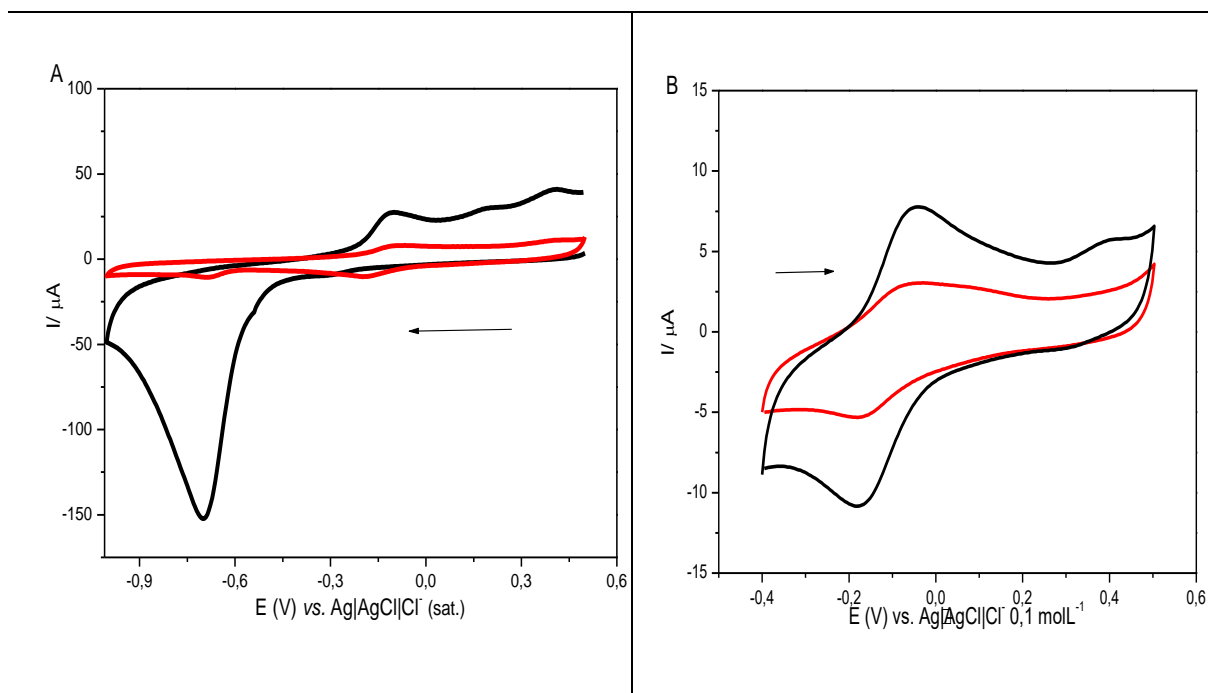


Fonte: Autor desta tese, 2016.

7.5 Eletroativação do ECV/MWCNT/poli-5-NID

Após o processo de imobilização (polimerização via técnica potenciodinâmica), $E_i = 0,0$ e $E_\lambda = 1,0$ vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{Cl}^-$, o grupo nitro (ArNO_2) presente na 5-NID foi ativado eletroquimicamente *in situ*, a partir de varreduras sucessivas de potencial no sentido catódico entre $0,6$ e $-1,0 \text{ V}$ vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{Cl}^-$. Este procedimento foi realizado porque o grupo nitro, no seu estado oxidado, não tem atividade eletrocatalítica para oxidação de AA e AU. Por outro lado, a eletrorredução irreversível do grupo nitro via quatro elétrons e quatro prótons, leva à formação do grupo hidroxilamina (ArNHOH), que pode ser oxidado reversivelmente ao grupo nitroso (ArNO) correspondente, gerando o par redox hidroxilamina/nitroso ($\text{ArNHOH} / \text{ArNO}$) (Figura 36), corroborando com vários trabalhos reportados recentemente na literatura científica [LIMA et al., 2008; SANTHIAGO et al., 2009; SANTHIAGO et al., 2010; MUNTEANU et al., 2004; LIMA et al. 2008b; RADOI e COMPAGNONE, 2009].

Figura 36. Voltamogramas cíclicos para o processo de ativação do ECV/MWCNT/poli-at-5-NID, em solução tampão pH 7,0; (A) após a polimerização em scan 1 (---), sem polimerização scan 1 (---), $E = 0,5$ a $-1,0$ V, $\nu = 0,020$ V s⁻¹; (B) ECV/MWCNT/poli-at-5-NID após a polimerização em solução tampão pH 7,0 (---) e sem polimerização (---), $E = -0,4$ a $0,4$ V, $\nu = 0,005$ V s⁻¹.

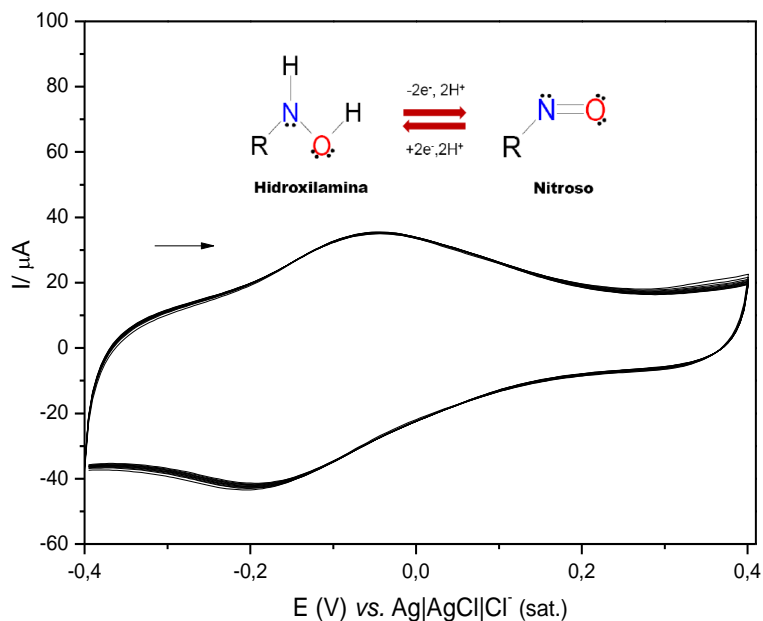


Fonte: Autor desta tese, 2016.

7.6 Estudo da estabilidade do ECV/MWCNT/poli-at-5-NID

Após o processo de ativação do ECV/MWCNT/poli-at-5-NID, a estabilidade do sensor referente ao par redox (ArNHOH/ArNO) foi avaliada por meio de varreduras sucessivas de potencial. A variação de corrente de pico foi avaliada, calculando o desvio padrão relativo como observado em alguns trabalhos [LIMA, *et al.*, 2008]. Dessa forma, após 100 ciclos não houve qualquer mudança significativa nas respostas voltamétricas, indicando que o sensor proposto (ECV/MWCNT/poli-5-at-NID) possui uma boa estabilidade (Figura 37).

Figura 37. Voltamogramas Cíclicos para 100 varreduras de potencial do ECV/MWCNT/ poli-at-5-NID, em solução tampão pH 7,0; $\nu = 0,050 \text{ V s}^{-1}$; $E = -0,4 \text{ a } 0,4 \text{ V vs. Ag|AgCl|Cl}^-$.

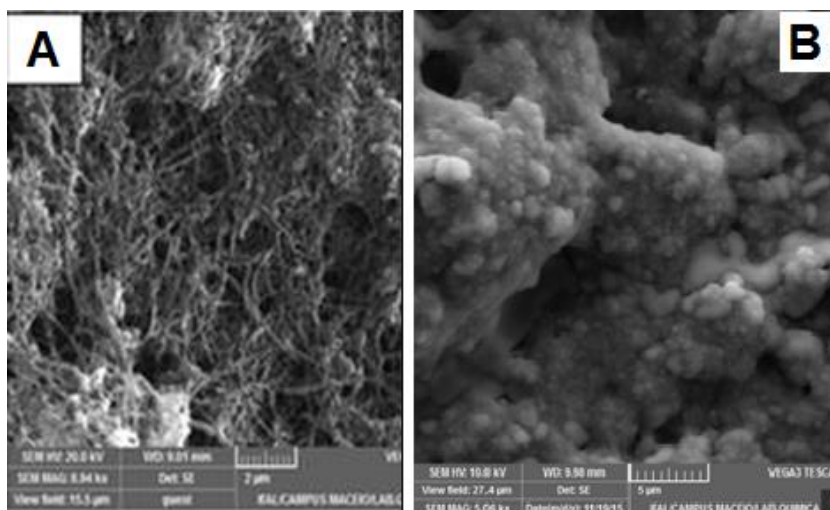


Fonte: Autor desta tese, 2016.

7.7 Caracterização estrutural por Microscopia eletrônica de varredura do ECV/MWCNT e ECV/MWCNT/poli-at-5-NID

A morfologia da superfície do ECV/MWCNT/poli-at-5-NID foi caracterizado por MEV. A imagem após o tratamento ácido (Figura 38 A) revela que a rede de MWCNT forma uma matriz tridimensional, retorcida, densamente empacotada, com grande porosidade proporcionando uma fase ídeal para capturar mediadores. Na Figura 38 B é possível observar que a superfície dos nanotubos foi recoberta com o polímero formado. A imagem de MEV confirmou a natureza rugosa e formas irregulares do polímero na superfície do MWCNT. A natureza rugosa contribuiu para aumentar de forma significativa a superfície eletroativa do eletrodo e facilita a difusão dos analitos no filme polimérico.

Figura 38. MEV do ECV/MWCNT 8.900x (A) e ECV/MWCNT/poli-at-5-NID 5.06x (B).

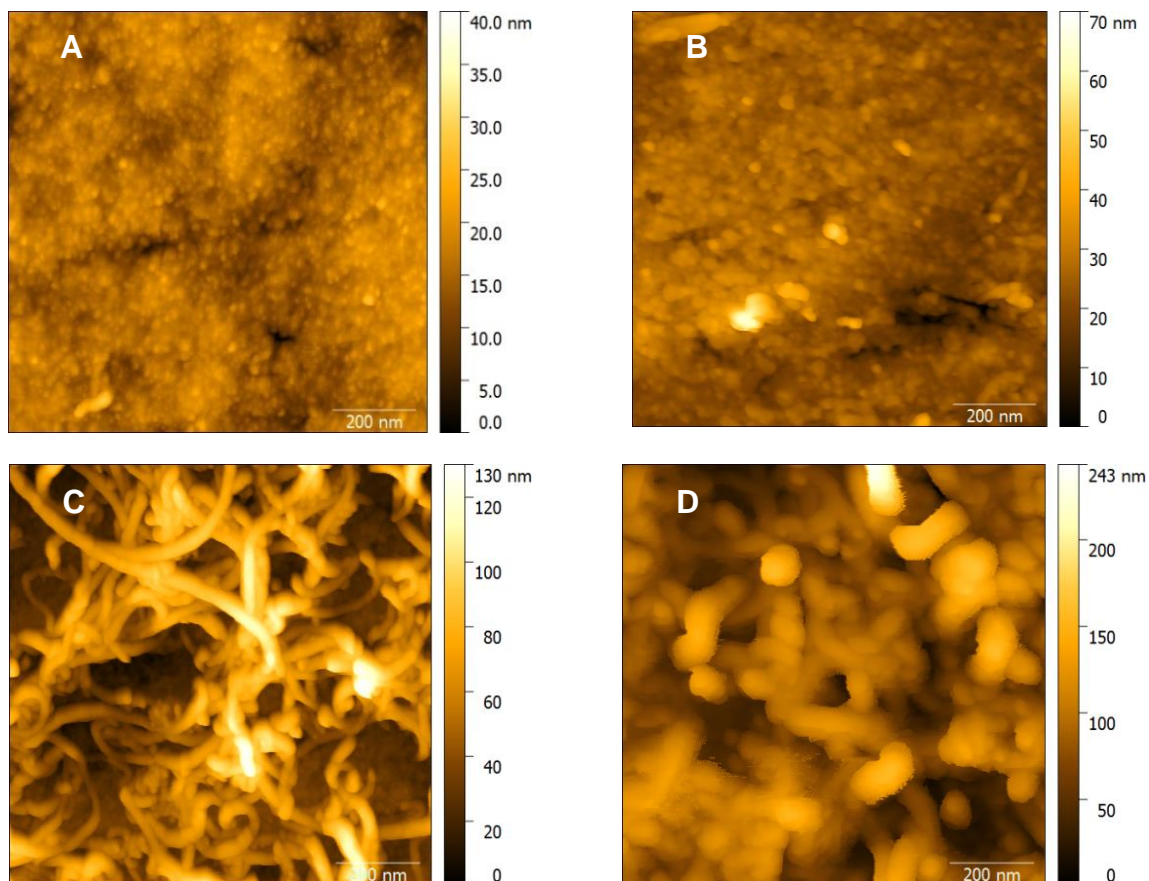


Fonte: Autor desta tese, 2016.

7.8 Microscopia de força atômica do ECV, ECV/poli-at-5-NID, ECV/MWCNT e ECV/MWCNT/poli-at-5-NID

Nesta etapa do trabalho foi estudada a morfologia e a mudança de rugosidade por microscopia de força atômica (AFM) dos vários eletrodos construídos. Na Figura 39 A, observa-se a micrografia do ECV. Quando foi feita a polimerização no eletrodo de carbono vítreo, foi possível observar o surgimento de pequenos aglomerados (Figura 39 B). Na Figura 39 C, verifica-se a morfologia do ECV/MWCNT, e quando este passou pelo processo de polimerização, no ECV/MWCNT/poli-5NID, observaram-se pequenos aglomerados na superfície dos nanotubos de carbono.

Figura 39. AFM do ECV (A), ECV/poli-at-5-NID (B), ECV/MWCNT (C) e ECV/MWCNT/poli-at-5-NID (D), 1 x 1 μm .



Fonte: Autor desta tese, 2016.

Conforme listado na Tabela 5, quando foi feita a polimerização no eletrodo de carbono vítreo a rugosidade foi de 5,20 nm, enquanto que o eletrodo sem a polimerização apresentou 2,87 nm de rugosidade. Isto indica que houve a formação de um filme na superfície do ECV. Da mesma forma, quando o ECV foi modificado com MWCNT, a rugosidade apresentou um valor de 22,80 nm. Após o processo de polimerização sobre o nanotubos de carbono, obteve-se um valor de rugosidade de 30,80 nm, indicando que houve modificação na superfície do MWCNT. A análise do ECV/MWCNT/poli-at-5-NID não pode ser efetuada, devido à impossibilidade de fazer a ativação redox no local do experimento.

Tabela 5. Valores de rugosidade média para ECV, ECV/poli-5-NID, ECV/MWCNT e ECV/MWCNT/poli-at-5-NID.

ELETRODOS	RUGOSIDADE MÉDIA (nm)
ECV	2,87
ECV/poli-at-5-NID	5,20
ECV/MWCNT	22,80
ECV/MWCNT/poli-at-5-NID	30,80

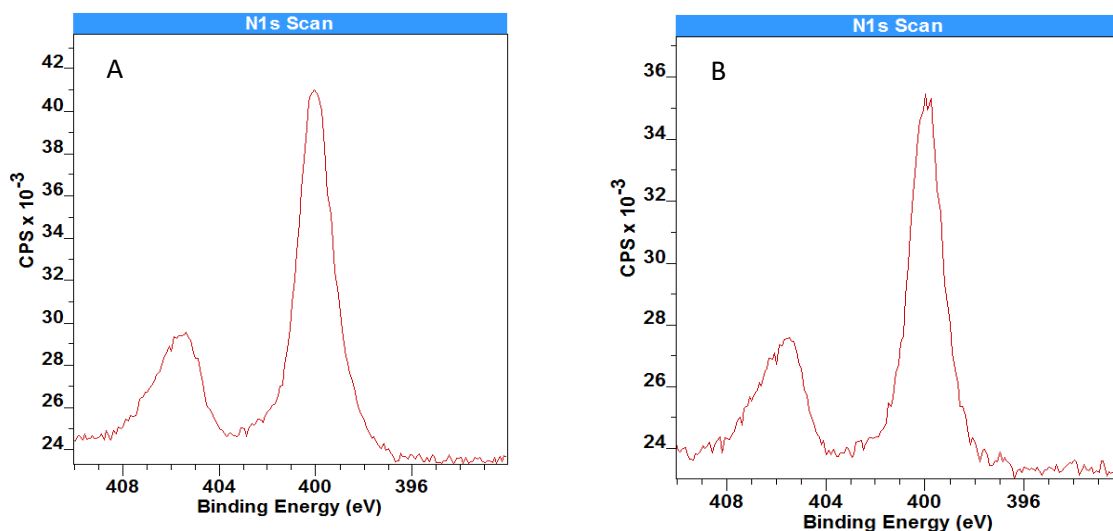
Fonte: Autor desta tese, 2016.

7.9 Espectroscopia fotoeletrônica de raios-X (XPS)

Após o processo de polimerização do ECV, foi realizada a caracterização da superfície do eletrodo por XPS dos ECV/poli-5-NID e ECV/MWCNT/poli-5-NID, a fim de confirmar a ocorrência da modificação.

Na Figura 40, pode-se observar que, realmente houve modificação na superfície dos eletrodos devido à presença do pico característico do par redox hidroxilamina/nitroso. Os espectros registrados para os dois sensores exibiram dois picos, um de menor intensidade em 405,9 eV e outro de maior intensidade em 399,9 eV (Figura 40 A e B). De acordo com dados da literatura, este primeiro pico em 405,9 eV pode ser atribuído ao grupo nitro presente na molécula [IVASHENKO et al., 2013]. O segundo pico com menor energia é mais difícil de ser assinalado, uma vez que pode ser atribuído a vários grupos contendo nitrogênio como grupos NH₂, NO e NHOH. No nosso caso, vimos em experimentos anteriores que a ativação do grupo nitro (0,5 a -1,0 V) que ocorre após o processo de polimerização, há formação do sistema reversível ArNHOH/ArNO na superfície do eletrodo ECV/MWCNT/poli-at-5-NID, isso indica que o pico em 399,9 eV é referente ao par hidroxilamina/nitroso. Portanto, os resultados mostram que durante a polimerização (0 a 1,2 V) ocorreu de forma eficiente a formação da espécie na superfície do eletrodo.

Figura 40. Espectros de XPS para N 1s, (A) ECV/poli-5-NID e (B) ECV/MWCNT/poli-5-NID.



Fonte: Autor desta tese, 2016.

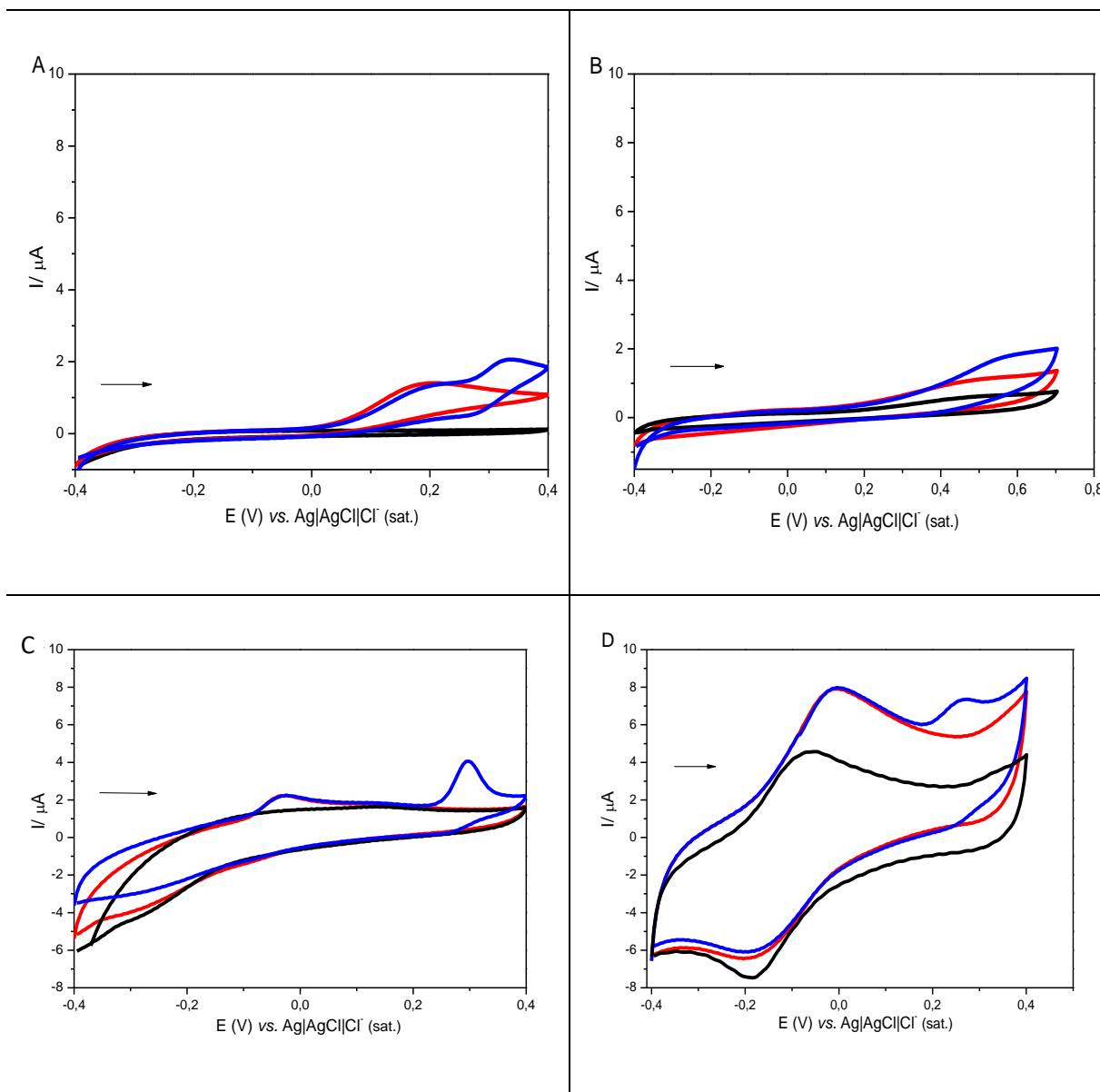
De posse desses resultados, foi necessário determinar as características cinéticas do sensor desenvolvido para a determinação de AA e AU.

7.10 Oxidação eletrocatalítica de AA e AU

A atividade eletrocatalítica do ECV foi avaliada na oxidação de AA e AU (Figura 41 A). Os potenciais de pico de oxidação de AA e AU são 0,20 V e 0,33 V. Na Figura 41 B é possível observar os sinais referentes à oxidação do AA e AU, com a utilização do eletrodo modificado com ECV/poli-5-NID. Nesse estudo observa-se que é impossível analisar a contribuição de cada composto na mistura, já que, não apareceram os picos referentes aos potenciais de oxidação dos analitos. Este comportamento pode ser atribuído à passivação do ECV com o polímero eletrogerado na superfície do eletrodo.

Na Figura 41 C, com a utilização do ECV modificado apenas com nanotubos de carbono (ECV/MWCNT), são apresentados voltamogramas bem definidos com os potenciais de oxidação de $E_{AA} = -0,031$ V e $E_{AU} = 0,30$ V. Entretanto, o eletrodo ECV/MWCNT/poli-at-5-NID apresentou maior sensibilidade com $E_{AA} = -0,015$ V e $E_{AU} = 0,26$ V (Figura 38 D) quando comparado com ECV, ECV/poli-5-NID/ e ECV/MWCNT.

Figura 41. Voltamogramas cíclicos de (A) ECV, (B) ECV/poli-at-5-NID, (C) ECV/MWCNT e (D) ECV/MWCNT/poli-at-5-NID. Branco (---), 200 μM AA (---); 200 μM AA + 200 μM AU (---). Tampão fosfato, pH 7,0. $\nu = 0,005 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$.



Fonte: Autor desta tese, 2016.

Na Tabela 6, são listados os potenciais de oxidação do AA e AU, bem como, a variação de corrente para cada sistema. Esse estudo foi realizado em diferentes plataformas (ECV, ECV/poli-at-5-NID, ECV/MWCNT e ECV/MWCNT/poli-at-5-NID), onde é possível observar os potenciais de oxidação e a variação de corrente para cada analito e seus respectivos sensores. Dentre os dispositivos analisados, o ECV/poli-at-5-NID, não apresentou os potenciais de oxidação para AA e AU. Este

comportamento se deve a um possível bloqueio da superfície do eletrodo de carbono vítreo, dificultado a oxidação dos AA e AU.

Portanto, é possível observar que o sensor à base de ECV/MWCNT/poli-at-5-NID apresentou a melhor resposta, com uma variação de corrente de 3,52 μA para AA e um potencial de 0,260 V para AU. Esse ganho de sensibilidade e seletividade se deve à facilidade de transferência de elétrons do polímero eletrogerado na superfície do eletrodo e os analitos.

Tabela 6. Potenciais de oxidação do AA e AU, em diferentes sistemas por voltametria cíclica em solução tampão fosfato pH 7,0.

Plataformas	E_{pa} AA (V)	ΔI_{AA} (μA)	E_{pa} AU (V)	ΔI_{AU} (μA)
ECV	0,200	1,270	0,331	1,90
ECV/poli-at-5-NID	-	-	-	-
ECV/MWCNT	-0,031	0,750	0,300	2,47
ECV/MWCNT/ poli-at-5-NID	-0,015	3,52	0,260	2,06

Fonte: Autor desta tese, 2016.

7.11 Otimização dos parâmetros de ativação

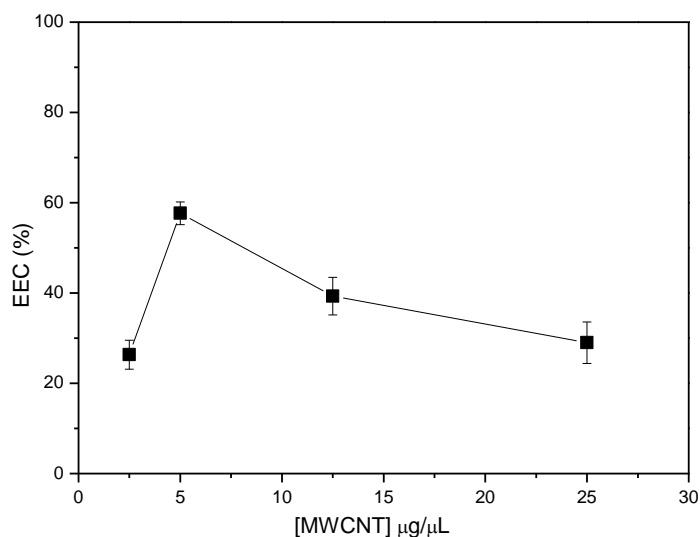
Para a preparação do eletrodo modificado, inicialmente, foi necessário à otimização de alguns parâmetros que podem influenciar na resposta do eletrodo. A quantidade de nanotubos de carbono foi o primeiro a ser otimizado. Para isto, foram preparados eletrodos com diferentes quantidades de nanotubos 2,5, 5, 12,5 e 25 μg . Cada um desses eletrodos foi submetido a 20 ciclagens na faixa de potencial de 0,0 a 1,2 V para a polimerização do 5-NI na plataforma nanoestruturada ECV/MWCNT. Nesse estudo, foi utilizado uma solução da 5-nitroindol $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em meio ácido e uma velocidade de varredura $v = 0,020 \text{ V s}^{-1}$. A eficiência eletrocatalítica foi avaliada adicionando ácido ascórbico em uma solução tampão pH 7,0 contendo o ECV/MWCNT/poli-at-5-NID e feita a análise no sentido anódico ($E = -0,4$ a $0,4 \text{ V}$).

Para avaliar os melhores resultados, o cálculo da eficiência eletrocatalítica (EEC) foi usado, utilizando-se a equação abaixo [GLIGOR et al., 2009].

$$EEC = \frac{(I_p)_{AAconcX} - (I_p)_{AAconc0}}{(I_p)_{AAconc0}} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Sendo, o $(I_p)_{AAconcX}$ a corrente de pico com AA na concentração de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ enquanto $(I_p)_{AAconc0}$ é a corrente de pico sem o AA (Branco). As varreduras foram realizadas em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a uma velocidade de $0,005 \text{ V s}^{-1}$. Para a modificação do ECV foram efetuadas 5 adições de $1 \mu\text{L}$ de nanotubos de carbono. Entre cada adição, o ECV/MWCNT foi deixado na estufa à $80 \text{ }^\circ\text{C}$ por um período máximo de 10 minutos para completa evaporação do DMF. A Figura 42 mostra que a eficiência eletrocatalítica variou quando a quantidade de nanotubos sofreu aumento de $2,5$ a $25 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$, sendo constatado que a melhor resposta foi obtida, ao utilizar $5,0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de MWCNT na superfície do eletrodo.

Figura 42. Eficiência eletrocatalítica (EEC) para o ECV/MWCNT/poli-at-5-NID frente ao AA, variando a quantidade de nanotubos. Tampão fosfato, pH 7,0. $v = 0,005 \text{ V s}^{-1}$.

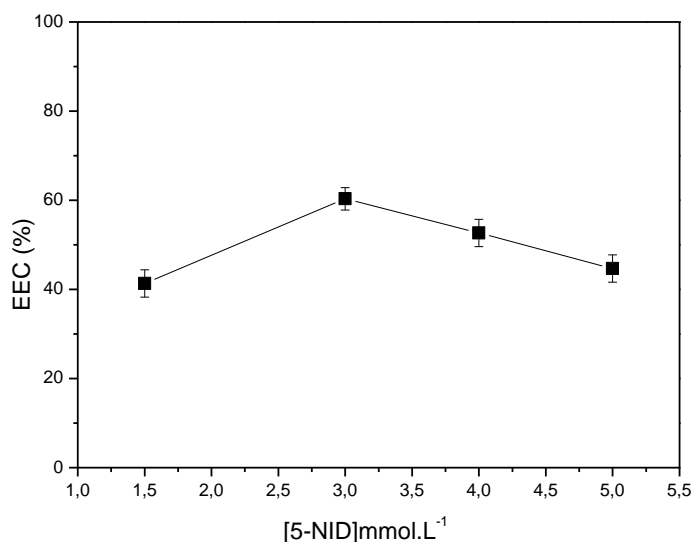


Fonte: Autor desta tese, 2016.

Ainda, dispondo de equação 1, a eficiência eletrocatalítica frente à variação na concentração de 5-nitroindol foi calculada. Neste experimento, foi utilizada a quantidade de nanotubos de carbono já otimizada para a preparação da plataforma

ECV/MWCNT/poli-at-5-NID. Nestas condições, a melhor EEC quando se avaliou a concentração de 5-NID para a ativação do eletrodo já modificado com 5,0 μL de MWCNT (1mg mL^{-1}) foi utilizando 3,0 mmol L^{-1} , como pode se averiguar a partir dos dados fornecidos no gráfico da Figura 43.

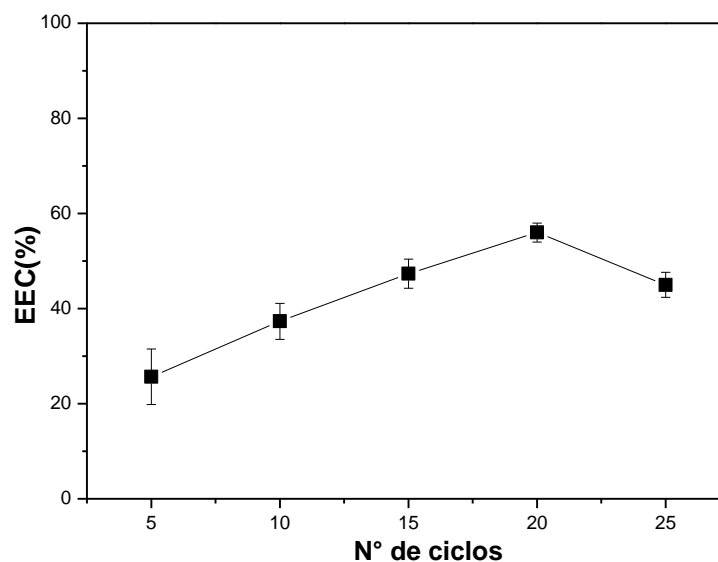
Figura 43. Eficiência eletrocatalítica (EEC) para o ECV/MWCNT/poli-at-5-NID frente ao AA, variando a concentração da 5-NID. Tampão fosfato, pH 7,0. $v = 0,005 \text{ V.s}^{-1}$.



Fonte: Autor desta tese, 2016.

Dispondo da otimização de dois parâmetros, outro fator a ser otimizado foi o número de varreduras de potencial durante a polimerização, uma vez que a espessura da camada polimérica é um fator muito importante na resposta obtida. Esta não pode ser tão espessa a ponto de dificultar o transporte de elétrons, mas deve possuir uma quantidade ótima do polímero formado, para não ocorrer a lixiviação. Nestes experimentos, obtiveram-se variações de EEC que assumiram valores inferiores a 30% quando foram realizados menos de 10 ciclos de varredura, atingindo o melhor valor de EEC quando foram realizados 20 ciclos e decaindo em 25 ciclos (Figura 44).

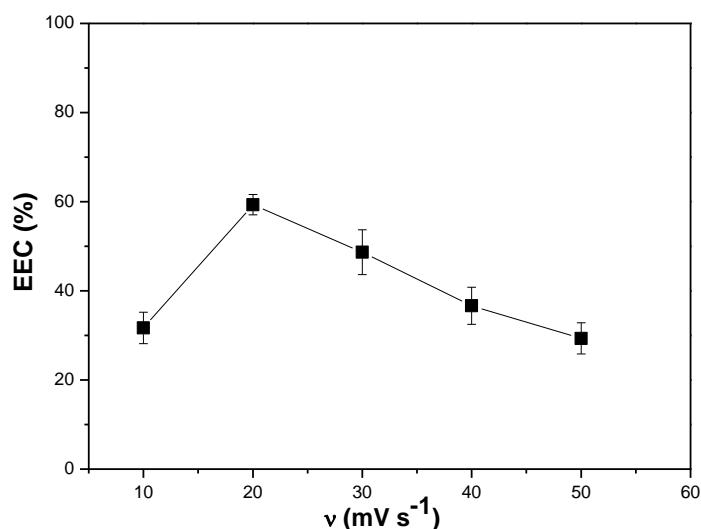
Figura 44. Eficiência eletrocatalítica (EEC) para o ECV/MWCNT/ poli-at-5-NID frente ao AA, variando o número de ciclos usado na preparação do sistema ECV/MWCNT/poli-at-5-NID. Tampão fosfato, pH 7,0, c = 3,0 mmol L⁻¹, v = 0,005 V s⁻¹.



Fonte: Autor desta tese, 2016.

Outro fator que pode influenciar na espessura da camada de polímero depositada sobre o eletrodo é a velocidade de varredura. Este parâmetro também foi otimizado, onde se pode observar que a velocidade a ser empregada situa-se entre 20 e 30 mV s⁻¹. Como a melhor resposta foi obtida, na velocidade de varredura de 20 mV s⁻¹, esta foi utilizada para realização de experimentos posteriores (Figura 45).

Figura 45. Eficiência eletrocatalítica (EEC) para o ECV/MWCNT/ poli-at-5-NID frente ao AA, variando a velocidade de varredura usada na preparação do sistema ECV/MWCNT/ poli-5-NID. Tampão fosfato, pH 7,0. ($c = 3,0 \text{ mmol.L}^{-1}$), $v = 0,005 \text{ V.s}^{-1}$.



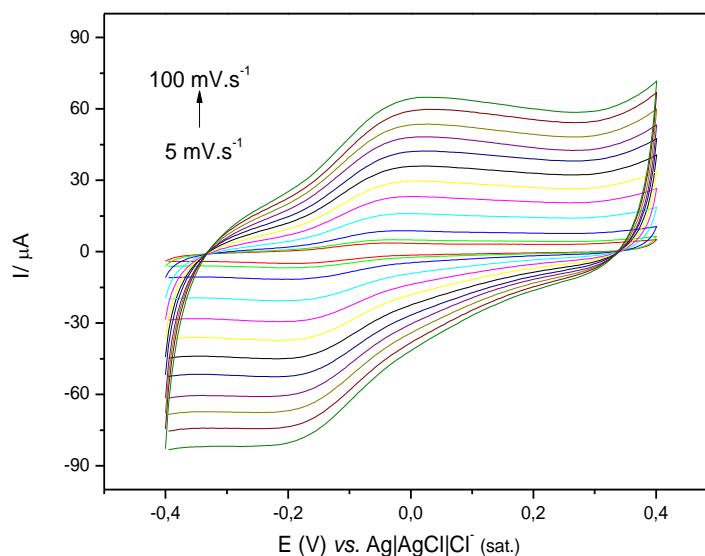
Fonte: Autor desta tese, 2016.

7.12 Características cinéticas do ECV/MWCNT/ poli-at-5-NID

O sucesso do processo eletrocatalítico frente à detecção de AA e AU depende primariamente da eficiência da transferência de elétrons entre o mediador eletrodepositado e a substância em análise na plataforma nanoestruturada.

Dessa forma, após o processo de polimerização *in situ*, a faixa de potencial do par redox foi selecionada, e com o uso da voltametria cíclica, foram estudadas as características cinéticas do ECV/MWCNT/poli-at-5-NID. Os voltamogramas cíclicos representativos obtidos para o ECV/MWCNT/poli-at-5-NID são mostrados na Figura 46, para várias velocidades de varredura de potencial ($0,005 - 0,100 \text{ V s}^{-1}$).

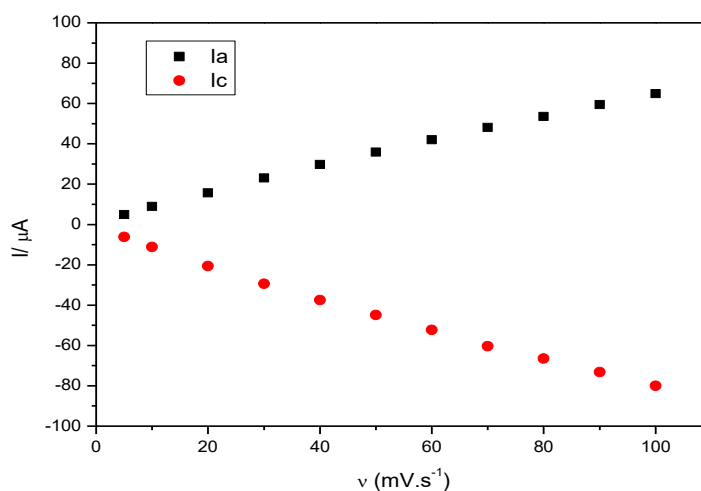
Figura 46. Voltamogramas cíclicos em ECV/MWCNT/poli-at-5-NID, tampão fosfato, pH 7,0 ($v = 0,005 - 0,100 \text{ V s}^{-1}$), $E = -0,4$ a $E = 0,4 \text{ V}$.



Fonte: Autor desta tese, 2016.

A observação dos picos voltamétricos indica que o processo redox do par ($\text{ArNHOH}/\text{ArNO}$) exibe características de espécies confinadas na plataforma nanoestruturada à base de nanotubos de carbono, o que pode ser confirmado com a correlação linear entre as correntes de pico correspondentes a I_a/I_c e a velocidade de varredura estudada (Figura 47).

Figura 47. Dependência da corrente de pico anódico (I_{pa}) e catódico (I_{pc}), em função da velocidade de varredura em solução tampão fosfato, pH 7,0 ($v = 0,005 - 0,100 \text{ V s}^{-1}$), $E = -0,4$ a $E = 0,4 \text{ V}$.

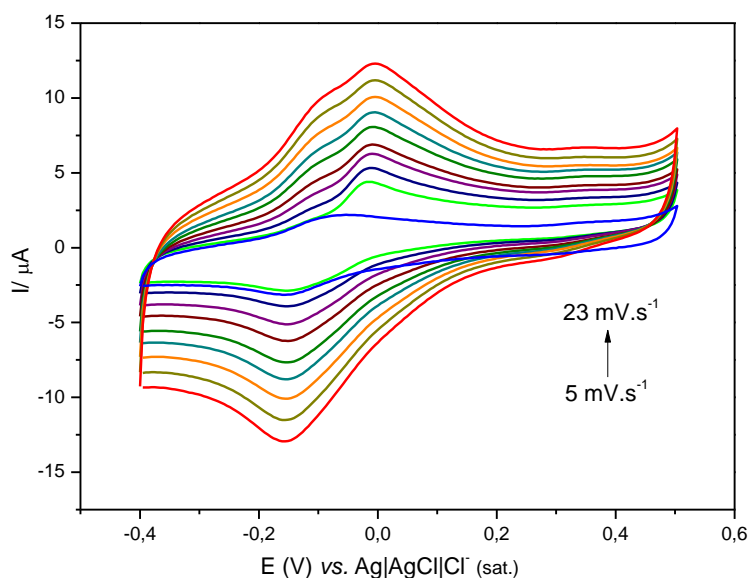


Fonte: Autor desta tese, 2016.

Alguns experimentos foram realizados com o intuito de verificar a atividade eletrocatalítica do par redox (ArNHOH/ArNO) na presença de AA.

Após a adição de AA à solução, a corrente de pico referente à oxidação de AA aumenta significativamente com o aumento da velocidade. Nesse estudo, com o aumento da velocidade de varredura ocorre também o aumento da corrente de pico referente à oxidação de AA (Figura 48).

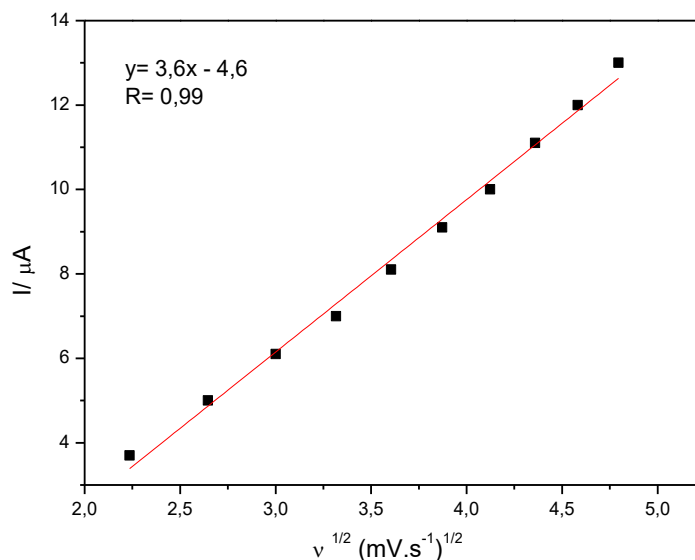
Figura 48. Voltamogramas Cíclicos em ECV/MWCNT/poli-at-5-NID, tampão fosfato, pH 7,0 ($v = 0,005 - 0,023 \text{ V s}^{-1}$), $E = -0,4$ a $E = 0,4 \text{ V}$, AA ($c = 200 \mu\text{mol L}^{-1}$).



Fonte: Autor desta tese, 2016.

Dessa forma, é possível observar que à medida que ocorre o aumento da velocidade de varredura, não há deslocamento de pico de oxidação, isso sugere que o sensor proposto não sofre limitação cinética para as velocidades estudadas. O gráfico da corrente catalítica I_{pa} versus a raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial ($v^{1/2}$) na faixa de velocidade de $0,003 - 0,023 \text{ V s}^{-1}$ foi construído e resultou em dependência linear (Figura 49).

Figura 49. Variação da corrente de pico anódica I_{pa} vs. $v^{1/2}$ no ECV/MWCNT/poli-at-5-NID, AA ($c = 200 \mu\text{mol L}^{-1}$). Medidas realizadas em solução tampão fosfato, pH 7,0. $v = 0,003 - 0,023 \text{ V s}^{-1}$.

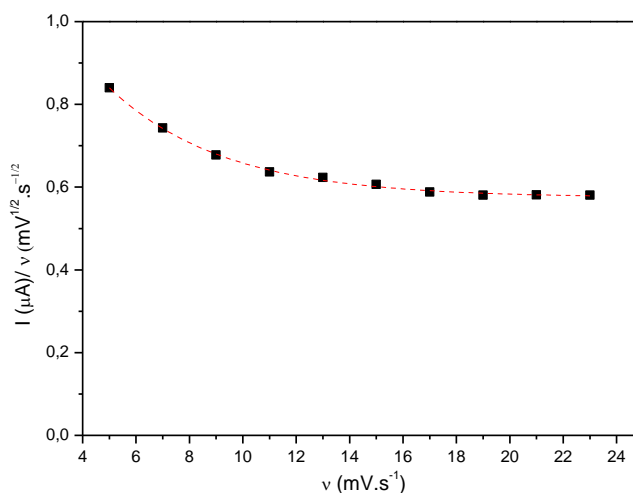


Fonte: Autor desta tese, 2016.

Portanto, a dependência linear com $v^{1/2}$ indica que o processo seja controlado por difusão, na faixa de velocidade de varredura de potencial estudada.

Para confirmar que o processo de oxidação eletrocatalítica entre o AA e o ECV/MWCNT/poli-at-5-NID apresenta uma etapa química acoplada, foram realizados alguns ensaios neste sentido, e, através do gráfico da corrente de pico normalizada com a velocidade de varredura (I_{pa}/v) versus v (Figura 50), é possível observar um perfil característico de um processo eletroquímico-químico catalítico.

Figura 50. Variação da corrente de pico anódica normalizada I_{pa}/ν vs. ν em ECV/MWCNT/ poli-at-5-NID, AA ($c = 200 \mu\text{mol L}^{-1}$). Medidas realizadas em solução tampão fosfato, pH 7,0, ν : 0,005 - 0,017 V s^{-1} .



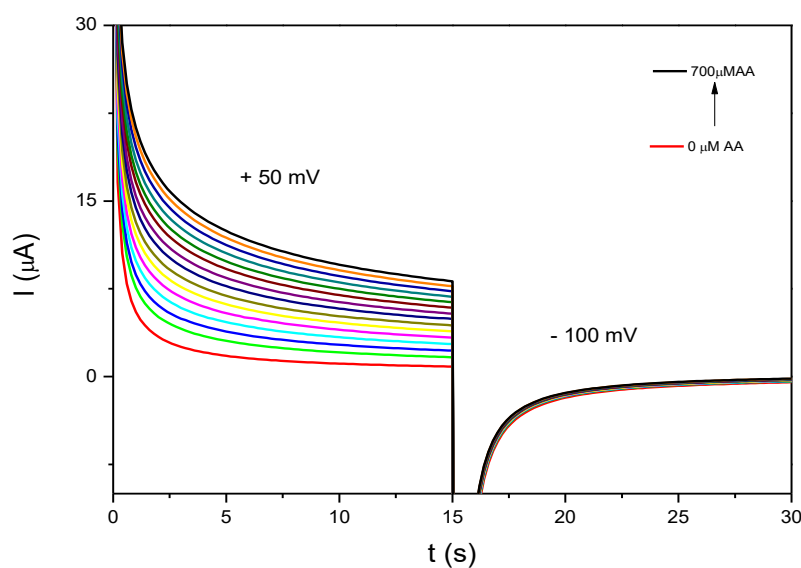
Fonte: Autor desta tese, 2016.

7.13 Estudos cronoamperométricos

Para a avaliação quantitativa do comportamento eletrocatalítico da oxidação de AA frente ao ECV/MWCNT/ poli-at-5-NID, no intuito de obter alguns parâmetros cinéticos foi empregada a cronoamperometria de duplo salto de potencial. Nesse experimento, foram feitas adições sucessivas de AA com aplicação de um potencial de oxidação ($E = +0,050 \text{ V}$) e um potencial de redução ($E = -0,100 \text{ V}$) durante 15 s em cada potencial. A Figura 51 mostra as curvas de corrente *versus* tempo, obtidos com ECV/MWCNT/poli-at-5-NID para várias concentrações de AA, em tampão fosfato pH 7,0. Como pode ser verificado, não há corrente catódica líquida correspondente à redução do mediador, na presença do analito.

Os cronoamperogramas de duplo salto de potencial direto e reverso para o mediador, na ausência de AA, mostraram-se simétricos, com um consumo de carga igual para redução e oxidação do sistema redox eletrogerado na superfície do ECV/MWCNT/poli-at-5-NID. Por outro lado, na presença de diferentes concentrações de AA, os valores da corrente anódica associada aos amperogramas diretos são significativamente maiores do que aqueles observados para o processo reverso (Figura 51).

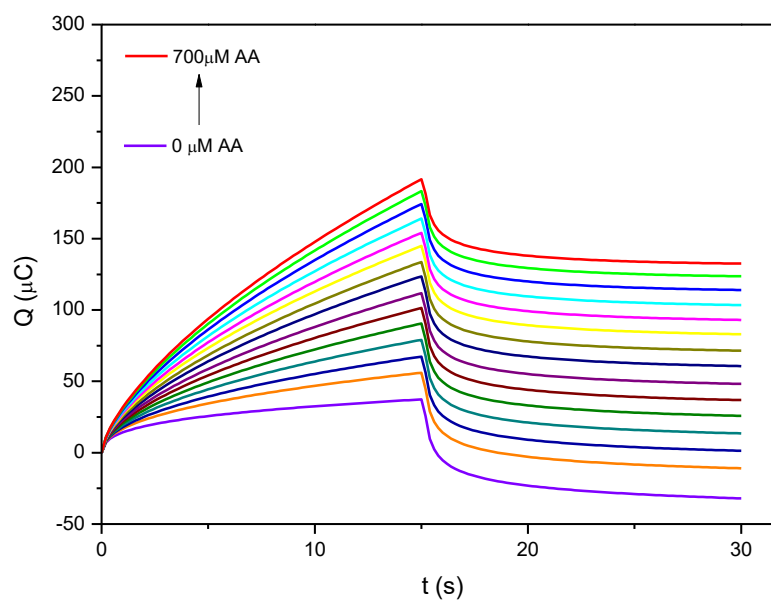
Figura 51. Cronoamperogramas obtidos no ECV/MWCNT/ poli-at-5-NID em solução tampão fosfato, pH 7,0 na ausência e presença de AA, $E_{inicial} = +0,050$ V e $E_{final} = -0,100$ V vs. Ag/AgCl/Cl⁻, respectivamente.



Fonte: Autor desta tese, 2016

A partir da integração dos cronoamperogramas, é possível visualizar melhor a carga, tanto do processo catódico, quanto do anódico. Nestes, há um aumento significativo da carga do referido processo anódico e uma diminuição no processo catódico (Figura 52).

Figura 52. Integração dos cronoamperogramas obtidos ECV/MWCNT/ poli-at-5-NID, em solução tampão fosfato, pH 7,0, $E_{inicial} = +0,050$ V e $E_{final} = -0,100$ V vs. Ag/AgCl/Cl⁻, respectivamente.



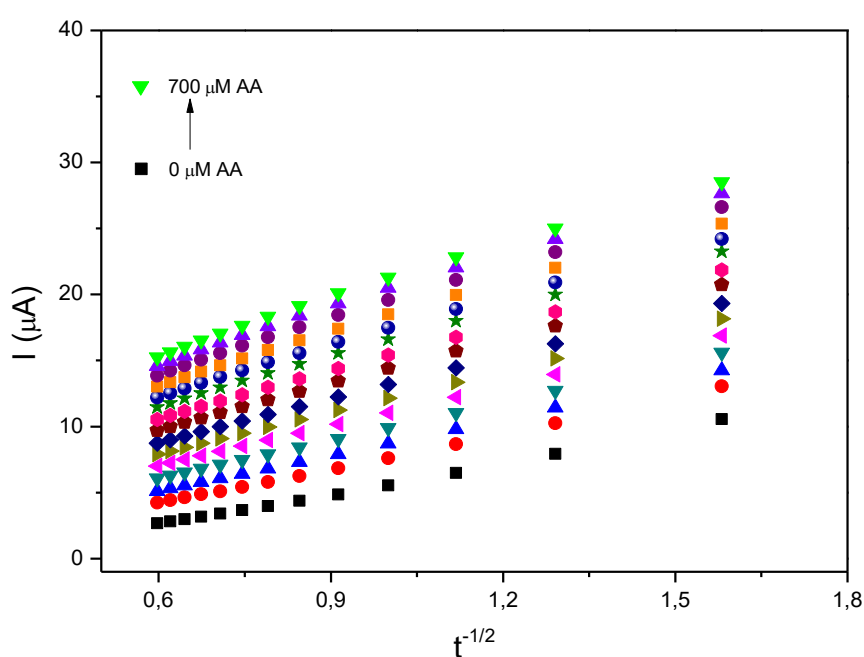
Fonte: Autor desta tese, 2016

Dessa forma, foi possível usar a cronoamperometria para determinar o coeficiente de difusão do AA em solução. Para um material eletroativo com coeficiente de difusão, D_{AA} , a corrente correspondente à reação química (por meio do controle difusional) é descrita pela Equação de Cottrell (Equação 2) (BARD e FAULKNER, 2001):

$$I = nFAD_{AA}^{1/2}C_0\pi^{-1/2}t^{-1/2} \quad (\text{Equação 2})$$

Sendo n o número de mols de elétrons, F a constante de Faraday, A área do eletrodo ($0,141 \text{ cm}^2$) obtida por meio da equação de Randles-Sevcik [SALINAS et al., 2011], nesse experimento foi utilizado o ferricianeto de potássio em diferentes velocidades de varredura, D_{AA} e C_0 o coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$) e a concentração de AA no seio da solução (mol cm^{-3}), respectivamente. A Figura 53 mostra os gráficos de I versus $t^{1/2}$ com o melhor ajuste linear, para diferentes concentrações de AA, o qual indica que a corrente observada deve ser controlada pela difusão de AA em solução.

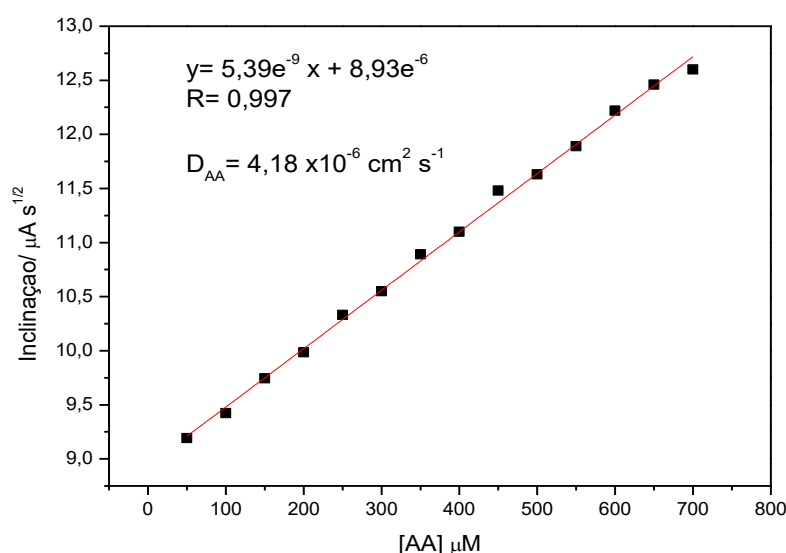
Figura 53. Gráfico de I vs. $t^{1/2}$ obtidos a partir dos cronoamperogramas da Figura 52 em ECV/MWCNT/poli-at-5-NID, tampão fosfato, pH 7,0 na ausência e presença de AA, $E_{\text{inicial}} = +0,050 \text{ V}$ e $E_{\text{final}} = -0,100 \text{ V}$ vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{Cl}^-$, respectivamente.



Fonte: Autor desta tese, 2016.

Um gráfico a partir das inclinações obtidas das linhas retas vs. a concentração de AA foi construído (Figura 54). A partir da inclinação da Figura 53 e usando a Equação de Cottrell (Equação 2), um coeficiente de difusão de $4,2 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ foi obtido para a faixa de concentração de $50 \text{ } \mu\text{M}$ a $700 \text{ } \mu\text{M}$. Este valor está próximo aos valores reportados em alguns trabalhos encontrados na literatura [LIMA, 2009; SILVA *et al.*, 2010].

Figura 54. Gráfico de inclinação ($I/t^{1/2}$) versus concentração de AA obtidos a partir da Figura 52 do ECV/MWCNT/ poli-at-5-NID, tampão fosfato, pH 7,0, na ausência e presença de AA, $E_{\text{inicial}} = +0,050 \text{ V}$ e $E_{\text{final}} = -0,100 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl, respectivamente.



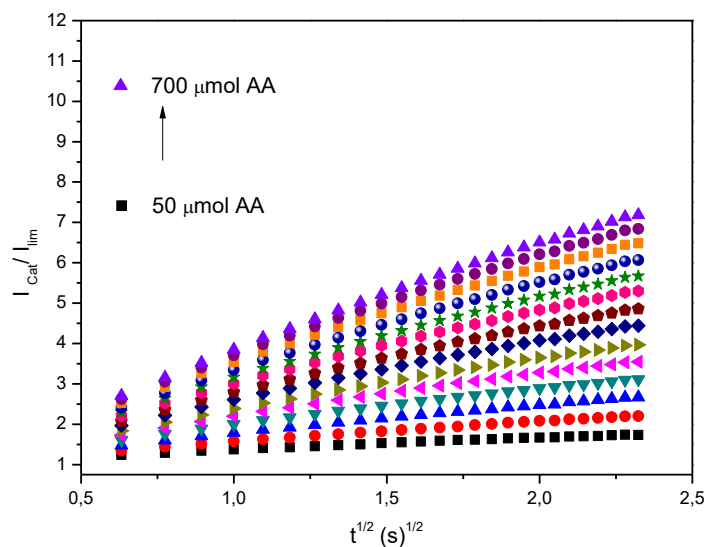
Fonte: Autor desta tese, 2016.

Desse modo, a constante de velocidade, k_{cat} , para a reação química entre o AA e os sítios redox confinados na superfície do eletrodo modificado pode ser avaliada. Este cálculo foi possível através da cronoamperometria com base no método descrito na literatura [LIMA *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2010].

$$I_{\text{cat}}/I_{\text{Lim}} = \pi^{1/2} (kCt)^{1/2} \quad (\text{Equação 3})$$

Sendo I_{Lim} a corrente do branco, C a concentração e k a constante catalítica ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$). A partir das inclinações do gráfico $I_{\text{cat}}/I_{\text{Lim}}$ vs. $t^{1/2}$ (Figura 55), foi possível obter o gráfico da Figura 56 (inclinações vs. [AA]).

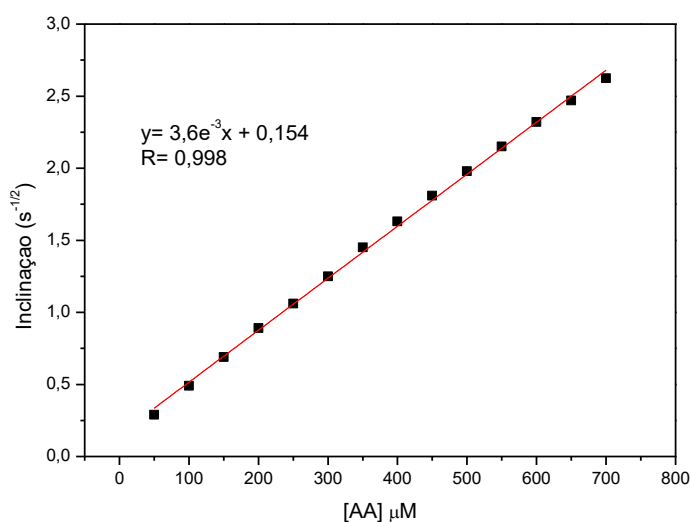
Figura 55. Dependência de I_{cat}/I_{lim} vs. $t^{1/2}$ derivado dos cronoamperogramas da Figura 51 em ECV/MWCNT/poli-at-5-NID, tampão fosfato, pH 7,0, na ausência e presença de AA, $E_{inicial} = +0,050$ V e $E_{final} = -0,100$ V vs. Ag/AgCl, respectivamente.



Fonte: Autor desta tese, 2016.

Assim, usando o novo coeficiente angular da Figura 56 e a Equação 3, obteve-se de forma simples, o valor de k_{cat} determinado como $1,1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ na faixa de concentração estudada.

Figura 56. Gráfico da inclinação de I_{cat}/I_{Lim} vs. [AA] em ECV/MWCNT/poli-at-5-NID, tampão fosfato, pH 7,0, na ausência e presença de AA, $E_{inicial} = +0,050$ V e $E_{final} = -0,100$ V vs. Ag/AgCl/Cl⁻, respectivamente.



Fonte: Autor desta tese, 2016.

A Tabela 7 mostra alguns trabalhos encontrados na literatura envolvendo eletrodos modificados com diferentes mediadores, bem como seus valores de k_{cat} para fins de comparação com o valor obtido neste trabalho. Observa-se que o valor de k_{cat} obtido foi maior quando comparado aos valores apresentados para os sistemas eletrodo-mediador desenvolvidos por ALIREZA (2007), ROCHA (2012), SHENG (2007) e RAOOF (2004), no entanto, as constantes encontradas nos trabalhos de MURTHY (1998), SILVA (2012), KARIM-NEZHAD (2009) e LIMA (2009) apresentaram valor superior ao ECV/MWNCT/poli-a-5-NID, porém na mesma ordem de grandeza, com exceção de MURTHY e colaboradores (1998).

Tabela 7. Comparação dos valores de k_{cat} para diferentes eletrodos modificados.

Eletrodo	Modificador	k_{cat} ($M^{-1}.s^{-1}$)	Referências
EGP	Benzoquinona	$3,2 \times 10^7$	MURTHY et al., 1998
PC	AC/TiO ₂ /Sb ₂ O ₅ / <i>p</i> -benzoquinona	$2,0 \times 10^4$	ROCHA et al., 2012
Pt	Polipirrol/Naftol Verde B	$4,4 \times 10^3$	ALIREZA et al., 2007
ECV	Poli-AX	$2,3 \times 10^6$	SILVA et al., 2012
PC	4-Nitroftalonitrila	$6,0 \times 10^6$	LIMA et al., 2009
ECV	Hidróxido de cobalto	$2,3 \times 10^6$	KARIM-NEZHAD et al., 2009
ECC	Hexacianoferrato de Térbio	$3,0 \times 10^3$	SHENG et al., 2007
ECV	Polipirrol/Ferrocianeto	$4,7 \times 10^3$	RAOOF et al., 2004
ECV	MWCNT/poli-at-5-NID	$1,1 \times 10^6$	Este trabalho

PC: eletrodo de pasta de carbono. ECV: eletrodo de carbono vítreo. EGP: eletrodo de grafite pirolítico. ECC: eletrodo de carbono cerâmico. AC: acetato de celulose. Poli-AX: polímero do ácido xanturênico.

Fonte: Autor desta tese, 2016.

A partir dos dados cinéticos foram feitos os experimentos por amperometria para determinar o limite de detecção e a faixa linear para AA e AU.

7.14 Detecção amperométrica de AA

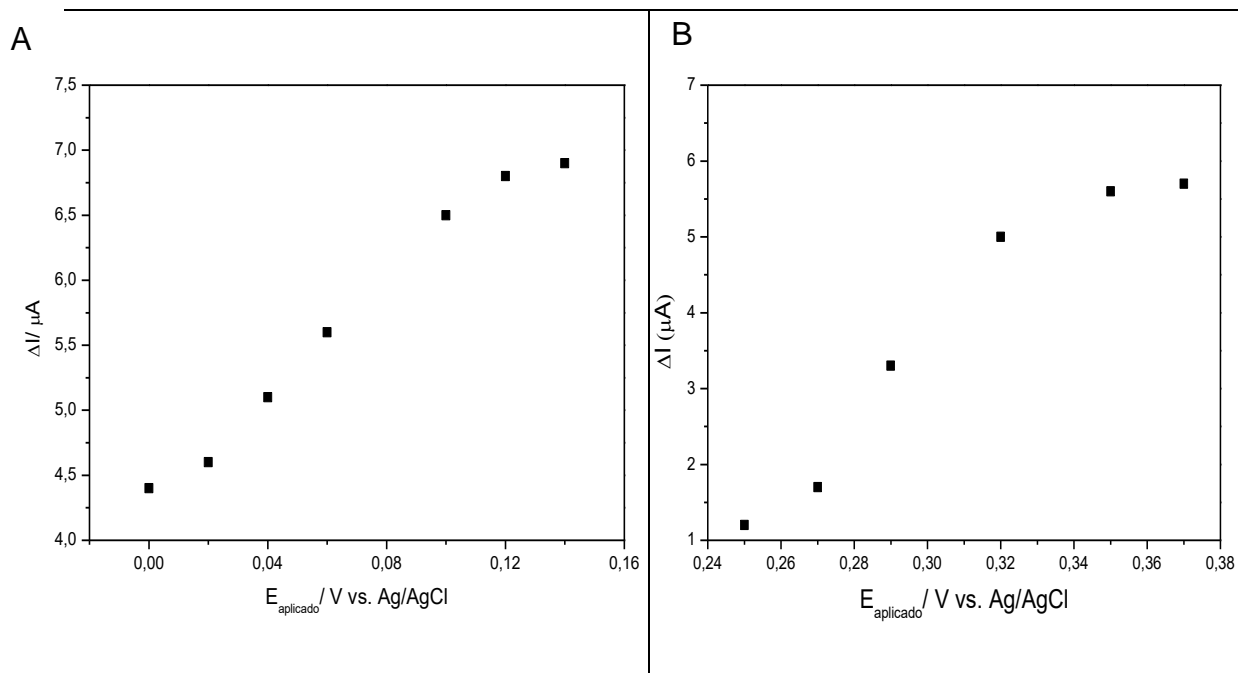
Para obter dados analíticos para o sensor desenvolvido, amperogramas para a oxidação de AA e AU foram realizados em diferentes concentrações, em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0).

Nas medidas amperométricas, um estudo inicial foi realizado com intuito de determinar o melhor potencial para aplicar no eletrodo para a oxidação de AA e AU. Assim, foram selecionados alguns potenciais a partir dos voltamogramas obtidos, os quais variaram de 0,0 V até 0,14 V para AA e 0,25 V até 0,35 V para AU.

Na Figura 57 A, observa-se um discreto aumento da corrente do processo de oxidação de AA para os potenciais entre 0,00 até +0,14 V vs. Ag/AgCl/Cl⁻. Para potenciais de oxidação maiores que +0,10 V a corrente tende a aumentar de forma menos acentuada. Portanto, o potencial aplicado de + 0,10 V foi selecionado para a oxidação de AA. Além disso, em potenciais maiores, há perda de seletividade no tocante a futuras aplicações destas plataformas nanoestruturadas.

Na Figura 57 B, observa-se um discreto aumento da corrente do processo de oxidação de AU para os potenciais entre 0,25 até 0,35 V. Em potenciais de oxidação maiores que 0,32 V, a corrente tende a aumentar de forma menos acentuada. Portanto, o potencial aplicado de +0,32 V vs. Ag/AgCl/Cl⁻ foi selecionado para a oxidação de AU.

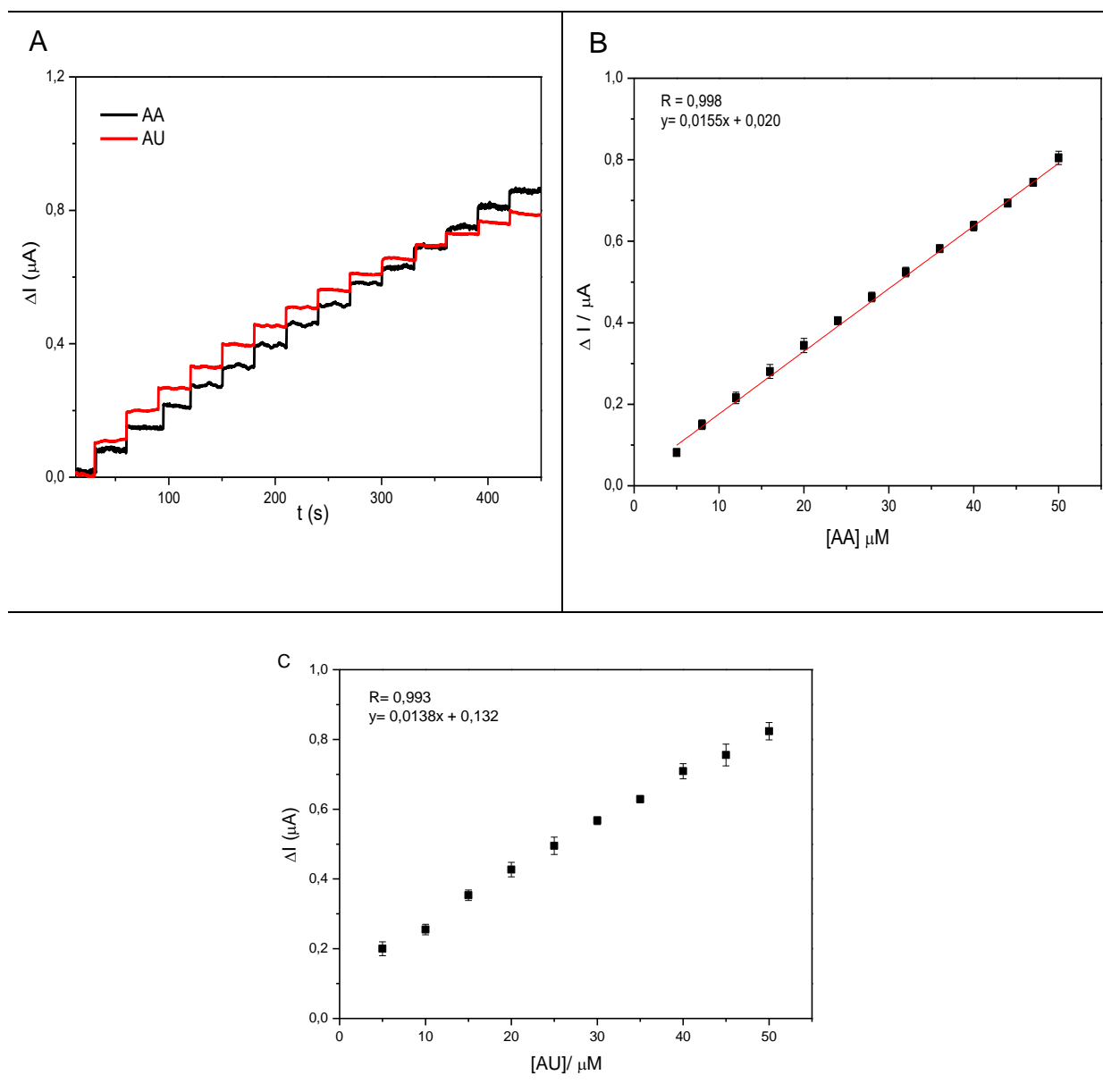
Figura 57. Corrente em função do potencial aplicado para o ECV/MWCNT/poli-at-5-NID, AA (A) e AU (B) ($c = 400 \mu\text{mol L}^{-1}$). Tampão fosfato, pH 7,0.



Fonte: Autor desta tese, 2016.

Para obter curvas analíticas para o sensor em estudo, amperogramas para a oxidação de AA e AU foram realizados em diferentes concentrações, em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) e potencial aplicado de +0,10 V (AA) e +0,32 V (AU) vs. Ag/AgCl/ Cl^- (Figura 58 A). Assim, o sensor amperométrico proposto mostrou uma faixa linear de resposta de 5 a $50 \mu\text{mol L}^{-1}$, com um coeficiente de correlação de 0,999 e 0,993 (Figuras 58 B e 58 C).

Figura 58. Cronoamperogramas (A) para a eletrooxidação de AA e AU no ECV/MWCNT/ poli-at-5-NID, curva analítica para AA (B) e AU (C), tampão fosfato, pH 7,0.



Fonte: Autor desta tese, 2016.

Os limites de detecção de $1,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ para AA e $2,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ para AU foram determinados usando uma razão $3 \sigma/b$, sendo σ 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.

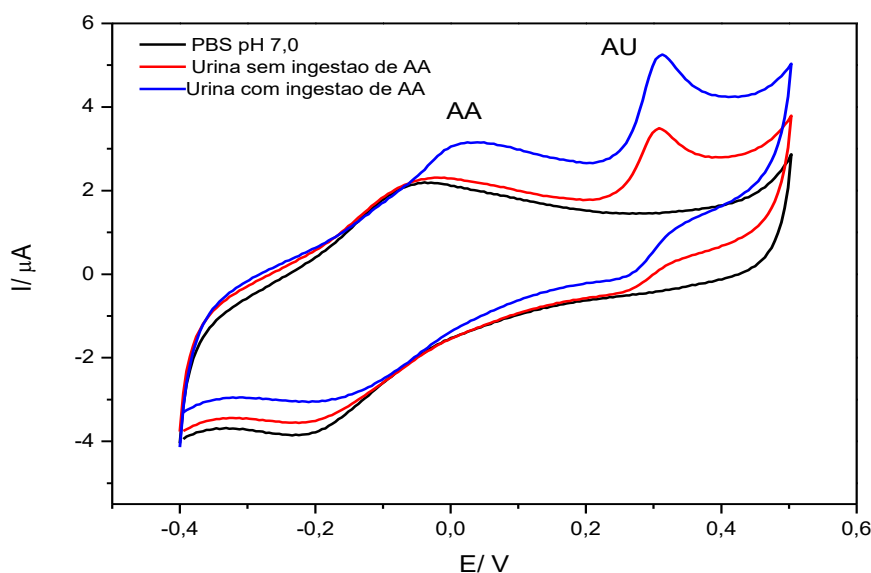
O sensor proposto obteve uma resposta rápida, considerando que o eletrodo utiliza nanotubos de carbono, onde a difusão das espécies deve ser mais dificultada. Sabe-se que uma condição para o sensor responder é que haja difusão da solução através da plataforma, sendo que esta etapa contribui no tempo de resposta. Provavelmente, o procedimento usado para construir o sensor fundamentado em MWCNT e poli-5-NID gerado *in situ* resultou num sistema bem empacotado, tornando difícil a solução difundir profundamente através da plataforma, e isso pode levar a uma resposta mais rápida, pois somente os sítios superficiais devem contribuir para a resposta [SILVA, 2011].

Diante disto, o sensor desenvolvido neste trabalho foi empregado para determinação de AA e AU em amostras de urina e sangue com o uso de técnicas eletroquímicas como voltametria cíclica e amperometria.

7.15 Análise de urina e soro para determinação de AA e AU

A Figura 59 mostra os voltamogramas cíclicos para a oxidação de AA e AU em amostra de urina. É possível observar que há um aumento da corrente referente ao AA para a amostra de urina que foi analisada 5 h após a ingestão de ácido ascórbico.

Figura 59. VC para a eletrooxidação de AU e AA no ECV/MWCNT/poli-at-5-NID obtidos na presença de urina em tampão fosfato, pH 7,0, (---) urina sem ingestão de AA, (---) urina com ingestão de AA. $\nu = 0,005 \text{ V s}^{-1}$.

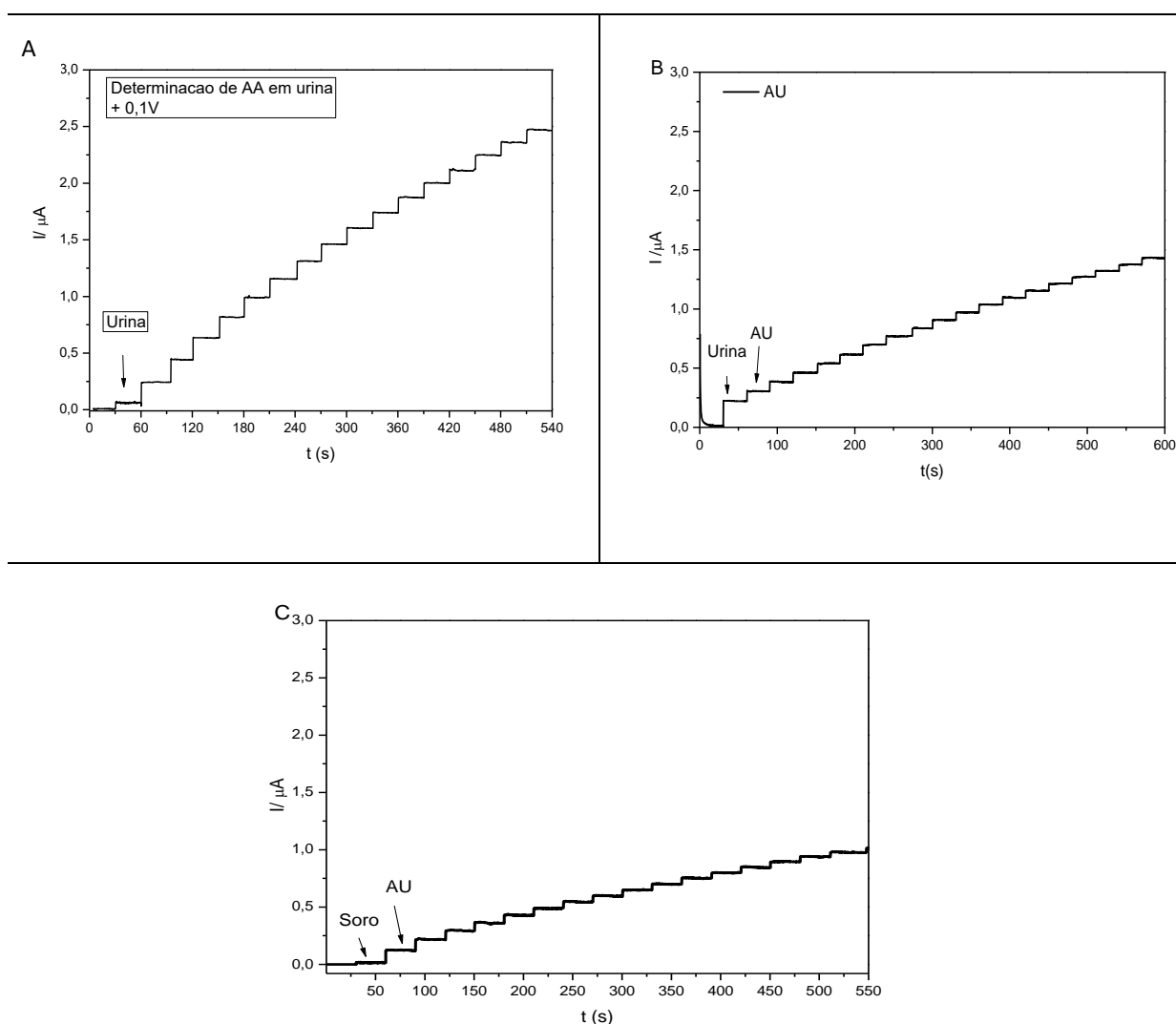


7.16 Teste de recuperação

7.16.1 Detecção amperométrica para determinação de AA e AU em amostra de soro e urina.

As amostras de urina e soro foram diluídas 25 vezes em tampão fosfato (pH 7,0) antes das análises eletroquímicas. O AA e o AU presentes nas amostras foram detectados usando o método de adição padrão (Figuras 60 A, B e C). A precisão dos resultados foi verificada pelos testes de recuperação, usando amostras em triplicata. Na solução contendo as amostras foram feitas adições do padrão de AA e AU, em seguida, foram detectados os valores totais.

Figura 60. Cronoamperogramas para a eletrooxidação de AA e AU em amostras de urina e soro no ECV/MWCNT/ poli-at-5-NID, $E_{\text{aplicado}} = + 0,10 \text{ V}$ (AA), $E_{\text{aplicado}} = + 0,32 \text{ V}$ (AU). Tampão fosfato' pH 7,0.



Na Tabela 8, observa-se que amostra de urina mostrou maior desvio, o que pode ser atribuído a uma interferência da matriz. Considerando a variedade de compostos interferentes que coexistem nas amostras de urina e soro, foi demonstrado a utilidade prática do sensor proposto, indicando que pode ser aplicado na análise em amostras biológicas.

Tabela 8. Determinação de AA e AU em amostras de urina e soro.

Analitos	Amostras	Detectado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Adicionado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Após adição ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperação (%)	R.S.D. (%)
AA	Urina	68	10,0	77,8	99,8	3,4
	Urina	341	10,0	350,6	99,9	3,5
AU	Soro	144	10,0	153,6	99,8	2,1

Fonte: Autor desta tese, 2016.

A Tabela 9 mostra alguns trabalhos encontrados na literatura para determinação de AA e AU em diferentes amostras biológicas. Os valores de concentração encontrados para AU na amostra de urina é próximo aos resultados obtidos por outros trabalhos publicados, isto indica que o sensor proposto pode ser aplicado de forma eficiente para determinação dos analitos em urina e soro.

Tabela 9. Determinação de AA e AU em diferentes amostras biológicas.

Sensor	Técnicas	AA (μM)	AU (μM)	Referências
β -CD/rGO/SPE	VPD	-	5,34 ^a	Qin et al., 2016
Nanocluster-Au	Fluorescência	-	351 ^c	Xu et al., 2015
$\text{P}_2\text{W}_{16}\text{V}_2\text{-Au/PDDA-rGO}$	VPD	-	390 ^b	Bai et al., 2016
PD-Cu(II)/GCE	VPD	-	297 ^b	Huang et al., 2014
PEDOT-nf/PGE	VPD	-	399 ^c	Ozcan et al., 2015
GLY-GQDs	VPD	2,56 ^a	-	Liu et al., 2017
ECV/ MWCNT/poli-at-5-NID	Amperometria	68 ^b	341 ^b 144 ^a	Este trabalho

Fonte: Autor desta tese, 2016.

GCE: eletrodo de carbono vítreo. PGE: eletrodo de lápis. PEDOT: poli(3,4-etilenodioxítiofeno). nf: nanofibras. β -CD: β -ciclodextrina. SPE: eletrodo impresso. rGO: óxido de grafeno reduzido. $\text{P}_2\text{W}_{16}\text{V}_2\text{-Au}$: polioxometalato dopado com nanopartículas de Au. PDDA: poli(dialildimetilamônio). GLY: glicina. GQDs: grafeno por pontos quânticos. PD: Poli-dopamina. a: soro; b: urina; c: sangue.

Na Tabela 10 temos alguns trabalhos encontrados na literatura envolvendo eletrodos modificados com diferentes mediadores para determinação de AA e AU em amostras padrão, bem como seus valores de potencial, faixa linear e limite de detecção para fins de comparação com o valor obtido neste trabalho. Observa-se que a variação de potencial encontrado neste trabalho foi maior quando comparado aos valores apresentados para os sistemas eletrodo-mediador desenvolvidos por SILVA (2012), GUPTA e GANESAN (2015), ERGÜN (2016) e LAVANYA (2015), no entanto, valores encontrados nos trabalhos de CHOUKAIRI (2015), AMIRI (2015) e ROHANI e TAHER (2015) apresentaram valor superior ao nosso sensor. Em relação ao LOD, o nosso sensor apresentou melhor resposta quando comparado com CHOUKAIRI (2015), LIU (2016) e QI (2015), além de fácil preparação e boa estabilidade.

Tabela 10. Determinação de ácido ascórbico e ácido úrico em diferentes plataformas.

Sensor	E (V)		ΔE (V)	Técnica	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		Referências
	AA	AU			AA	AU	AA	AU	
Fe₂O₃/RG nanocomposito	-	-	-	VC	570 - 3970	-	0,543	-	YU, et al., 2015
Eletrodo de carbono/L-cisteína	0,03	0,33	0,30	VOQ	50-1000	10 - 100	50	10	CHOUKAIRI, et al. 2015
CNTs-PAM/GCE	0,05	0,30	0,25	VPD	4,0 - 400	-	-	1,0	ZHANG, et al., 2015
poly-Xa/MWCNT/GCE	0,05	0,35	0,20	Amperometria	25 - 325	-	0,19	0,31	SILVA, et al., 2012
PdNPs/CM/CPE	0,08	0,30	0,22	Amperometria	3,27- 40,51	3,27- 3,89	0,53	0,66	MUKDASAI, et al., 2015
GCE/Au-MSS	0,29	0,35	0,06	Amperometria	50 - 15000	20 - 7000	1,65	2,14	GUPTA e GANESAN, 2015.
P(GBHA)/GCE	0,26	0,45	0,19	VC	1,0 - 8,0	1,0 - 100	0,3	0,09	ERGÜN, et al.2016
CF/ZnO	0,26	0,50	0,24	VPD	600 - 2000	20 - 200	170,1	6,7	LIU, et al., 2016
ZnO NRs-Au NPs/GCE	0,09	0,32	0,23	VPD	100 - 4000	10 - 400	4,699	2,375	HOU, et al., 2016
Au-nanotubes array /GCE	0,41	0,62	0,21	VPD	0,102 - 523	0,143 - 464	0,0112	0,0224	YANG, et al., 2012
GCE/tosyl-CNP	0,20	0,65	0,45	VPD	10 - 3000	0,1 - 100	10	0,02	AMIRI, et al., 2015
PG/GCE	0,03	0,38	0,35	Amperometria	9 - 2314	6 - 1330	6,45	4,82	QI et al., 2015
ITO/ERGO	-	0,27	-	VPD	-	0,30 -100	-	0,30	KHAN, et al., 2013
CM/GCE	-0,03	0,23	0,26	VC	0,195 - 4,04	0,094 - 1,90	0,39	0,15	MUKDASAI, et al., 2014
FeCMN/GCE	0,11	0,50	0,39	VPD	4,0 - 600	0,3 - 490	2,57	0,137	ROHANI e TAHER, 2015
Mn-SnO₂/GCE	0,11	0,25	0,14	VOQ	5 - 900	1 - 860	0,058	0,36	LAVANYA et al., 2015
ECV/MWCNT/poli-at-5-NID	0,10	0,32	0,22	Amperometria	5 - 50	5 - 50	1,9	2,1	Este trabalho

Fonte: Autor desta tese, 2016.

Nota: GCE: Eletrodo de carbono vítreo; MWCNT: nanotubos de carbono de paredes múltiplas; PdNPs: nanopartículas de Pd; RG: Grafeno reduzido; MSS: esfera de sílica mesoporosa; CNTs: nanotubos de carbono; poly-Xa: polímero do ácido xanturênico; P(GBHA): poli(glioxal-2-hidroxianil); PAM: poli(acrilamida); ITO: óxido de índio e estanho; CF: fibra de carbono; NRs: nanobastões; CNP: nanopartículas de carbono; ERGO: óxido de grafeno reduzido; CM: monolito de carbono; MN: Nafion modificado. Mn-SnO₂: nanopartícula de Mn dopado com SnO₂. VC: Voltametria Cíclica. VPD: Voltametria de Pulso Diferencial. VOQ: Voltametria de Onda Quadrada.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram a construção de forma eficaz de um biossensor e de um sensor eletroquímico. Por meio dos resultados obtidos ficou claro que esses dispositivos podem ser utilizados de forma eficaz em diferentes amostras biológicas. Além disso, a preparação dos dispositivos é relativamente simples, as técnicas empregadas apresentaram boa sensibilidade e os reagentes utilizados na construção do sensor são disponíveis comercialmente e de relativo baixo custo.

8 CONCLUSÃO

O estudo do comportamento eletroquímico da 3-NO₂TEE em meio aprótico foi importante para compreender as espécies eletrogeradas durante a redução do nitrocomposto. No entanto, o comportamento eletroquímico em meios prótico mostrou que o potencial de redução do grupo nitro presente na molécula é dependente do pH.

Nesse trabalho foi construído com sucesso um biossensor de dsDNA para determinação da 3-NO₂TEE, onde apresentou boa sensibilidade e o limite de detecção e quantificação encontrados foram 58 nmol L⁻¹ e 200 nmol L⁻¹.

No presente trabalho, também foi construído de forma fácil um sensor eletroquímico a base de nanotubos de carbono e poli-5-nitroindol para detecção dos ácidos ascórbico e úrico em amostras de urina e soro. O sensor desenvolvido apresentou boa sensibilidade e estabilidade. A curva analítica obtida sob condições de pH neutro, apresentou limites de detecção de 1,9 μmol L⁻¹ para AA e 2,1 μmol L⁻¹ para AU.

REFERÊNCIAS

- ABE, et al., Induction of nitrotyrosine-like immunoreactivity in the lower motor neuron of amyotrophic lateral sclerosis. **Neuroscience Letters**, 199, 152–154, 1995.
- ABREU, F.C; GOULART, M.O.F.; BRETT, A.M.O., Detection of the damage caused to DNA by niclosamide using an electrochemical DNA-biosensor, **Biosensors and Bioelectronics**, 17, p.913- 919, 2002.
- AFKHAMI, A.; BAHIRAEI, A.; MADRAKIAN, T., Gold nanoparticle/multi-walled carbon nanotube modified glassy carbon electrode as a sensitive voltammetric sensor for the determination of diclofenac sodium. **Materials Science and Engineering C**, 59, p. 168-176, 2016.
- AKBAR, S.; ANWAR, A.; KANWAL, Q., Electrochemical determination of folic acid: A short review. **Analytical Biochemistry**, 510, p. 98-105, 2016.
- AMATORE, C., *et al.*, Real-Time Amperometric Analysis of Reactive Oxygen and Nitrogen Species Released by Single Immunostimulated Macrophages, **ChemBioChem**, 9, p. 1472 -1480, 2008.
- AMIRI, M. *et al.*, Carbon nanoparticles with tosyl functional group for distinguishing voltammetric peaks of ascorbic acid and uric acid, **Materials Science and Engineering C**, 47, p.189-195, 2015.
- ANDRES, T.; ECMANN, L.; SMITH, D.K. Voltammetry of nitrobenzene with cysteine and other acids in DMSO. Implications for the biological reactivity of reduced nitroaromatics with thiols. **Electrochimica Acta**, n. 92, p. 257-268, 2013.
- AQUILANO, K., et al. Role of nitric oxide synthases in parkinson's disease: a review on the antioxidant and anti-inflammatory activity of polyphenols. **Neuro chemical Research**, 33, 2416 – 2426, 2008.
- ARANDA, P., *et al.*, Relevance of polymer– and biopolymer–clay nanocomposites in electrochemical and electroanalytical applications. **Thin Solid Films**, 495, p. 104 - 112, 2006.
- BADGUDJAR, D. M. et al. Environmentally benign synthesis of aromatic nitro compounds using silica supported inorganic nitrates. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 66, p. 250-251, 2007.
- BALASUBRAMANIAN, K.; BURGHARD, M., Chemically functionalized carbon nanotubes. **Small**, 1, n. 2, p.180-192, 2005.
- BARD, A.J.; FAULKNER, L., **Electrochemical methods- Fundamentals and Applications**, 2. ed. New York: Wiley, 2001.

BARSAN, M.M.; GHICA, M.E; BRETT, C.M.A., Electrochemical sensors and biosensors based on redox polymer/ carbon nanotube modified electrodes: A review. **Analytica Chimica Acta**, 881, p.1-23, 2015.

BI, H., *et al.*, Carbon nanotube-modified glassy carbon electrode for simultaneous determination of, dopamine, ascorbic acid e uric acid. **Sensors and Actuators B**, v. 171-172, p.1132-1140, 2012.

BLANCHARD-FILLION, B., *et al.*, Metabolism of 3-Nitrotyrosine Induces Apoptotic Death in Dopaminergic Cells, **Journal of Neuroscience**, 26, p. 6124-6130, 2006.

BOLLO, S. *et al.*, Voltammetric reduction of 4-nitroimidazole derivatives: Influence of the N-1 substitution in protic and aprotic media. **Electrochimica Acta**, n. 55, p. 4558–4566, 2010.

BOLLO, S., *et al.*, Cyclic Voltammetric studies on nitro radical anion formation from megalol and some related nitroimidazole derivates, **J. Electroanal. Chem.**, 541, p. 46-54, 2001.

BOND, A.M., 200 years of practical electroanalytical chemistry: past, present and future directions illustrated by reference to the on-line, on-stream and off-line determination of trace metals in zinc plant electrolyte by voltammetric and potentiometric techniques. **Analytica Chimica Acta**, 400, p. 333-379, 1999.

BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. **Electroquímica: Princípios, Métodos e Aplicações**. Oxford University Press, v. 5, p. 236-244. 416-418, 1996.

BRETT, A.M. Oliveira *et al* Voltammetric determination of all DNA nucleotides. **Analytical Biochemistry**, n. 332, p. 321-329, 2004.

BRILLAS, E. *et al.*, Self-protonation effects in the electrochemical reduction mechanism of p-nitrobenzoic acid. **Electrochimica Acta**, 31, p.759-766, 1986.

BUSATTI, H.G.N.O. *et al* Effects of metronidazole analogues on Giardia lamblia: experimental infection and cell organization. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, n. 75, p. 160-164, 2013.

BUTTERFIELD, D.A., *et al.*, Elevated levels of 3-nitrotyrosine in brain from subjects with amnesic mild cognitive impairment: Implications for the role of nitration in the progression of Alzheimer's disease. **Brain Research**, 1148, 243-248, 2007.

CAPAZ, R. B., CHACHAM, H. Nanotubos e a nova era do carbono. **Ciência Hoje**, v. 33, n. 198, p. 20-27, 2003.

CAVALCANTI, J.C.M. Effect of the leaving group on the electrodic reduction mechanism of anti-Helicobacter pylori metronidazole derivatives, in aprotic and protic media. **Bioelectrochemistry**, n. 63, p. 353–357, 2004.

CAVALCANTI, J.C.M. *et al.*, Evidence of self-protonation on the electrodic reduction mechanism of an anti-Helicobacter pylori metronidazole isotere. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 571, p.177-182, 2004.

CHOUKAIRI, M., *et al.*, Electrochemical detection of uric acid and ascorbic acid: Application in serum, **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 758, p.117-124, 2015.

CONVENTZ, A., *et al.*, Simultaneous determination of 3-nitrotyrosine, tyrosine, hydroxyproline and proline in exhaled breath condensate by hydrophilic interaction liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, **Journal of Chromatography B**, 860, p.78–85, 2007.

CROMHEEKE, K. M., *et al.*, Cardio vascular Research, 43,744–754, 1999.

DALLE-DONNE, *et al.*, Biomarkers of oxidative damage in human disease. **Clinical Chemistry**, 42, p.601–623, 2006.

DAMIANI, F.; TATSCH, P.J., X RAYS PHOTOELECTRON SPECTROSCOPY

De OLIVEIRA, V. K. S.; COSTA, L.; Da FONSECA, C. A. Principais aplicações da biotecnologia na medicina. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3, n.2, p.42-43, 2006.

De SOUZA, A. A., **Estudos bioeletroquímicos de nitroquinonas derivadas da *nor*- β -lapachona**. Tese (Doutorado em Química) – UFAL, Maceió, 2011.

DEDAVID, B.A., *et al.*, **Microscopia Eletrônica de Varredura: Aplicações e preparação de amostras**, EDIPUCRS, Porto Alegre, 2007.

DELATOUR, T., *et al.*, 3-Nitrotyrosine Butyl Ester: A Novel Derivative to Assess Tyrosine Nitration in Rat Plasma by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Detection, **Analytical Biochemistry**, 302, p.10-18, 2002.

DELETIOĞLU, D. *et al.*, Preparation and characterization of poly(indole-3-carboxaldehyde) film at the glassy carbon surface, **Thin Solid Films**, 519, p.784-789, 2010.

DICK, J.G., **Electroanalytical Techniques: Principles and Applications**. Chapter 8, 1997.

DICULESCU, V. C.; PAQUIM, A. M. C.; BRETT, A. M. O. Electrochemical DNA Sensors for Detection of DNA Damage. **Sensors**, n. 5, p. 377-393, 2005.

DUNCAN, M.W., A review of approaches to the analysis of 3-nitrotyrosine, **Amino Acids**, 25, p. 351-361, 2003.

ERGÜN, E., *et al.*, Simultaneous electrochemical determination of ascorbic acid and uric acid using poly(glyoxal-bis(2-hydroxyanil)) modified glassy carbon electrode, **Sensors and Actuators B**, 224, p.55-64, 2016.

FAN, S., *et al.*, A porphyrin derivative for the fabrication of highly stable and sensitive electrochemical sensor and its analytical applications, **Sensors and Actuators B**, 233, p. 206-213, 2016.

FERIN, R., *et al.*, Rapid, sensitive and simultaneous determination of ascorbic and uric acids in human plasma by ion-exclusion HPLC-UV, **Clinical Biochemistry**, 46, p.665-669, 2013.

FICHTER, F., **Organische Elektrochemie**; Steinkopff: Dresden, German, 1942.

GALLEGO, J.; LOAKES, D., Solution structure and dynamics of DNA duplexes containing the universal base analogues 5-nitroindole and 5-nitroindole 3-carboxamide, **Nucleic Acids Research**, Vol. 35, p. 2904-2912, 2007.

GASTER, R.S. *et al.*, Matrix-insensitive protein assays push the limits of biosensors in medicine. **Nature Medicine**, v 15, n. 11, Nov. 2009.

GIL, E.S.; COUTO, R.O, Flavonoid electrochemistry: a review on the electroanalytical applications. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 23, p.542-558, 2013.

GLIGOR, D. *et al.*, Poly-phenothiazine derivative-modified glassy carbon electrode for NADH electrocatalytic oxidation. **Electrochimica Acta**, 54, p.3124-3128, 2009.

GOULART, L.A.; MORAES, F. C.; MASCARO, L.H. Influence of the different carbon nanotubes on the development of electrochemical sensors for bisphenol A, **Materials Science and Engineering C**, 58, p.768-773, 2016.

GOULART, M.O.F. *et al.*, Electrochemical Study of Methyl 2-[p-Nitrophenyl(Hydroxy)-Methyl] Acrylate, an Anticancer Drug, in the Presence of GSH and dsDNA. **Journal of the Electrochemical Society**, n. 154, p. 121-129, 2007.

GUPTA, R. GANESAN, V., Gold nanoparticles impregnated mesoporous silica spheres for simultaneous and selective determination of uric acid and ascorbic acid, **Sensors and Actuators B**, 219, 139-145, 2015.

HÁJKOVÁ, A., *et al.*, A miniaturized electrode system for voltammetric determination of electrochemically reducible environmental pollutants. **Sensors and Actuators B**, 227, p.263-270, 2016.

HALLIWELL, B., What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxynitrite formation in vivo? **FEBS Letters**. 411, p.157-160, 1997.

HASANZADEH, M., *et al.*, A novel electroanalytical method for simultaneous detection of two neurotransmitter dopamine and serotonin in human serum. **Journal of Neuroscience Methods**, 219, p. 52-60, 2013.

HILLARD, E.A. *et al.*, Electrochemical parameters and techniques in drug development, with an emphasis on quinones and related compounds, **Chem. Commun**, 2612-2628, 2008.

HOU, C. *et al.*, Synthesis of ZnO nanorods-Au nanoparticles hybrids via in-situ plasma sputtering-assisted method for simultaneous electrochemical sensing of ascorbic acid and uric acid, **Journal of Alloys and Compounds**, 666, p.178-184, 2016.

IRAVANI, M.M., et al., 3-Nitrotyrosine-dependent dopaminergic neurotoxicity following direct nigral administration of a peroxyxynitrite but not a nitric oxide donor. **Brain Research**, 1067, p.256-262, 2006.

JAHANBAKHSI, M; HABIBI, B., A novel and facile synthesis of carbon quantum dots via salep hydrothermal treatment as the silver nanoparticles support: Application to electroanalytical determination of H₂O₂ in fetal bovine serum. **Biosensors and Bioelectronics**, 81, p. 143-150, 2016.

JIN, W.; WEI, H.; ZHAO, X., Adsorption-voltammetric determination of guanine, guanosine, adenine and adenosine with capillary zone electrophoresis separation. **Analytica Chimica Acta**, 347, p. 269-274, 1997.

KARALI, N., Synthesis and primary cytotoxicity evaluation of new 5-nitroindole-2,3-dione derivatives, **European Journal of Medicinal Chemistry**, 37, p.909-918, 2002.

KHAN, M.I., et al., Electrochemical determination of uric acid in the presence of ascorbic acid on electrochemically reduced graphene oxide modified electrode, **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 700, p.54-59, 2013.

KIM, B.; SIGMUND, W.M. Functionalized multiwall carbon nanotube/gold nanoparticle composites. **Langmuir**, 20, 8239-8242, 2004.

KISS, L., et al., Electropolymerized molecular imprinting on glassy carbon electrode for voltammetric detection of dopamine in biological samples. **Talanta**, 160, p.489-498, 2016.

KOKKINIDIS, G.; KELAIDOPOULOU, A. Electrochemical behaviour of nitroindoles: oxidative electropolymerization and reduction of the nitro group of polymerized and non-polymerized 4-nitro and 5-nitroindole, **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 414, p.197-208, 1996.

KOVACIC, P.; SOMANATHAN, R., Nitroaromatic compounds: Environmental toxicity, carcinogenicity, mutagenicity, therapy and mechanism. Review Article. **Journal of Applied Toxicology**, n. 34, p. 810-824, 2014.

KURZATKOWSKA, K., et al., Calix[4] arene derivatives as dopamine hosts in electrochemical sensors, **Sensors and Actuators B**, 218, p. 111-121, 2015.

LANE, R.F.; HUBBARD, A. T., Electrochemistry of chemisorbed molecules. I. Reactants connected to electrodes through olefinic substituents, *J. Phys. Chem.*, 77, p.1401-1410, 1973.

LA-SCALEA, M.A., et al., Voltammetric behavior of benzimidazole at a DNA-electrochemical biosensor, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 29, p.561-568, 2002.

LAVANYA, N., et al., Electrochemical sensor for simultaneous determination of ascorbic acid, uric acid and folic acid based on Mn-SnO₂ nanoparticles modified glassy carbon electrode, **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 770, p. 23–32, 2016.

LENIART, A., *et al.*, Voltammetric determination of the herbicide propham on glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes. **Sensors and Actuators B**, 231, p.54-63, 2016.

LIMA, P.R., *et al.*, 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, p. 87–96, 2008.

LIMA, P.R., *et al.*, Electrocatalytic activity of 4-nitrophthalonitrile-modified electrode for the l-glutathione detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 47, p. 758–764, 2008.

LIMA, P.R., *et al.*, Electrochemical investigations of the reaction mechanism and kinetics between NADH and redox-active $(\text{NC})_2\text{C}_6\text{H}_3\text{-NHOH}/(\text{NC})_2\text{C}_6\text{H}_3\text{-NO}$ from 4-nitrophthalonitrile- $(\text{NC})_2\text{C}_6\text{H}_3\text{-NO}_2$ -modified electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, 24 p.448-454, 2008.

LIU, H., *et al.*, Plasma-assisted synthesis of carbon fibers/ZnO core–shell hybrids on carbon fiber templates for detection of ascorbic acid and uric acid, **Sensors and Actuators B**, 224, p. 857-862, 2016.

LOBO, A. O., *et al.*, Caracterização de Materiais Carbonosos por Espectroscopia Raman, **Revista Brasileira de Aplicações de Vácuo**, v. 24, n. 2, p. 98-103, 2005.

LÖFMARK, S. *et al.* Metronidazole is still the drug of choice for treatment of anaerobic infections. **Clinical Infectious Diseases**, n. 50, p.S16–23, 2010.

MANDAL, P.C., Reactions of nitro anion of metronidazole in aqueous and mixed solvent: a cyclic voltammetric study, **J. Electroanal. Chem.**, 570, p. 55-61, 2004.

MARGARITELIS, N.V., *et al.* Going retro: oxidative stress biomarkers in modern redox biology, **Free Radical Biology and Medicine**, 98, p.2-12, 2016.

MASCINI M.; TOMBELLI, S. Biosensors for biomarkers in medical diagnostics. **Biomarkers**, 13, p.637-657, 2008.

MASRI, F.A., *et al.*, Abnormalities in nitric oxide and its derivatives in lung cancer. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 172, 597–605, 2005.

MERGOLA, L., *et al.*, Developments in the synthesis of a water compatible molecularly imprinted polymer as artificial receptor for detection of 3-nitro-L-tyrosine in neurological diseases, **Biosensors and Bioelectronics**, 40, p.336–341, 2013.

MIHM, J., *et al.*, Free 3-Nitrotyrosine Causes Striatal Neurodegeneration *in vivo*, **Journal of Neuroscience**, 21, 149, 2001.

MONTEMOR, M. F. **ESPECTROSCOPIA DE AUGER /XPS**, Instituto Superior Técnico, Lisboa-Portugal, 2002.

MOSES, P.R.; WIER, L.; MURRAY, R.W., Chemically modified tin oxide electrode, *Anal. Chem.*, 47, p. 1882–1886, 1975.

MUKDASAI, S., *et al.*, Comparison of electrochemical property between multiwalled carbon nanotubes and porous graphitized carbon monolith modified glassy carbon electrode for the simultaneous determination of ascorbic acid and uric acid, **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 731, p.53-59, 2014.

MUKDASAI, S., *et al.*, Electrodeposition of palladium nanoparticles on porous graphitized carbon monolith modified carbon paste electrode for simultaneous enhanced determination of ascorbic acid and uric acid, **Sensors and Actuators B**, 218, p. 280-288, 2015.

MUNTEANU, F.D., *et al.*, NADH electrooxidation using carbon paste electrodes modified with nitro-fluorenone derivatives immobilized on zirconium phosphate. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 564, p.167–178, 2004.

NAKAMURA, Y., *et al.*, Nitric Oxide in Breast Cancer: Induction of Vascular Endothelial Growth Factor-C and Correlation with Metastasis and Poor Prognosis. **Clinical Cancer Research**, 12, p.1201 – 1207, 2006.

NAPOLI, C., *et al.*, Nitric oxide and atherosclerosis: An update. **Nitric Oxide**, 15, 265–279, 2006.

NASRAOUI, R. *et al.*, Flow electroanalytical system based on cyclam-modified graphite felt electrodes for lead detection. **Journal of Electroanalytical Chemistry**. 638, p. 9-14, 2010.

NIE, G., *et al.*, Electrodeposition of poly(indole-5-carboxylic acid) in boron trifluoride diethyl etherate containing additional diethyl ether, **Electrochimica Acta**, 52, p.7097–7106, 2007.

NIKAM, S., *et al.*, Oxidative stress in parkinson's disease. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, 24 (1), 98–101, 2009.

NIKOLAEV, K, *et al.*, A novel bioelectrochemical interface based on in situ synthesis of gold nanostructures on electrode surfaces and surface activation by Meerwein's salt. A bioelectrochemical sensor for glucose determination, **Bioelectrochemistry**, 105, p. 34-43, 2015.

PACHER, P.; BECKMAN, J.S., LIAUDET, L., Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiol. Rev.** 87, p.315 - 424, 2007.

PAIVA, M. C., *et al.*, Mechanical and morphological characterization of polymer-carbon nanocomposites from functionalized carbon nanotubes, **Carbon**, v. 42, p. 2849-2854, 2004.

PALEČEK, E. *et al.*, Electrochemical biosensors for DNA hybridization and DNA damage. **Biosensors & Bioelectronics**, n. 13, p. 621–628, 1998.

PAULA, F. R. *et al.*, Aspectos Mecanísticos da Bioatividade e Toxicidade de Nitrocompostos. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1013-1020, 2009.

PAULA, F.R.; SERRANO, S.H.P.; TAVARES, L.C. Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. **Quim. Nova**, 32, p.1013-1020, 2009.

PEREIRA, A.C., *et al.*, Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas, **Quim.Nova**, vol.25, p.1012- 1021, 2002.

PHILLIPS, D.C., *et al.*, **Antioxidants and Redox Signaling**, 12,743–785, 2010.

PINTO, E.P. *et al.*, O Microscópio de Força Atômica (AFM): importante ferramenta no estudo da morfologia de superfícies na escala manométrica, **Estação Científica**. v. 3, n. 2, p. 41-50, 2013.

RADI, A. E., *et al.*, Electrochemical and Spectral studies on the Interaction of the Antiparasitic Drug Nitazoxanide with DNA, **Electrochimica Acta**, 129, p.259-265, 2014.

RADKE, S.M.; ALOCILJA, E.C. A Microfabricated Biosensor for Detecting Foodborne Bioterrorism Agents. **IEEE Sensors Journal**, v. 5, n. 4, AUGUST 2005.

RAUF, S. *et al.*, Electrochemical approach of anticancer drugs–DNA interaction. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, n. 37, p. 205–217, 2005.

ROHANI, T.; TAHER, M. A., Novel functionalized multiwalled carbon nanotube-glassy carbon electrode for simultaneous determination of ascorbic acid and uric acid, **Arabian Journal of Chemistry**, 2015.

SAĞLAM, Ö. *et al.*, Biosensing of glucose in flow injection analysis system based on glucose oxidase-quantum dot modified pencil graphite electrode. **Talanta**, 147, p.315–321, 2016.

SANTHIAGO, M, *et al.*, An amperometric sensor for l-cysteine based on nanostructured platform modified with 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB). **Sensors and Actuators B**, 146, p.213-220, 2010.

SARAJI, M; BAGHERI, A., Electropolymerization of indole and study of electrochemical behavior of the polymer in aqueous solutions. **Synthetic Metals**, 98, p.57-63, 1998.

SCHWEMMER, M., *et al.*, How urine analysis reflects oxidative stress-nitrotyrosine as a potential marker, **Clinica Chimica Acta**, 297, p.207-216, 2000.

SHENG, Z., *et al.*, Electrochemical sensor based on nitrogen doped graphene: Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid, **Biosensors and Bioelectronics**, 34, p. 125-131, 2012.

SHRIVASTAVA, A.; SHARMA, J.; SONI, V. Various electroanalytical methods for the determination of uranium in different matrices. **Bulletin of Faculty of Pharmacy**, Cairo University, 51, p.113-129, 2013.

SIERACKI, N. A. et al., Bioluminescent detection of peroxyxynitrite with a boronic acid-caged luciferin, **Free Radical Biology and Medicine**, 61, p.40-50, 2013.

SILVA, E. E. **Síntese e Aplicação de Nanotubos de Carbono em Biotecnologia**. Belo Horizonte: Departamento de Física da UFMG, 2007. 198p. (Tese, Doutorado em Física).

SILVA, F.A.S., *et al.*, Poly-xanthurenic acid modified electrodes: An amperometric sensor for the simultaneous determination of ascorbic and uric acids, **Sensors and Actuators B**, 168, p.289– 296, 2012.

SKINNER, K.A.; *et al.* Free and protein-associated nitrotyrosine formation following rat liver preservation and transplantation, **Arch. Biochem. Biophys.** 342, p.282-288, 1997.

SODUM, R.S., AKERKAR, S.A., FIALA, E. S., Determination of 3-Nitrotyrosine by High-Pressure Liquid Chromatography with a Dual-Mode Electrochemical Detector, **Analytical Biochemistry**, 280, p.278-285, 2000.

STANKOVIC´, D.M.; KALCHER, K., Amperometric quantification of the pesticide ziram at boron doped diamond electrodes using flow injection analysis. **Sensors and Actuators B**: 233, p.144-147, 2016.

STOBINSKI, L., *et al.*, “Multiwall carbon nanotubes purification and oxidation by nitric acid studied by the FTIR and electron spectroscopy methods”, **Journal of Alloys and Compounds**, 501, p. 77-84, 2010.

SZABO, C.; ISCHIROPOULOS, H.; RADI, R., Peroxyxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. **Nat. Rev. Drug Discov.** 6, p.662-680, 2007.

TALBI, et al., Theoretical study of indole polymerization, **Journal of Molecular Structure**, 434 p. 129–134, 1998.

TALBI, H., et al., In-situ spectroscopic investigations of the redox behavior of poly (indole-5-carboxylic-acid) modified electrodes in acidic aqueous solutions. **Spectrochimica Acta Part A**, 57, p. 423-433, 2001.

TALBI, H.; BILLAUD, D., Oxidative electropolymerization of 5-nitroindole, **Synthetic Metals**, 97, p. 239-244, 1998.

TAN, F.; METTERS, J.P.; BANKS, C.E., Electroanalytical applications of screen printed microelectrode arrays. **Sensors and Actuators B**, 181, p. 454- 462, 2013.

TAN, W. T., *et al.*, Electrochemical oxidation of l-cysteine mediated by a fullerene-C₆₀-modified carbon electrode. **Analytica Chimica Acta**, 491, p.181-191, 2003.

TEIXEIRA, D., *et al.*, 3-Nitrotyrosine quantification methods: Current concepts and future challenges, **Biochimie**, 125, p. 1-11, 2016.

TEMOÇIN, Z. Modification of glassy carbon electrode in basic medium by electrochemical treatment for simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid. **Sensors and Actuators B**, 176, p. 796-802, 2013.

THAPLIYAL, N., *et al.*, A categorical review on electroanalytical determination of non-narcotic over-the-counter abused antitussive drugs. **Talanta**, 142, p. 157-163, 2015.

THÉVENOT, D.R. *et al.*, Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Biosensors & Bioelectronics**, 16, p. 121-131, 2001.

TOCHER, J.H. Reductive activation of nitroheterocyclic compounds, **General Pharmacology**, n. 28, p. 485, 1997.

TOHGI, H. *et al.*, Alterations of 3-nitrotyrosine concentration in the cerebrospinal fluid during aging and in patients with Alzheimer's disease, **Neurosci. Lett.** 269, p. 52-54, 1999.

TORKASHVAND, M, GHOLIVAND, M.B., TAHERKHANI, F., Fabrication of an electrochemical sensor based on computationally designed molecularly imprinted polymer for the determination of mesalamine in real samples, **Materials Science and Engineering C**, 55, p. 209-217, 2015.

TOWNSON S.M. *et al.*, Resistance to the nitroheterocyclic drugs. **Acta Tropica**, n. 56, p. 173-174, 1994.

TROJANOWICZ, M., Recent developments in electrochemical flow detections-A review Part I. Flow analysis and capillary electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, 653, p. 36-58, 2009.

TSIKAS, D., Analytical methods for 3-nitrotyrosine quantification in biological samples: the unique role of tandem mass spectrometry, **Amino Acids**, 42, 42-45, 2012.

TSIKAS, D., *et al.*, Determination of 3-nitrotyrosine in human urine at the basal state by gas chromatography-tandem mass spectrometry and evaluation of the excretion after oral intake, **Journal of Chromatography B**, 827, p. 146-156, 2005.

TSIKAS, D.; CAIDAHL, K., Recent methodological advances in the mass spectrometric analysis of free and protein-associated 3-nitrotyrosine in human plasma, **J. Chromatogr. B**. 814, p. 1-9, 2005.

VALDEZ, C.A. *et al.*, Synthesis and Electrochemistry of 2-Ethenyl and 2-Ethanyl Derivatives of 5-Nitroimidazole and Antimicrobial Activity against *Giardia lamblia*. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, p. 4038-4053, 2009.

VULCU, A., *et al.*, Modified gold electrodes based on thiocytosine/guanine-gold nanoparticles for uric and ascorbic acid determination, **Electrochimica Acta**, 88, p. 839-846, 2013.

WANG, J. **Analytical electrochemistry**, 3rd ed, John Wiley & Sons, USA, 2006.

WANG, J. Electrochemical biosensors: Towards point-of-care cancer diagnostics. **Biosensors & Bioelectronics**, n. 21, p. 1887–1892, 2006.

WANG, Y.; BI, C., Simultaneous electrochemical determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid using poly(tyrosine)/functionalized multi-walled carbon nanotubes composite film modified electrode, **Journal of Molecular Liquids**, 117, p. 26-31, 2013.

WANG, Z.; LIU, D.; DONG, S. In situ infrared spectroelectrochemical studies on adsorption and oxidation of nucleic acids at glassy carbon electrode. **Bioelectrochemistry**, n. 53, p. 175–181, 2001.

WIECZOREK, M., *et al.*, Novel electroanalytical method based on the electrostriction phenomenon and its application to determination of Cr(VI) by the flow injection technique. **Talanta**, 2016.

WU, K, *et al.*, Development of an amperometric indole-3-acetic acid sensor based on carbon nanotubes film coated glassy carbon electrode, **Sensors and Actuators B**, 96, p.658–662, 2003.

XPS/ESCA, Campinas, SP, 2000.

XU, J. *et al.* Electrosyntheses of high quality poly (5-nitroindole) films, **Materials Letters**, 59, p. 2412 – 2417, 2005.

YANG, G. *et al.*, Direct electrodeposition of gold nanotube arrays of rough and porous wall by cyclic voltammetry and its applications of simultaneous determination of ascorbic acid and uric acid, **Materials Science and Engineering C**, 32, p.1323–1330, 2012.

YOLA, M.L.; ÖZALTIN, N., Electrochemical studies on the interaction of an antibacterial drug nitrofurantoin with DNA. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, n. 653, p. 56–60, 2011.

YU, Z., *et al.*, Hydrothermal synthesis of Fe₂O₃/graphene nanocomposite for selective determination of ascorbic acid in the presence of uric acid, **Electrochimica Acta**, 158, p.264-270, 2015.

ZAID, S. A.; SHIN, J.H., Molecularly Imprinted Polymer Electrochemical Sensors Based on Synergistic Effect of Composites Synthesized from Graphene and Other Nanosystems, **Int. J. Electrochem. Science**, 9, p. 4598 - 4616, 2014.

ZHANG, H., *et al.*, Electrochemical behavior of modified electrodes with carbon nanotubes and nanofibers: Application to the sensitive measurement of uric acid in the presence of ascorbic acid, **Measurement**, 59, p.177–183, 2015.

ZHANG, L., DAWSON, V. L., DAWSON, T. M., Role of nitric oxide in Parkinson's disease. **Pharmacology & Therapeutics**, 109, p. 33 – 41, 2006.

ZHAVNERKO, G.K. *et al.*, Interpretation of SPM images of langmuir- blodgett films based on long - chain carboxylic acids .**THIN SOLIDS FILMS**, v. 359, 98-103, 2000.

ANEXO

ANEXO A– Curriculum Vitae

Erivaldo de Oliveira Costa

Curriculum Vitae

Dados pessoais

Nome Erivaldo de Oliveira Costa
Nome em citações bibliográficas COSTA, E. O.; COSTA, ERIVALDO DE O.; DE OLIVEIRA COSTA, ERIVALDO
Sexo Masculino
Filiação Pedro Soares da Costa e Josefa de Oliveira Queiroz
Nascimento 28/05/1983 - Maceió/AL - Brasil
Endereço residencial Conj. Osman Loureiro, Nº 54, QD D8
Clima Bom - Maceio
57071-330, AL - Brasil
Telefone: 082 96665677
Endereço profissional Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Química e Biotecnologia
UFAI/IQB/Campus A. C. Simões
Tabuleiro - Maceio
57072-970, AL - Brasil
Telefone: 82 32141389
URL da home page: www.ufal.com.br
Endereço eletrônico E-mail para contato: eolcosta@gmail.com

Formação acadêmica/titulação

2012 Doutorado em Química e Biotecnologia.
Universidade Federal de Alagoas, UFAL, Maceio, Brasil
Orientador: Marília Oliveira Fonseca Goulart
Áreas do conhecimento : Eletroanalítica

2010 - 2012 Mestrado em Química e Biotecnologia.
Universidade Federal de Alagoas, UFAL, Maceio, Brasil
Título: Desenvolvimento e Caracterização de Novos Sensores Químicos., Ano de obtenção: 2012
Orientador: Phabyanno Rodrigues Lima
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
Áreas do conhecimento : Química Analítica e Ambiental

2006 - 2010 Graduação em QUÍMICA LICENCIATURA.
Universidade Federal de Alagoas, UFAL, Maceio, Brasil
Título: Estudos eletroquímicos de compostos biologicamente ativos
Orientador: Marília oliveira Fonseca Goulart
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Atuação profissional

1. Universidade Federal de Alagoas - UFAL

Vínculo institucional

- 2009 - Atual** Vínculo: Livre , Enquadramento funcional: Iniciação Científica , Carga horária: 20, Regime: Dedicção exclusiva
Outras informações:
Bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica - CNPq/UFAL/FAPEAL, no Projeto "Eletroquímica Medicinal Ambiental e Alimentar: Uso de Métodos e dispositivos na Pesquisa da Atividade Biológica e Antioxidante, na Elucidação do Mecanismo de Ação, na Análise Quantificação de Substâncias Biologicamente Ativas", sob orientação da Prof.^a Dr.^a Marília O. F. Goulart, do grupo de eletroquímica.
- 2008 - 2009** Vínculo: Livre , Enquadramento funcional: Iniciação Científica , Carga horária: 20, Regime: Dedicção exclusiva
Outras informações:
Bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica - CNPq/UFAL/FAPEAL, no Projeto "Eletroquímica Medicinal e Fármaco-Eletroquímica: Uso de Métodos e dispositivos na Pesquisa da Atividade Biológica, na Elucidação do Mecanismo de Ação, e na quantificação de Substâncias Biologicamente Ativas", sob orientação da Prof.^a Dr.^a Marília O. F. Goulart, do grupo de eletroquímica.
- 2007 - 2008** Vínculo: Livre , Enquadramento funcional: Iniciação Científica , Carga horária: 20, Regime: Dedicção exclusiva
Outras informações:
Bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica - CNPq/UFAL/FAPEAL, no Projeto de Pesquisa "Estudos Bioeletroquímicos de Quinonas e Flavonóides Biologicamente Ativos" sob a orientação da Prof.^a Dr.^a Marília O. F. Goulart, do grupo de eletroquímica.
- 2006 - 2007** Vínculo: livre , Enquadramento funcional: Iniciação Científica , Carga horária: 20, Regime: Dedicção exclusiva
Outras informações:
Bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica - CNPq/UFAL/FAPEAL no projeto de pesquisa "Pesquisa da capacidade anti-oxidante total em extratos vegetais e resíduos alimentares via diferentes métodos" sob orientação da Prof.^a Dr.^a Marília O. F. Goulart, do grupo de eletroquímica.

2. Instituto Federal de Alagoas - IFAL

Vínculo institucional

- 2012 - 2014** Vínculo: Professor substituto, Enquadramento funcional: Professor , Carga horária: 40, Regime: Integral
-

Prêmios e títulos

- 2009** Prêmio de EXCELÊNCIA ACADÊMICA, no VI CONGRESSO ACADÊMICO, UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS- UFAL
- 2008** Excelente desempenho nas atividades acadêmicas, no período de 2006 a 2008, Instituto de química e biotecnologia-IQB
- 2008** Prêmio de melhor Painei na divisão de eletroquímica e eletroanalítica na 31ª Reunião Anual da SBQ, Sociedade Brasileira de Química

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. SILVA, L. V. DA; SILVA, F. A. S.; KUBOTA, L. T.; LOPES, C. B.; LIMA, P. R.; COSTA, E. O.; PINHO JÚNIOR, W.; GOULART, M. O. F.

Amperometric sensor based on carbon nanotubes and electropolymerized vanillic acid for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, and uric acid. *Journal of Solid State Electrochemistry (Print)*. , v.x, p.x - , 2016.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.1007/s10008-016-3129-3]

2. COSTA, E. O.; MOLINA, M. T.; Fabiane; SILVA, F. A. S; COSTA, C. O.; PINHO JUNIOR, W.; VALENTIM, B.I.; AGUILERA-VENEGAS, B.; PEREZ-CRUZ, F.; GOULART, M. O. F.

Electrochemical and Spectroscopic Investigation of Bioactive Naphthoquinones. *International Journal of Electrochemical Science (Online)*. , v.7, p.6524-6538 - , 2012.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital

3. COSTA, CICERO DE O.; **COSTA, ERIVALDO DE O.**; FERREIRA, FABRÍCIA DA R.; VIANA, LUCIANA DA S.; SILVA, LEONARDO V. DA; SILVA, FRANCISCO DE A. DOS SANTOS; ABREU, FABIANE C. DE; FIGUEIREDO, ISIS M.; PINHO JR., WALDOMIRO; BENTO, EDSON DE S.; LEMOS, TELMA L. G.; PESSOA, OTÍLIA D. L.; AGUILERA-VENEGAS, BENJAMIN; NORAMBUENA, ESTER; OLEA-AZAR, CLAUDIO; GOULART, MARÍLIA O. F.

Oncocalyxone A: electrochemical, spectroscopic investigation and studies of its interaction with DNA, nucleobases and N-acetylcysteine. *Journal of the Brazilian Chemical Society (Impresso)*. , v.23, p.1174 - 1185, 2012.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital

4. DE ASSIS DOS SANTOS SILVA, FRANCISCO; LOPES, CLEYLTON BEZERRA; **DE OLIVEIRA COSTA, ERIVALDO**; LIMA, PHABYANNO RODRIGUES; KUBOTA, LAURO TATSUO; GOULART, MARÍLIA OLIVEIRA FONSECA

Poly-xanthurenic acid as an efficient mediator for the electrocatalytic oxidation of NADH. *Electrochemistry Communications*. , v.12, p.450 - 454, 2010.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital

Apresentação de trabalho e palestra

1. SILVA, LEONARDO V. DA; **COSTA, E. O.**; PINHO JÚNIOR, W.; GOULART, MARÍLIA O. F.

Amperometric Sensor based on Carbon Nanotubes and Capsaicin for Determination of Dopamine, 2015. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Português; Cidade: Uberlândia; Evento: XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica (XX SIBEE)

2. **COSTA, E. O.**; SILVA, LEONARDO V. DA; PINHO JÚNIOR, W.; GOULART, MARÍLIA O. F.

Development of an amperometric nanostructured sensor for determination of ascorbic acid and uric acid in biological samples, 2015. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Português; Cidade: Uberlândia; Evento: XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica (XX SIBEE)

3. PINHO JÚNIOR, W.; **COSTA, E. O.**; SILVA, LEONARDO V. DA; GOULART, MARÍLIA O. F.

Development of an electrochemical sensor for the detection of substances with biological relevance, 2015. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Português; Cidade: Uberlândia; Evento: XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica (XX SIBEE)

4. **COSTA, E. O.**; GOULART, MARÍLIA O. F.; LIMA, P. R.; KUBOTA, L. T

Sensor eletroquímico à base de p-nitroanilina e nanotubos de carbono para detecção electrocatalítica de NADH, 2014. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Chile/Português; Local: Chile; Cidade: La Serena; Evento: XXI Congresso da Sociedade Iberoamericana de eletroquímica; Inst.promotora/financiadora: Sociedade Iberoamericana de eletroquímica

5. PAULO, E.; **COSTA, E. O.**; GOULART, MARÍLIA O. F.; SILVA, LEONARDO V. DA; LIMA, P. R.
Desenvolvimento de sensor eletroquímico a base p-nitroanilina e nanotubos de carbono para detecção eletrocatalítica de NADH, 2013. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Português; Cidade: Águas de Lindóia/SP; Evento: 36ªSociedade Brasileira de Química

6. **COSTA, E. O.**; LIMA, P. R.; GOULART, MARÍLIA O. F.
Uso dos papéis quantitativo, qualitativo e cromatográfico no desenvolvimento de sensor para determinação do Ácido Xanturênico, 2013. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Português; Cidade: Águas de Lindóia/SP; Evento: 36ªSociedade Brasileira de Química

Bancas

Participação em banca de trabalhos de conclusão

Graduação

1. COSTA, CICERO DE O.; **COSTA, E. O.**; MELO, W. W. S.

Participação em banca de SARA DOS SANTOS NASCIMENTO. **DESENVOLVIMENTO DE INDICADORES NATURAIS A BASE DE EXTRATOS VEGETAIS RICOS EM ANTOCIANINAS E BETALAÍNAS PARA AVALIAÇÃO DO pH DE LEITE CRU**, 2015

(CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM LATICÍNIOS) Instituto Federal de Alagoas

Referências adicionais : Brasil/Português.