

UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

**DESENVOLVIMENTO DE SENSORES ELETROQUÍMICOS
BASEADOS EM NANOTUBOS DE CARBONO E
POLÍMEROS DE ÁCIDO FERÚLICO E CAPSAICINA PARA
DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE 3-NITRO-L-TIROSINA,
EPINEFRINA E DOPAMINA**

LEONARDO VIEIRA DA SILVA

Universidade Federal de Alagoas

Campus A. C. Simões
Tabuleiro do Martins
57072-970 - Maceió-AL

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

LEONARDO VIEIRA DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE SENSORES ELETROQUÍMICOS BASEADOS EM
NANOTUBOS DE CARBONO E POLÍMEROS DE ÁCIDO FERÚLICO E
CAPSAICINA PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE 3-NITRO-*L*-
TIROSINA, EPINEFRINA E DOPAMINA**

Maceió – AL

2017

LEONARDO VIEIRA DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE SENSORES ELETROQUÍMICOS BASEADOS EM
NANOTUBOS DE CARBONO E POLÍMEROS DE ÁCIDO FERÚLICO E
CAPSAICINA PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE 3-NITRO-L-
TIROSINA, EPINEFRINA E DOPAMINA**

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
2017**

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecário Responsável: Janaina Xisto de Barros Lima

S586d Silva, Leonardo Vieira da.
Desenvolvimento de sensores eletroquímicos baseados em nanotubos de carbono e polímeros de ácido ferúlico e capsaicina para detecção e quantificação de 3-nitro-*L*-tirosina, epinefrina e dopamina / Leonardo Vieira da Silva. – 2017.
142 f. : il. tabs., grafs.

Orientadora: Marília Oliveira Fonseca Goulart.
Tese (doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação Em química e Biotecnologia. Maceió, 2017.

Bibliografia: f. 124-134.
Anexos: f. 135-142.

1. Eletroquímica - Sensores. 2. Epinefrina. 3. Dopamina. 4. Capsaicina.
5. Eletroanalítica. I. Título.

CDU: 544.65



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

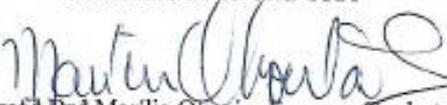


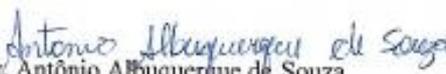
BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro das Manteigas
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1144
Email: ppgqb.ufal@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

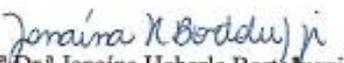
Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese do Doutorando **Leonardo Vieira da Silva** intitulada: **“Desenvolvimento de sensores eletroquímicos baseados em nanotubos de carbono e polímeros de ácido ferúlico e capsaicina para detecção e quantificação de 3-nitro-L-tirosina, epinefrina e dopamina”**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 13 de setembro de 2017, às 09:30 h, na Sala de Reuniões do IQB/UFAL.

COMISSÃO JULGADORA


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


Prof. Dr. Antônio Albuquerque de Souza
(IFAL Campus Maceió)


Prof.^a Dr.^a Carmen Lúcia de Paiva Zanta
(PPGQB/IQB/UFAL)


Prof.^a Dr.^a Janaína Heberle Bortoluzzi
(PPGQB/IQB/UFAL)


Prof.^a Dr.^a Madalena Carneiro de Cunha Arcias
(UFPE)

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por ter possibilitado a oportunidade de crescimento pessoal e profissional através de diversas experiências que moldaram minha personalidade e caráter.

Agradecimento especial à minha família, aos meus pais **Iracema** e **Manoel** por não terem desistido em buscar boas escolas e pela atenção dedicada em todos os trabalhos escolares diante da minha dificuldade de aprendizagem, além de todo amor e carinho dedicados a todos os filhos. Aos meus irmãos **Luiz Eduardo**, **Luiz Gustavo** e **Larisse** pelo enorme laço de amizade e carinho que temos uns pelos outros, além das palavras de conforto diante das adversidades.

À minha esposa **Rita de Cássia**, pela enorme afetividade traduzida em amor, carinho, paciência nesse período de pós-graduação e por sempre estar disposta a ajudar.

À minha orientadora, **Profa. Dra. Marília O. F. Goulart** pela possibilidade de realizar pesquisa com uma das grandes pesquisadoras deste país, acreditando em meu potencial e formando um profissional ético e de enorme responsabilidade como pesquisador e/ou docente.

Aos meus amigos com os quais pude conviver nesse período de pós-graduação no laboratório de eletroquímica: **Erivaldo**, **Waldomiro**, **Nicholas**, **Adilson**, **Juliana**, **Orlando**, **Fabiana Moura**, **Fabiana Santos**, **Jéssica**, **Maryana**, **Andréa**, **Erivaldo**, **Jadriane**, **Fred**, **Thaíssa**, **Fabírcia**, **Francisco**, **Angladis**, **Mônika**, **Anny**, **Andresa**, **Wanessa**, **Camila** e **Cleylton** por estarem sempre contagiando o laboratório e as viagens aos congressos de forma positiva e por ter aprendido enormemente com todos, tanto em termos técnicos quanto pessoais.

Aos **professores do Instituto de Química e Biotecnologia**, em especial à **Profa Tania Piatti** e ao **Prof. Reinaldo Rodrigues**, por terem possibilitado a minha inserção no mundo científico e pela paciência dedicada em meu início de graduação. Sem seus conselhos, essa conquista seria bem dificultada.

Aos **professores do Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia**, em especial à **Profa. Fabiane Caxico** e **Prof. Phabyanno Lima** pelo entusiasmo e discussões nesse período acerca do trabalho e novas idéias. Vale ressaltar as análises de microscopia eletrônica de varredura nos eletrodos modificados e as “discussões eletroquímicas” com o **Prof. Phabyanno Lima** no **Instituto Federal de Alagoas- Campus Maceió**, ao qual tenho um enorme carinho e respeito.

Aos meus amigos, colegas e alunos do **IFAL- Campus Palmeira dos Índios** pelo crescimento pessoal e profissional nesse período como docente, além do apoio de todos para a finalização do doutorado.

Ao Prof. **Dr. Lauro Tatsuo Kubota**, pelas discussões que contribuíram para a elaboração dos artigos.

Ao CNPq, FAPEAL, CAPES e ao INCT-Bioanalítica, pelo apoio financeiro e bolsas.

A todos, meus sinceros agradecimentos pela oportunidade de ter aprendido e convivido com vocês.

“Na vida, não existe nada a se temer, apenas a ser compreendido.”

(Marie Curie)

RESUMO

Essa tese apresenta o desenvolvimento de diferentes sensores eletroquímicos baseados em nanotubos de carbono (NTC) para detecção e determinação de analitos de relevância biológica, com avaliação dos parâmetros analíticos e cinéticos. O trabalho encontra-se dividido em três partes. Na primeira parte, descreve-se o estudo eletroquímico, em meio prótico, da 3-nitro-*L*-tirosina (3-NT), com a utilização das técnicas de voltametria cíclica e de pulso diferencial. Mostra-se, também, o desenvolvimento de um sensor baseado em NTC para a determinação e a quantificação da 3-NT, com obtenção de faixa linear de 10 – 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e limite de detecção de 0,42 $\mu\text{mol L}^{-1}$ na faixa catódica. Na faixa anódica, foi obtida uma faixa linear de 10 – 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e limite de detecção de 1,83 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Na segunda parte foi desenvolvido um sensor baseado em NTC com polímero eletrogerado de ácido ferúlico (AF), gerado *in situ* para determinar dopamina (DA). As técnicas empregadas para a realização deste trabalho foram voltametria cíclica e cronoamperometria, as quais foram utilizadas para avaliar parâmetros cinéticos e analíticos. Através de cronoamperometria e com o emprego da equação de Cottrell, os valores de coeficiente de difusão (D_{DA}) e de constante catalítica (k_{cat}), determinados para DA, foram de $2,48 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ e $1,15 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectivamente. O sensor amperométrico permitiu obter os seguintes valores relativos à determinação de DA: faixa linear de 5-120 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e limite de detecção de 2,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Na terceira parte, é descrito o desenvolvimento de uma plataforma nanoestruturada baseada em nanotubos de carbono e polímero eletrogerado por oxidação de capsaicina (CAP) para determinação de dopamina (DA) e epinefrina (EP). Assim, por meio de estudos cronoamperométricos e equações de Cottrell, foi possível obter os valores em relação a DA: D_{DA} de $6,97 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ e k_{cat} de $3,12 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, e em relação a EP, os valores obtidos foram $4,00 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ e $2,41 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para o D_{EP} e k_{cat} , respectivamente. O sensor amperométrico apresentou, em relação às determinações em separado de DA e EP, os seguintes valores: para DA, faixa linear de 5-115 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e limite de detecção de 1,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$; para EP, faixa linear de 50-1150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e limite de detecção de 7,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Diante dos resultados obtidos nesse trabalho, os sensores desenvolvidos justificam as suas utilizações para determinação e quantificação de 3-nitro-*L*-tirosina, dopamina e epinefrina.

Palavras – chave: Eletroquímica – sensores, epinefrina, dopamina, capsaicina, eletroanalítica.

ABSTRACT

This thesis reports the development of different electrochemical sensors based on carbon nanotubes (CNT) for the detection and determination of analytes of biological relevance, with evaluation of the analytical and kinetic parameters. The work is divided into three parts. In the first part, the electrochemical study of 3-nitro-*L*-tyrosine (3-NT) in protic medium is described, using the techniques of cyclic voltammetry and differential pulse. The development of a sensor based on CNT for the determination and quantification of 3-NT, is also shown, with a linear range of 10 - 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and a detection limit of 0.42 $\mu\text{mol L}^{-1}$ in the cathodic range. In the anodic range, a linear range of 10 - 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and a detection limit of 1.83 $\mu\text{mol L}^{-1}$ were obtained. In the second part, a sensor was developed based on CNT with electrochemically generated ferulic acid (FA) polymer, generated *in situ* to determine dopamine (DA). The techniques used to perform this work were cyclic voltammetry and chronoamperometry, which were used to evaluate kinetic and analytical parameters. Through chronoamperometry and the use of the Cottrell equation, the diffusion coefficient (D_{DA}) and catalytic constant (k_{cat}) values determined for DA were $2.48 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ and $1.15 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectively. The amperometric sensor has the following values for the determination of DA: linear range of 5-120 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and limit of detection of 2.2 $\mu\text{mol L}^{-1}$. The third part describes the development of a nanostructured platform based on CNT and electrochemically oxidized capsaicin (CAP) for the determination of dopamine (DA) and epinephrine (EP). Thus, by means of chronoamperometric studies and Cottrell's equations, it was possible to obtain the values in relation to DA: D_{DA} of $6.97 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ and k_{cat} of $3.12 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, and in relation to EP, the values obtained were $4.00 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ and $2.41 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for D_{EP} and k_{cat} , respectively. The amperometric sensor presented the following values in relation to the separate determinations of DA and EP: for DA, linear range of 5-115 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and detection limit of 1.8 $\mu\text{mol L}^{-1}$; for EP, a linear range of 50-1150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and a detection limit of 7.2 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Considering the results obtained in this work, the developed sensors justify their use for determination and quantification of 3-nitro-*L*-tyrosine, dopamine and epinephrine.

Keywords: Electrochemistry, dopamine, epinephrine, capsaicin, electroanalysis.

Lista de Figuras

Figura 1. Modelo esquemático dos principais componentes de um sensor eletroquímico.....	23
Figura 2. Usos e principais características dos sensores químicos, incluindo parâmetros analíticos, para a validação do processo.	24
Figura 3. Esquema que mostra algumas das abordagens para a modificação química de eletrodos.....	27
Figura 4. Comparação entre os processos de oxidação: (A) Direta e (B) indireta ou mediada e mecanismos de reação redox. (Red) e (Oxi) representam o analito em seus estados reduzidos e oxidados, respectivamente. M _R e M _O representam o mediador nos estados reduzidos e oxidados, ambos confinados na superfície do eletrodo.	29
Figura 5. Representação de (A) SWCNT e (B) MWCNT.....	32
Figura 6. Nanotubo de carbono funcionalizado após tratamento ácido.....	34
Figura 7. Modificação química de NTCs: (a) interações π-π; (b) interações não covalentes; (c) interações covalentes.	35
Figura 8. Rotas para polimerização de fenóis	37
Figura 9. Estruturas de compostos fenólicos utilizados como mediadores redox, após eletropolimerização.	39
Figura 10. Estrutura da capsaicina.....	51
Figura 11. Estrutura do ácido ferúlico.....	52
Figura 12. Biossíntese de catecolaminas	54
Figura 13. Geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) durante a cadeia respiratória mitocondrial e seus efeitos em condições normais e patológicas.	57

Figura 14. Relevância clínica de biomarcadores de estresse oxidativo. Os biomarcadores de proteína (verde), lipídeos (azul) e de DNA (vermelho) foram analisados em várias doenças listadas no topo.	59
Figura 15. Mecanismo de formação da 3-nitro- <i>L</i> -Tirosina.....	60
Figura 16. Equações relativas à dissociação de 3-NT e respectivos valores de pKa1, pKa2 e pKa3.....	70
Figura 17. VC de 3-NT ($c = 200 \mu\text{mol L}^{-1}$), em tampão acetato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,5, tampão fosfato pH 7,4 e 10,0, ECV, $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. (A) Faixa de potencial + 0,70 V a -1,2 V; (B) Faixa de potencial + 1,25 V a -1,2 V.	71
Figura 18. VC de 3-NT ($c = 200 \mu\text{mol L}^{-1}$), em tampão acetato, pH 4,5, tampão fosfato pH 7,4 e 10,0, $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$, ECV.	72
Figura 19. VPD de 3-NT ($c = 200 \mu\text{mol L}^{-1}$), em tampão acetato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5, tampão fosfato pH 7,4 e 10,0, $v = 0,005 \text{ V s}^{-1}$, ECV.....	73
Figura 20. Racionalização mecanística da redução eletroquímica da 3-NT em pH 7,4.	74
Figura 21. VPD de 3-NT ($c = 200 \mu\text{mol L}^{-1}$), (A) tampão acetato pH 4,5; (B) tampão fosfato pH 7,4 e (C) 10,0, ECV, $v = 0,005 \text{ V s}^{-1}$	75
Figura 22. VPD para avaliação de diferentes plataformas na determinação de $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ 3-NT em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ tampão fosfato pH 7,4, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$	77
Figura 23. VPD relacionados à avaliação do efeito da adição de O_2 em solução de 3-NT, em tampão fosfato, pH 7,4, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$	78
Figura 24. (A) Voltametrias de pulso diferencial relacionadas à redução do grupo nitro, em diferentes concentrações de 3-NT, em ECV/MWCNT, tampão fosfato pH 7,4, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$; (B) Curva analítica para determinação de 3-NT na redução.	79
Figura 25. (A) Voltametrias de Pulso diferencial relacionados à oxidação para diferentes concentrações de 3-NT em ECV/MWCNT, tampão fosfato pH 7,4, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$; (B) Curva analítica para determinação de 3-NT na redução.	80

Figura 26. Voltamogramas Cíclicos sucessivos de AF em ECV/MWCNT. Condições Experimentais: AF 0,4 mmol L ⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH 4,5 e $\nu = 0,02 \text{ V s}^{-1}$, 10 ciclos; Inset: Voltamograma Cíclico de ECV/MWCNT/polí-AF em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,0 e $\nu = 0.005 \text{ V s}^{-1}$	83
Figura 27- Micrografias de MEV de ECV/MWCNT (A), ECV/MWCNT/polí-AF com diferentes aproximações (B, C).....	84
Figura 28. Voltamogramas cíclicos para o ECV/MWCNT/polí-AF, na ausência e presença de dopamina. $\nu = 0,005 \text{ V s}^{-1}$, em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,0.	85
Figura 29. Voltamogramas Cíclicos de ECV/MWCNT/polí-AF em várias velocidades de varredura em solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,0 na presença de 0,5 mmol L ⁻¹ DA.	86
Figura 30- Variação da corrente de pico anódica I_{pa} vs. $\nu^{1/2}$ no ECV/MWCNT/polí-AF, em solução contendo 0,5 mmol L ⁻¹ de DA. Medidas realizadas em solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,0 e ν : 0,003-0,025 V s ⁻¹	87
Figura 31. Variação da corrente de pico anódica normalizada I_{pa}/ν vs. ν no ECV/MWCNT/polí-AF em solução contendo 0,5 mmol L ⁻¹ de DA. Medidas realizadas em solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,0 e ν : 0,003-0,023 V s ⁻¹	88
Figura 32- Modelo simplificado do mecanismo proposto para o processo de eletrocatalise de DA sobre a plataforma ECV/MWCNT/polí-AF.	89
Figura 33. (A) Cronoamperogramas de ECV/MWCNT/polí-AF em tampão fosfato 0.1 mol L ⁻¹ pH 7.0 na ausência e presença de várias concentrações de DA, $E_{inicial} = + 0,20 \text{ V}$ e $E_{final} = -0.05 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl; (B) Integração dos cronoamperogramas; (C) Gráfico de I vs. $t^{1/2}$; (D) Gráfico de I_{cat}/I_{lim} vs. $t^{1/2}$	91
Figura 34. (A) Voltamogramas com eletrodo de disco rotatório para oxidação de DA em várias velocidade de rotação em ECV/MWCNT/polí-AF, tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,0, $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$ e $[DA] = 500 \mu\text{mol L}^{-1}$. (B) Gráfico de Levich para oxidação catalítica de DA no eletrodo modificado em várias concentrações. (C) Gráfico de Koutecky-Levich derivado de (B).....	93
Figura 35. (A) Medidas cronoamperométricas para a eletrooxidação de DA no ECV/MWCNT/polí-AF obtidas em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ em pH 7,0, $E_{aplicado} = +0,200 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl; (B) Curva analítica para a eletrooxidação de DA no ECV/MWCNT/polí-AF, em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , em pH 7,0.	94

Figura 36. Resposta amperométrica de ECV/MWCNT/poli-AF, em adições de (1) NADH (750 $\mu\text{mol L}^{-1}$), (2) EP (170 $\mu\text{mol L}^{-1}$), (3) DA (250 $\mu\text{mol L}^{-1}$), (4) SER (210 $\mu\text{mol L}^{-1}$), (5) AA (210 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e (6) AU (210 $\mu\text{mol L}^{-1}$), em tampão fosfato pH 7.0, potencial aplicado de +0.2 V.....	95
Figura 37. Voltamogramas Cíclicos na faixa de -0,5 a +1,0 V vs. Ag/AgCl para a polimerização e ativação do ECV/MWCNT com capsaïcina a 0,8 mmol L^{-1} , em solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} , pH 5,5 e $\nu = 0,05 \text{ V s}^{-1}$; Insert: Voltamograma Cíclico de ECV/MWCNT/poli-CAP em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} , pH 7.0 e $\nu = 0.005 \text{ V s}^{-1}$	97
Figura 38- Mecanismo apresentando a formação dos produtos gerados através da oxidação de CAP.....	99
Figura 39- Micrografias de MEV de ECV/MWCNT (A), ECV/MWCNT/poli-CAP (B)	100
Figura 40. Formas protonada e desprotonada para capsaïcina e respectivo valor de pKa.....	101
Figura 41. Voltamogramas Cíclicos para a polimerização e ativação do ECV/MWCNT com capsaïcina a 0,8 mmol L^{-1} , em solução tampão fosfato 0,1 M, $\nu = 0,050 \text{ V s}^{-1}$ em pH (A) 2,0; (B) 7,0;(C) 10,0.	102
Figura 42 Voltamogramas cíclicos para o ECV/MWCNT/poli-CAP na ausência e na presença de dopamina (A) e epinefrina (B). $\nu = 0,005 \text{ V s}^{-1}$, em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} , pH 7,0.....	103
Figura 43. Voltamogramas Cíclicos de ECV/MWCNT/poli-CAP em várias velocidades de varredura em solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} , pH 7,0 na presença de 0,2 mmol L^{-1} de DA (A) e EP (B).....	104
Figura 44- Variação da corrente de pico anódica I_{pa} vs. $\nu^{1/2}$ no ECV/MWCNT/poli-CAP, em solução contendo 0,2 mmol L^{-1} de DA (A) e EP (B). Medidas realizadas em solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} , pH 7,0 e ν : 0,003-0,015 V s^{-1}	105
Figura 45. Variação da corrente de pico anódica normalizada I_{pa}/ν vs. ν no ECV/MWCNT/poli-CAP em solução contendo 0,2 mmol L^{-1} de DA (A) e EP (B). Medidas realizadas em solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} , pH 7,0 e ν : 0,003-0,015 V s^{-1}	106
Figura 46- Modelo simplificado do mecanismo proposto para o processo de eletrocatalise de DA e EP sobre a plataforma ECV/MWCNT/poli-CAP.....	107

Figura 47. (A) Cronoamperogramas de ECV/MWCNT/poli-CAP em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7.0 na ausência e presença de várias concentrações de DA, E_{inicial}= + 0,20 V e E_{final}= - 0.100 V vs. Ag/AgCl; (B) Integração dos cronoamperogramas; (C) Gráficos de *I* vs. *t*^{1/2}; (D) Gráficos de *I*_{cat}/*I*_{Lim} vs. *t*^{1/2}. 109

Figura 48. (A) Cronoamperogramas de ECV/MWCNT/poli-CAP em tampão fosfato 0.1 mol L⁻¹ pH 7.0, na ausência e presença de várias concentrações de EP, E_{inicial}= + 0,20 V e E_{final}= - 0.100 V vs. Ag/AgCl; (B) Integração dos cronoamperogramas; (C) Gráfico de *I* vs. *t*^{1/2}; (D) Gráfico *I*_{cat}/*I*_{Lim} vs. *t*^{1/2}. 110

Figura 49-(A) Voltamogramas com eletrodo de disco rotatório para oxidação de DA em várias velocidade de rotação em ECV/MWCNT/poli-CAP, tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7.0, *v*= 5 mV s⁻¹ e [DA] = 500 μmol L⁻¹. (B) Gráfico de Levich para oxidação catalítica de DA no eletrodo modificado em várias concentrações. (C) Gráfico de Koutecky-Levich derivado de (B). 112

Figura 50. (A) Voltamogramas com eletrodo de disco rotatório para oxidação de DA em várias velocidade de rotação em ECV/MWCNT/poli-CAP, tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7.0, *v*= 5 mV s⁻¹ e [EP] = 500 μmol L⁻¹. (B) Gráfico de Levich para oxidação catalítica de DA no eletrodo modificado em várias concentrações. (C) Gráfico de Koutecky-Levich derivado de (B). 113

Figura 51. (A) Medidas cronoamperométricas para a eletrooxidação de DA no ECV/MWCNT/poli-CAP obtidas em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ em pH 7,0, E_{aplicado}= +0,200 V vs. Ag/AgCl.; (B) Curva analítica para a eletrooxidação de DA no ECV/MWCNT/poli-AF, em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ em pH 7,0 114

Figura 52.(A) Medidas cronoamperométricas para a eletrooxidação de DA no ECV/MWCNT/poli-CAP obtidas em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ em pH 7,0, E_{aplicado}= +0,200 V vs. Ag/AgCl.; (B) Curva analítica para a eletrooxidação de DA no ECV/MWCNT/poli-AF, em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ em pH 7,0 115

Figura 53. Resposta Amperométrica de ECV/MWCNT/poli-CAP em adições de EP, DA, SER, AA e AU na mesma concentração (200 μmol L⁻¹), em tampão fosfato pH 7.0, potencial aplicado de +0,2 V. 118

Lista de Tabelas

Tabela 1. Fenóis utilizados para geração de polímeros como mediadores redox.	44
Tabela 2. Espécies oriundas do estresse oxidativo.....	56
Tabela 3: Reagentes utilizados e seus respectivos fornecedores.....	64
Tabela 4. Diferentes métodos para detecção de 3-NT em amostras biológicas	81
Tabela 5. Determinação de DA em amostras farmacêuticas	96
Tabela 6. Comparação da plataforma ECV/MWCNT/poli-CAP para detecção eletroquímica de EP com outros eletrodos modificados.....	116
Tabela 7. Comparação das plataformas ECV/MWCNT/poli-AF e ECV/MWCNT/poli-CAP para detecção eletroquímica de DA com outros eletrodos modificados.	117
Tabela 8. Determinação de DA em amostras farmacêuticas	119

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

σ - Desvio padrão

ν - Velocidade de varredura de potencial

ΔI - Variação de corrente

3-NT - 3-Nitro-*L*-tirosina

A - Área geométrica do eletrodo

AA - Ácido ascórbico

AF- Ácido ferúlico

Ag/AgCl/Cl⁻ - Eletrodo de referência de prata cloreto de prata

ATR- "Attenuated total reflection" = reflexão total atenuada

AU - Ácido úrico

b - Coeficiente angular

CAP- Capsaicina

D - Coeficiente de difusão

DA - Dopamina

DMF – *N,N*-Dimetilformamida

dsDNA - Ácido desoxirribonucleico de fita dupla

E – Potencial

E_i – Potencial inicial

ECV - Eletrodo de carbono vítreo

E_p - Potencial de pico

EP- Epinefrina

E_{pa} - Potencial de pico anódico

E_{pc} - Potencial de pico catódico

EQM - Eletrodo quimicamente modificado

ERNs - Espécies reativas de nitrogênio

EROs - Espécies reativas de oxigênio

F - Constante de Faraday

FTIR - Fourier-transform infrared spectroscopy = espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

I - Corrente

i_{pa} - Corrente de pico anódico

i_{pc} - Corrente de pico catódico

k_{cat} - Constante de velocidade da reação

MWCNT – Multi-Walled Carbon Nanotubes = nanotubos de carbono de paredes múltiplas

n - Número de elétrons

NTC - Nanotubos de carbono

Poli-AF- Polímero eletrogerado de Ácido Ferúlico

Poli-CAP- Polímero eletrogerado de Capsaicina

SWCNT – Single-Walled Carbon Nanotubes = nanotubos de carbono de paredes simples

VC - Voltametria cíclica

VPD - Voltametria de pulso diferencial

VOQ - Voltametria de Onda Quadrada

UV-Vis- Espectroscopia no ultravioleta-visível

Sumário

1	INTRODUÇÃO GERAL	20
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1	Sensores Eletroquímicos	22
2.2	Eletrodos Quimicamente modificados (EQM) - Aspectos Gerais	25
2.2.1	Abordagens para a modificação química de eletrodos	26
2.3	Mediadores redox: importância	29
2.4	Nanotubos de carbono	32
2.5	Mediadores baseados em fenóis	36
2.5.1	Trabalhos com mediadores redox baseados em fenóis presentes na literatura	41
2.6	Capsaicina	51
2.7	Ácido Ferúlico	52
2.8	Catecolaminas	53
2.9	Estresse Oxidativo	55
2.9.1	3-Nitro- <i>L</i> -tirosina	59
3	OBJETIVOS	62
3.1	Geral	62
3.2	Específicos	62
4	EXPERIMENTAL	64
4.1	Reagentes	64
4.1.1	Tratamento dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT)	65
4.2	Equipamentos e materiais	65
4.3	Limpeza do eletrodo de carbono vítreo (ECV)	66
4.4	Preparação das soluções estoque de 3-NT	66
4.5	Preparação da plataforma ECV/MWCNT	67

4.5.1	Preparação da dispersão de MWCNT.....	67
4.5.2	Modificação do eletrodo de carbono vítreo com MWCNT	67
4.5.3	Análise de 3-NT com ECV/MWCNT	67
4.6	Modificação do eletrodo de carbono vítreo com MWCNT e AF	68
4.7	Modificação do eletrodo de carbono vítreo com MWCNT e CAP	68
4.8	Determinação da área ativa dos eletrodos quimicamente modificados (EQM's).....	68
4.9	Análise de amostras farmacêuticas e testes de interferência.....	69
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO (PARTE 1)	70
5.1	Estudos eletroquímicos da 3-NT em meio prótico	70
5.2	Determinação da curva analítica.....	78
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO (PARTE 2)	82
6.1	Processo de Polimerização de AF em ECV/MWCNT	82
6.2	Caracterização de ECV / MWCNT / poli-AF	83
6.3	Atividade Eletrocatalítica de ECV/MWCNT/poli-AF frente a DA	84
6.4	Estudos Cronoamperométricos	89
6.5	Estudos com Eletrodo de Disco Rotatório.....	91
6.6	Detecção Amperométrica de DA.....	94
6.7	Estudo de interferentes	95
6.8	Análises de amostras reais e testes de recuperação	96
7	RESULTADOS E DISCUSSÃO (PARTE 3)	97
7.1	Preparação do eletrodo modificado	97
7.2	Mecanismo de oxidação de CAP	98
7.3	Caracterização de ECV/MWCNT/poli-CAP	100
7.4	Comportamento Eletroquímico da capsaicina em diferentes valores de pH	100
7.5	Atividade eletrocatalítica de ECV/MWCNT/poli-CAP frente a DA e EP	102
7.6	Estudos Cronoamperométricos	108

7.7 Estudos com Eletrodo de Disco Rotatório.....	111
7.8 Detecção Amperométrica de DA e EP	114
7.9 Estudo de interferentes	117
7.10 Análises de amostras reais e testes de recuperação	118
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	120
9 CONCLUSÕES	122
PERSPECTIVAS.....	123
REFERÊNCIAS.....	124
ANEXOS	136

1 INTRODUÇÃO GERAL

A detecção de moléculas clinicamente relevantes, incluindo pequenas moléculas, é fundamental para a compreensão de suas funções biológicas e fisiológicas, bem como para desenvolver diagnósticos clínicos (HOOD et al., 2004).

Uma variedade de métodos para a medição destes analitos, tanto *in vitro* como *in vivo*, encontra-se disponível. A implementação de métodos eletroquímicos em análises clínicas tem o potencial de alcançar uma detecção rápida, sensível, seletiva e de baixo custo dessas biomoléculas, que são relevantes para o diagnóstico clínico e monitoramento do tratamento de doenças (LABIB; SARGENT; KELLEY, 2016).

A eficiência da eletroanálise pode ser aumentada pelo uso de agentes redox gerados eletroquimicamente. Idealmente, o mediador constitui-se em um sistema redox reversível, ativado no eletrodo, capaz de sofrer reações químicas subsequentes, adequadas e rápidas, permitindo assim a eletrocatalise ou a catalise redox, em processo do tipo mecanístico ErC' (transferência de elétrons reversível seguida de reação química catalítica) (BARSAN; GHICA; BRETT, 2015; CIUCU, 2014a).

Compostos fenólicos sintéticos e/ou naturais podem ser atrativos para a mediação redox, devido à sua facilidade de oxidação e à geração de pares redox reversíveis (BARSAN; GHICA; BRETT, 2015; CIUCU, 2014a; RAZZAGHI-ASL et al., 2013; TEIXEIRA et al., 2013).

A eletropolimerização *in situ* de fenóis, na superfície do eletrodo apresenta várias vantagens, tais como a utilização reduzida de modificadores, a produção de compósitos uniformes e reprodutíveis, que permitem uma relação sinal-ruído mais elevada e alta sensibilidade. Vários exemplos são relatados na literatura como o uso do ácido hidroxibenzoico (FERREIRA et al., 2011), ácido 3-hidroxifenilacético (FERREIRA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2009), ácido poli-vanílico (PODESHVO et al., 2002; SILVA et al., 2016b), ácido poli-xanturênico (SILVA et al., 2010, 2012), em nanotubos de carbono, poli-caféico, em eletrodo de carbono vítreo (MOGHADDAM et al., 2007; REN; LUO; LI, 2006b), além de poli-ácido gálico (SONG et al., 2010b), ácido ferúlico (HAN et al., 2014), naringenina (MÜLAZIMOĞLU, 2012), quercetina

(BARATHI; KUMAR, 2014), luteolina (OZTEKIN et al., 2011), ácido siríngico (SUNDARAM; KADIR, 2017) entre outros (JACOBS; PEAIRS; VENTON, 2010) que levaram ao desenvolvimento de sensores eletroquímicos aplicáveis em eletroanálise.

O presente trabalho descreve a preparação, caracterização e aplicação de sensores baseados em nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) e polímeros eletrogerados de AF (poli-AF) e CAP (poli-CAP), para a determinação de compostos biologicamente relevantes, via oxidação eletrocatalítica. Uma das razões para estudar estas plataformas é a versatilidade destes compostos polifuncionais, que apresentam, entre outros, grupos hidroxilas, capazes de serem ativados *in situ* para sistemas redox quinonóides reversíveis (QRS), sendo o radical fenoxila, o intermediário chave no caminho da reação de polimerização.

Os MWCNTs foram selecionados devido à sua versatilidade, alta área de superfície eletroativa, baixa resistência à transferência de carga, possibilidade de funcionalização e capacidade de evitar o bloqueio da superfície do eletrodo, pelo polímero gerado (DUMITRESCU; UNWIN; MACPHERSON, 2009; JACOBS; PEAIRS; VENTON, 2010; TAVIS et al., 2006). Esta combinação específica, polímeros / MWCNT, proporciona melhora nas propriedades elétricas, eletroquímicas e mecânicas dos eletrodos quimicamente modificados.

A dopamina (DA) e epinefrina (EP) foram escolhidos como analitos. DA e EP são neurotransmissores derivados de catecolaminas, carregados positivamente em pH neutro e estão amplamente presentes no sistema nervoso central. Eles desempenham um papel importante nos processos que envolvem aprendizagem. Níveis alterados de DA têm sido relacionados com várias doenças neurológicas incluindo depressão, doença de Parkinson e esquizofrenia (LABIB; SARGENT; KELLEY, 2016; PEASTON; WEINKOVE, 2004; ROBINSON et al., 2003).

Adicionalmente, relata-se a preparação e o emprego de um sensor baseado em nanotubos de carbono para determinação e quantificação de 3-nitro-*L*-tirosina, uma vez que a mesma é um biomarcador para a determinação de danos oxidativos mediados por peroxinitrito. Uma série de patologias está relacionada com concentrações elevadas de 3-NT, tais como: doenças neurológicas e cardiovasculares (MERGOLA et al., 2013; TEIXEIRA et al., 2016).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Sensores Eletroquímicos

A eletroquímica está centrada na transferência de elétrons, principalmente, nos processos relacionados à interface eletrodo/solução. A eletroquímica desempenha papéis relevantes em várias áreas, sejam elas fundamentais e/ou aplicadas, que envolvem muitos processos biológicos de importância, por meio da investigação da síntese e reatividade de compostos inorgânicos, orgânicos e organometálicos, lidando com tópicos relacionados à nanotecnologia, corrosão e tecnologias industriais, em conversão e armazenamento de energia e com um papel muito forte na área de (bio)analítica. Os métodos eletroquímicos encontraram aplicações importantes na análise de amostras, uma vez que a própria superfície do eletrodo pode ser usada como uma fonte de elétrons, com valores de energia livre variáveis (CIOBANU et al., 2007).

Os sensores químicos são constituídos por um elemento de transdução recoberto por uma camada de reconhecimento (Figura 1). Ocupam posição privilegiada em (bio)análise quantitativa e/ou qualitativa. A natureza das mudanças eletroquímicas na detecção, permite sua classificação como (CIUCU, 2014b):

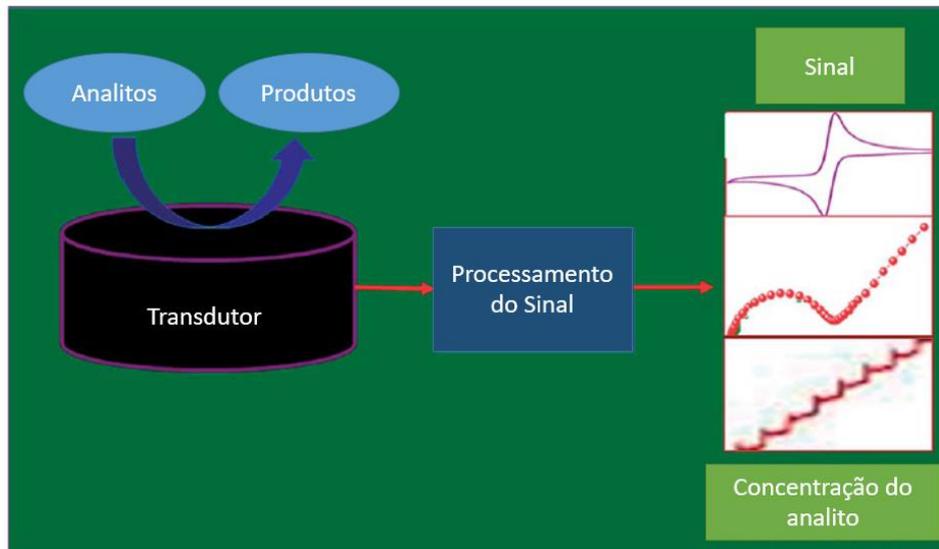
(1) Amperométrico (com base na geração de corrente como resposta em função do comportamento redox do analito alvo na superfície do eletrodo de trabalho, no qual a corrente é proporcional à concentração de espécies eletroativas presentes em solução);

(1) Potenciométrico (informações analíticas convertidas em potencial como resposta analítica, proporcional (em escala logarítmica) à concentração (atividade) das espécies envolvidas na etapa de reconhecimento). Normalmente, mede o potencial em uma interface, muitas vezes em uma membrana;

(2) Condutimétrico (mede a condutividade eletrolítica, que varia com as mudanças nas concentrações de espécies iônicas, sendo condutância e/ou resistência elétrica os parâmetros medidos);

(3) Impedimétrico (mede de impedância, ambos resistência e reatância).

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



Fonte: Adaptado de GOVINDHAN; ADHIKARI; CHEN, 2014 .

Os sensores eletroquímicos apresentam vantagens para o monitoramento de biomoléculas devido a várias características, tais como: capacidade de operar em matrizes complexas, estabilidade, biocompatibilidade, possibilidade de miniaturização, entre outras (KIMMEL et al., 2012) (Figura 2).

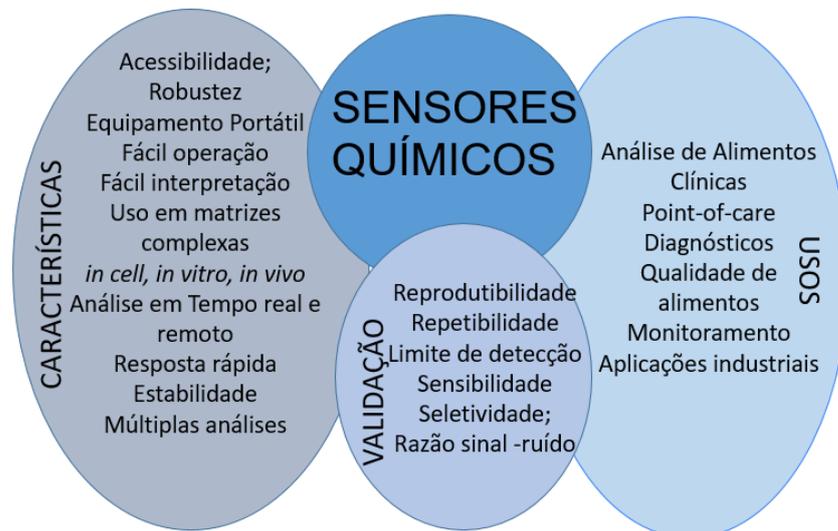
A área que envolve diagnósticos point-of-care (POC) oferece a possibilidade de fornecer diagnósticos de forma rápida, sensível e segura, em configurações não laboratoriais. Os sensores bioanalíticos são capazes de medir, com precisão, a dinâmica química *in vivo* de analitos fisiologicamente importantes (NAYAK et al., 2016).

Os termos quantificáveis, essenciais para assegurar a qualidade da análise, são validados através da avaliação de parâmetros analíticos em sensores químicos (Figura 2). A sensibilidade é a inclinação da curva de calibração analítica e significa que uma pequena alteração na concentração do analito causa uma mudança de

resposta. A seletividade refere-se à extensão em que um método pode determinar um dado analito, em misturas ou matrizes, sem interferências de outros componentes. Um método é seletivo quando a resposta do analito pode ser diferenciada de qualquer outra resposta. Repetibilidade e reprodutibilidade são formas diferentes de expressar a concordância entre as medidas, a denominada precisão.

A repetibilidade aplica-se a análises repetidas por uma pessoa ou por um método, enquanto a reprodutibilidade se aplica às análises repetidas, mas por diferentes analistas, métodos diferentes, etc. O limite de detecção (LD) é a menor concentração que pode ser detectada, em um nível confiável, para um determinado procedimento analítico. A relação sinal/ruído é uma medida da intensidade do sinal em relação ao ruído, representada como o valor médio de um sinal (S) dividido pelo desvio padrão do ruído (N). Todos os parâmetros analíticos são utilizados para a comparação de sensores e desempenho de biossensores, juntamente com a confiabilidade, performance e variabilidade (JUSTINO et al., 2010).

Figura 2. Usos e principais características dos sensores químicos, incluindo parâmetros analíticos, para a validação do processo.



Fonte: Adaptado de JUSTINO et al., 2010 .

Apesar da grande versatilidade e perspectivas apresentadas pelos sensores eletroquímicos, estes ainda apresentam limitações. A passivação e/ou desativação gradual da superfície é uma das desvantagens mais importantes, além da elevada corrente de fundo, resultando em desempenho analítico inferior. A passivação ocorre por adsorção dos produtos da reação redox usada na detecção, ou através de subprodutos dessas reações que podem polimerizar e se acumular na superfície dos eletrodos (LOWINSOHN; BERTOTTI, 2006).

A detecção eletroquímica direta de muitos compostos biológica/ e ambientalmente importantes, geralmente, requer grandes sobrepotenciais para obter densidades de corrente elevadas.

São necessárias modificações na superfície dos eletrodos e, dependendo dos resultados, podem ser amplamente aplicadas em eletroanálise. As mudanças superficiais influenciam diretamente a capacidade de reconhecimento ou a amplificação de corrente, seja por efeitos catalíticos (diminuição do sobrepotencial dos processos eletródicos), por catálise redox (uso de um catalisador, com transferência homogênea de elétrons, resultando em um processo misto heterogêneo/homogêneo) ou pelo aumento da seletividade, por restrição da passagem de espécies interferentes, usando membranas apropriadas (LOWINSOHN; BERTOTTI, 2006).

2.2 Eletrodos Quimicamente modificados (EQM) - Aspectos Gerais

As superfícies dos eletrodos são modificadas para melhorar respostas eletroquímicas, em relação àquelas obtidas em eletrodos convencionais.

Os principais interesses incluem aumento de seletividade, sensibilidade, estabilidade química e eletroquímica, bem como uma maior janela de potencial e resistência à adsorção de interferentes, juntamente com estudos fundamentais para a compreensão dos processos interfaciais. Há necessidade de melhorar o desempenho dos eletrodos e de projetar interfaces, de forma racional.

Em particular, um eletrodo quimicamente modificado é um material condutor ou semicondutor, revestido com um filme monomolecular ou multimolecular (ou supramolecular), iônico ou polimérico, que modifica as propriedades eletroquímicas da interface. Os substratos condutores e semicondutores derivam de materiais convencionais, enquanto os materiais adsorvidos são muito diversos em suas origens e propriedades. Os primeiros relatos, em eletrodos com uma superfície modificada, apareceram na década de 1970, usando olefinas em eletrodos de platina (EDWARDS; BERGREN; PORTER, 2007; LANE; HUBBARD, 1973). Após os primeiros registros, o interesse é, cada vez maior, e é poli-estratégico, tendo permitido o avanço da ciência eletroquímica.

2.2.1 Abordagens para a modificação química de eletrodos

Inicialmente, deve-se considerar o substrato, que é o eletrodo da plataforma que suporta o modificador. São utilizados substratos fabricados comercialmente ou desenvolvidos em laboratório, com composição distinta dos comercializados. Embora qualquer material de eletrodo convencional possa servir de substrato, alguns materiais são mais fáceis de modificar, como Au, Pt, Ag e eletrodos de carbono, nanofibras de carbono, que proporcionam superfícies reprodutíveis e limpas (EDWARDS; BERGREN; PORTER, 2007).

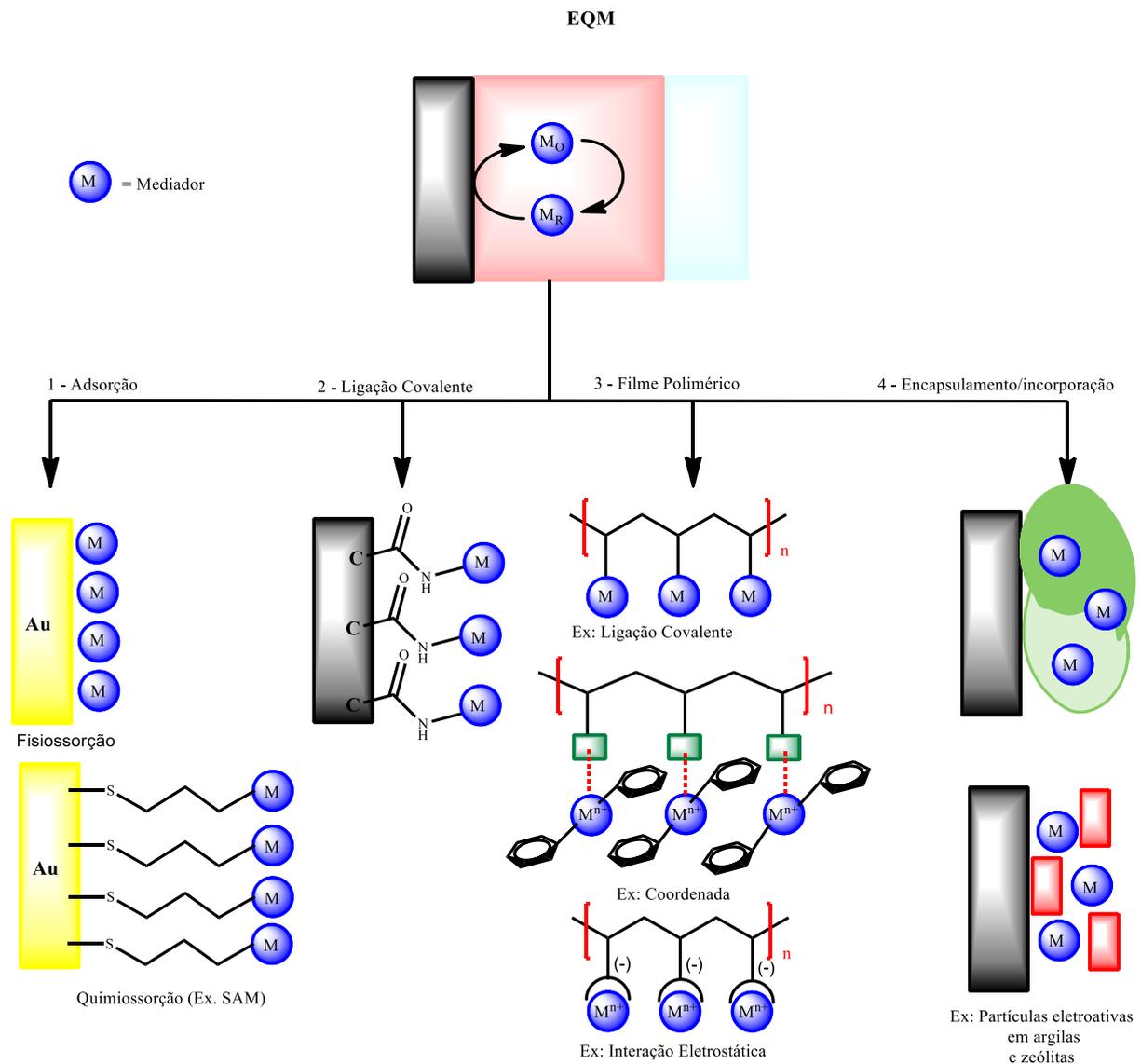
Na maioria dos esquemas relativos à preparação do eletrodo, a superfície do eletrodo é tratada, por meio de procedimentos sistematizados, antes da modificação para fornecer características de superfície reprodutíveis, como por exemplo, cristalinidade, rugosidade, entre outros.

Grupos funcionais específicos também podem ser necessários para algumas estratégias de modificação. Nestes casos, as metodologias de pré-tratamento podem incluir etapas destinadas a criar vários sítios ativos na superfície do substrato. Do mesmo modo, os requisitos dos métodos de caracterização do modificador podem exigir propriedades específicas do substrato. Por exemplo, as superfícies com baixa rugosidade são preferíveis para a caracterização por microscopia de tunelamento com varredura de alta resolução. Assim, a aplicação pretendida do eletrodo modificado, os requisitos das técnicas de caracterização da superfície e a modificação química

geralmente direcionam a escolha de substratos e procedimentos de pré-tratamento (EDWARDS; BERGREN; PORTER, 2007)

Após a escolha e preparação do substrato, a superfície pode ser modificada (Figura 3). Existem várias maneiras de fazer isso (substrato ou plataforma):

Figura 3. Esquema que mostra algumas das abordagens para a modificação química de eletrodos.



Fonte: Adaptado de KOCHIUS et al., 2012 e ZEN; KUMAR; TSAI, 2003 . EQM: eletrodo quimicamente modificado.

(1) Adsorção (Quimiossorção). O procedimento é simples e útil. O filme é fortemente adsorvido ou quimio-adsorvido na superfície do eletrodo. Pode ser realizada, mergulhando o eletrodo em uma solução de mediador ou preparando materiais de suporte antes da mistura com o material do eletrodo. Esta abordagem envolve monocamadas auto-organizadas ao substrato (SAM, “self-assembled monolayers”), onde as moléculas são quimio-adsorvidas espontaneamente na superfície do eletrodo, porque o ambiente do substrato é energeticamente mais favorável do que a solução. Em caso de estabilidade limitada da camada, a melhoria é possível através da introdução de grupos funcionais na molécula.

(2) Ligação covalente. Um método que usa agentes químicos para criar uma ligação covalente entre uma ou mais camadas monomoleculares do modificador químico e a superfície do eletrodo. Existem vários exemplos, como dissulfeto ou uma proteína em Hg, uma olefina em Pt, etc.

(3) Revestimento por polímeros. Um método que introduz filmes de polímeros condutores e não condutores na superfície do eletrodo, por adsorção física ou química. Os filmes de polímero podem ser orgânicos, organometálicos ou inorgânicos, e podem conter o modificador químico ou ter o produto químico adicionado ao polímero em um processo posterior. Os polímeros são materiais interessantes como matriz de suporte para a imobilização de biomoléculas e para eletrocatalise. Eles podem ser polimerizados em um eletrodo via voltametria cíclica ou cronoamperometria (KOCHIUS et al., 2012).

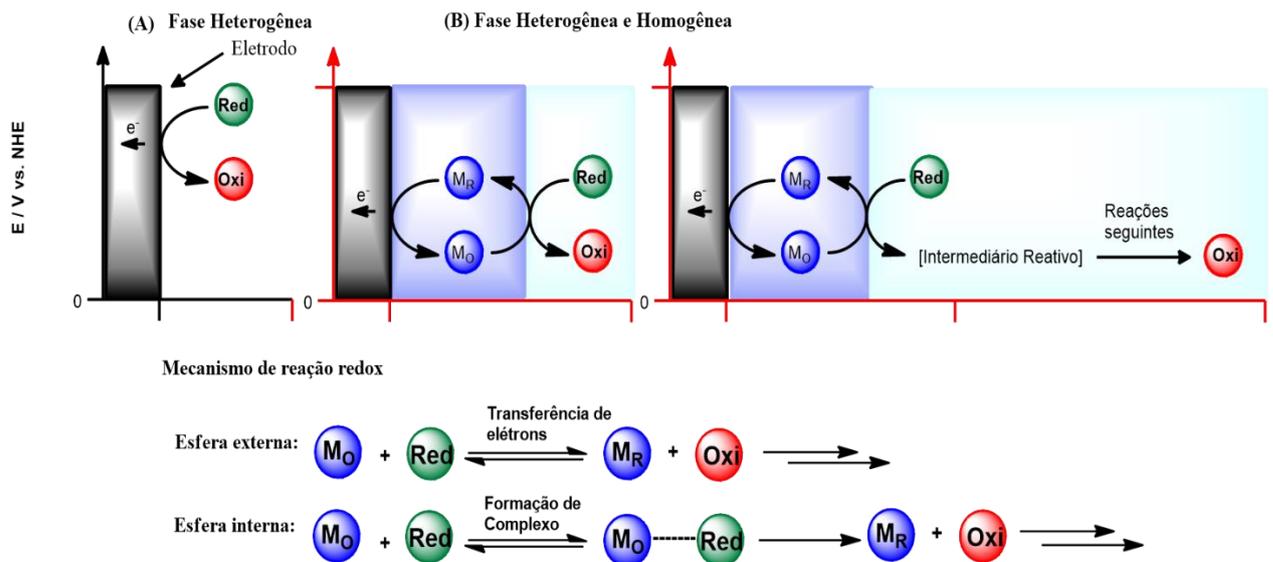
(4) Encapsulamento/incorporação. Um método que possui o modificador químico misturado com um material de matriz de eletrodo. Um exemplo desse método é ter um mediador de transferência de elétrons (o modificador químico) misturado com nanopartículas de carbono / grafenos e outros modificadores em um eletrodo de pasta de carbono (a matriz do eletrodo). A encapsulação do mediador também é possível, prendendo-a na matriz de nanotubos de carbono. Se for insolúvel, é utilizado um solvente orgânico para dissolver as espécies eletroativas no aprisionamento e depois é transferido para um tampão aquoso para a etapa de detecção. As nanoestruturas oferecem uma relação área/volume elevada e própria para imobilizar marcadores e elementos de reconhecimento biológico, amplificando o sinal analítico e melhorando a sensibilidade (D’ORAZIO, 2011; KOCHIUS et al., 2012).

O uso de EQMs é uma área em constante desenvolvimento, e cada vez mais, novas metodologias são propostas para melhorar a eficiência destes eletrodos.

2.3 Mediadores redox: importância

A eficiência da eletroanálise pode ser aumentada através de mediadores redox em EQMs, que, idealmente, se envolvem em uma transferência reversível de elétrons, iniciada no eletrodo (heterogênea) e seguida por uma reação química (homogênea), permitindo assim um mecanismo eletroquímico-químico catalítico (ErCcat) (Figura 4) (BARSAN; GHICA; BRETT, 2015; CIUCU, 2014a).

Figura 4. Comparação entre os processos de oxidação: (A) Direta e (B) indireta ou mediada e mecanismos de reação redox. (Red) e (Oxi) representam o analito em seus estados reduzidos e oxidados, respectivamente. M_R e M_O representam o mediador nos estados reduzidos e oxidados, ambos confinados na superfície do eletrodo.



Fonte: Adaptado de ZEN; KUMAR; TSAI, 2003 .

As conversões eletroquímicas indiretas são formas híbridas que envolvem conversões eletroquímicas diretas (Figura 4A) e processos redox homogêneos (com ambos os reagentes em solução). A transferência heterogênea de elétrons entre o eletrodo e o substrato é substituída por uma reação redox homogênea em solução, que ocorre entre uma espécie ativada eletroquimicamente (mediador) e o substrato (Francke e Little, 2014a) . As condições são escolhidas de modo que apenas o mediador sofre oxidação ou redução no eletrodo, e o substrato, intermediário(s) e o(s)

produto(s) não interfiram com a regeneração eletroquímica do catalisador. Há casos em que o mediador não é regenerado diretamente para correspondente redox, mas sofre mudanças estruturais, porém a catálise redox ainda é evidenciada.

Mecanicamente, dois tipos de processos de transferência de elétrons podem ser distinguidos (Figura 4). No primeiro caso, ocorre uma transferência de elétrons não ligada ou de esfera externa entre o material de partida e o mediador. Na segunda chamada via de esfera interna, ocorre uma reação química homogênea que envolve a formação de ligação entre a forma ativa do mediador e o substrato e é seguida por clivagem de ligação para regenerar o mediador juntamente com a forma oxidada (reduzida) do substrato.

O mediador é, geralmente, um sistema redox reversível, que catalisa outras reações redox. Suas principais características são:

(1) um baixo potencial formal (menos negativo ou positivo, dependendo se o processo é redução ou oxidação, respectivamente), para evitar interferências, tanto quanto possível;

(2) uma menor dependência ou independência completa em relação ao oxigênio;

(3) estável em ambas as formas: oxidada e reduzida;

(4) uma reação de transferência de elétrons rápida e reversível entre o eletrodo e o mediador imobilizado; uma constante de segunda ordem na ordem de 10^6 - 10^7 $M^{-1} s^{-1}$, preferencialmente maior, aproximando-se de um processo controlado por difusão (GORTON; DOMÍNGUEZ, 2002);

(5) uma taxa de transferência de carga rápida dentro do filme (para revestimentos poliméricos e multicamadas);

(6) uma taxa de transferência de elétrons rápida entre o mediador confinado e o analito;

(7) ser inerte em relação a outras substâncias presentes nas amostras, especialmente solventes, produtos, nucleófilos e eletrófilos;

(8) não tóxico;

(9) barato;

(10) disponível comercialmente;

(10) com estabilidade a longo prazo para mediador-eletrodo;

(11) com uma estequiometria bem definida em relação ao analito.

Os mediadores redox de baixo peso molecular podem ser representados por:

(1) espécies orgânicas ou seus produtos redox (por exemplo, compostos nitroaromáticos, quinonas, hidrocarbonetos aromáticos, fenóis, triarilaminas *para*-substituídas, triarilimidazóis, fulerenos, derivados de iodobenzeno, fenoxazinas, fenotiazinas, fenazinas, etc.) (LOWINSOHN; BERTOTTI, 2006; PEREIRA; SANTOS; KUBOTA, 2002);

(2) Compostos organometálicos (ferrocenos, ftalocianinas, metaloporfirinas, complexos de Ni e Co-salen, etc.);

(3) Sais de metais de baixa valência altamente dispersos em partículas metálicas (FRANCKE; LITTLE, 2014).

A busca de novas moléculas com grupos funcionais estratégicos tem sido uma maneira de conectar a química orgânica à eletroquímica. A imobilização de mediadores redox diretamente na superfície de carbono é uma maneira elegante de modificar a superfície do eletrodo.

Na construção de EQMs, os mediadores podem ser imobilizados por aplicação direta, ou por ligação química na superfície do eletrodo, usando diferentes métodos, como mostrado anteriormente (Figura 3). Vários materiais estão sendo explorados para o desenvolvimento de novas interfaces nanoestruturadas, e entre estas interfaces, destacam-se os nanotubos de carbono.

2.4 Nanotubos de carbono

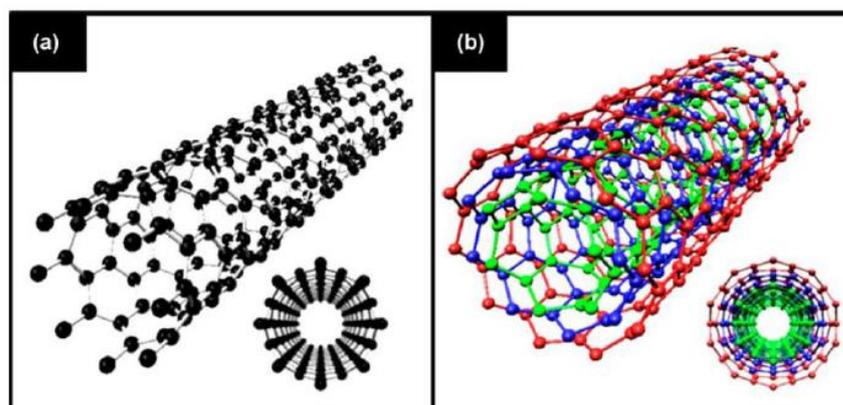
Os nanotubos de carbono têm atraído muita atenção desde a sua descoberta devido à sua boa condutividade elétrica, dimensão nanométrica, alta área superficial, força mecânica significativa, boa estabilidade química e possibilidade de funcionalização com ácidos carboxílicos e excelente adsorção.

A resposta eletrocatalítica observada com nanotubos de carbono foi atribuída principalmente à presença dos planos de aresta (“edge”) na parede e nas extremidades dos nanotubos de carbono.

O uso dos mediadores redox e NTC em uma matriz pode gerar sinergia em termos de desempenho do sensor. Os NTCs também oferecem formas mais eficientes de comunicação entre os eletrodos dos sensores e os sítios redox ativos de moléculas biológicas (DUMITRESCU; UNWIN; MACPHERSON, 2009).

Os dois principais tipos de NTC são os nanotubos de carbono de parede única (SWCNTs) (do inglês “single-walled carbon nanotubes”) e os nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs) (do inglês “multi-walled carbon nanotubes”) que são compostos por folhas de grafeno (Figura 5) (AJAYAN, 1999; IIJIMA, 1991; SILVA et al., 2016a).

Figura 5. Representação de (A) SWCNT e (B) MWCNT.



Em teoria, os NTCs são constituídos de carbono puro, mas na realidade, eles sempre contêm algumas impurezas, tais como:

(1) compostos metálicos ou nanopartículas derivadas dos catalisadores utilizados no crescimento dos nanotubos,

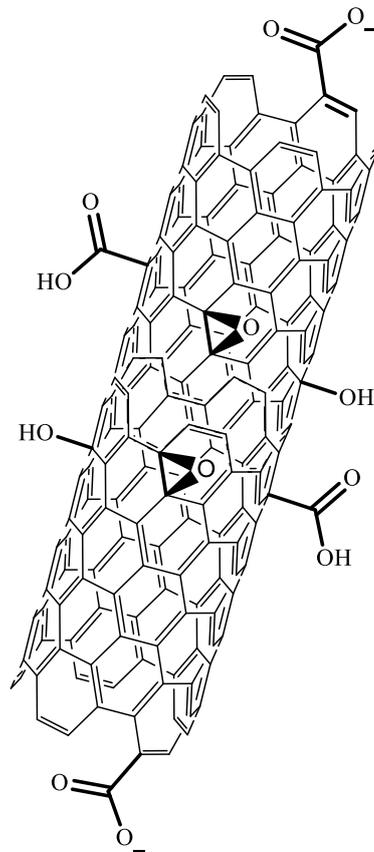
(2) porções contendo oxigênio criadas durante as etapas de lavagem.

Essas impurezas, particularmente os compostos metálicos, são provavelmente responsáveis pela "eletrocatalise" observada em alguns eletrodos modificados com nanotubos. Deve ser realizado um trabalho cuidadoso para a remoção destas impurezas metálicas (DUMITRESCU; UNWIN; MACPHERSON, 2009b).

Entre as diferentes abordagens para a modificação da superfície, os tratamentos ácidos são os mais relatados na literatura, geralmente usando ácido nítrico (HNO_3) ou uma mistura de HNO_3 e ácido sulfúrico (H_2SO_4) (CASTRO et al., 2017).

O tratamento ácido introduz funções oxigenadas na superfície dos NTCs, especialmente carboxilas, hidroxilas fenólicas e lactonas / lactóis (Figura 6), o que pode levar à posterior funcionalização como amidação, alquilação, esterificação e tiolação. O desenvolvimento de metodologias que combinam um alto grau de funcionalização com a preservação adequada dos NTCS é de grande importância. O método de tratamento ácido usando ultrassom, aquecimento moderado e agitação mecânica pode ser aplicado com sucesso para uma efetiva funcionalização de MWCNTs com alto rendimento (CASTRO et al., 2017).

Figura 6. Nanotubo de carbono funcionalizado após tratamento ácido.



Fonte: Autor desta tese, 2017.

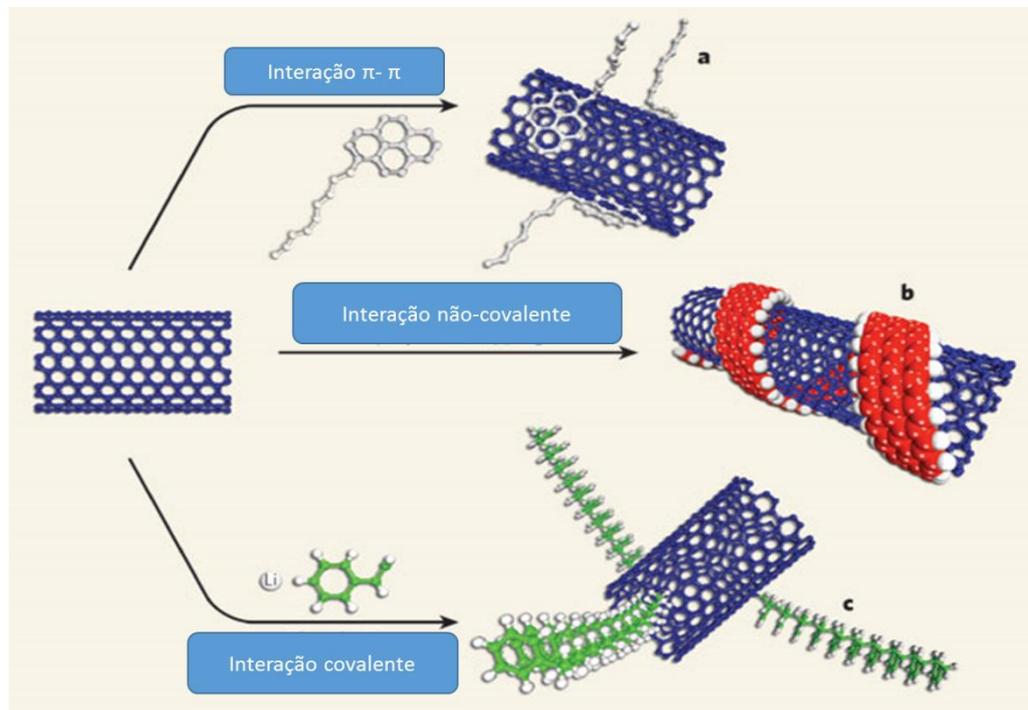
Em qualquer caso, é importante caracterizar os NTCs obtidos. Algumas das ferramentas citadas na literatura para caracterizar os NTCs são (SAJID et al., 2016): microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM), microscopia de tunelamento com varredura (STM), microscopia de força atômica (AFM), ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS) e espectroscopia Raman.

Os NTCs permitem a imobilização de mediadores tanto de origem biológica, quanto inorgânica, orgânica ou por processos de polimerização em eletrodos modificados. Polímeros podem interagir com os NTCs através de interações π - π , por ligações covalentes e não-covalentes, facilitando principalmente sua dispersão em vários solventes (Figura 7).

Atualmente, são utilizados três métodos para este fim, destacados na Figura 6:

- (A)** As moléculas aromáticas podem ser adicionadas aos NTCs por interações não covalentes (conhecidas como interações π - π). Os grupos funcionais dos NTC interagem com o solvente ou a matriz circundante;
- (B)** As interações não covalentes (incluindo interações π - π , forças de van der Waals e interações eletrostáticas) podem ser usadas para envolver polímeros em torno dos NTCs;
- (C)** Os grupos químicos podem ser ligados covalentemente aos NTCs, por exemplo, o lítio (Li) transfere elétrons para grupos funcionais nos NTC, gerando ânions, que reagem com monômeros de estireno para formar cadeias de poliestireno ligadas covalentemente às paredes dos NTCs (AJAYAN; TOUR, 2007).

Figura 7. Modificação química de NTCs: (a) interações π - π ; (b) interações não covalentes; (c) interações covalentes.



Fonte: Adaptado de AJAYAN; TOUR, 2007 .

A modificação da superfície com mediadores redox pode contribuir para superar as desvantagens da heterogeneidade superficial dos NTCs. A caracterização da superfície pode ser realizada através dos métodos já listados, juntamente com o

emprego da microbalança eletroquímica de cristal de quartzo (EQCM), espectros de reflexão total atenuada (ATR) e impedância eletroquímica (CASERO et al., 1999).

2.5 Mediadores baseados em fenóis

Os compostos fenólicos são uma classe de compostos químicos constituídos por um grupo funcional hidroxila (-OH) ligado a um anel aromático.

Fenóis são compostos orgânicos muito versáteis e importantes na indústria química, além de apresentar relevantes propriedades farmacológicas, tais como: anti-inflamatória, antibacteriana, anticonvulsivante, antitumoral e antioxidante (RAPPOPORT, 2003).

A atuação como antioxidante está relacionada com a inibição na degradação oxidativa de materiais orgânicos, incluindo uma grande quantidade de organismos biológicos aeróbios e produtos comerciais. No plasma sanguíneo humano, o α -tocoferol, conhecido como vitamina E, é o derivado fenólico mais eficiente para combater danos oxidativos mediados por radicais peroxila. Os fenóis devem sua atividade à sua capacidade de remover radicais por transferência de hidrogênio e/ou elétrons em processos mais rápidos do que os relacionados com ataques de radicais em um substrato orgânico (RAPPOPORT, 2003).

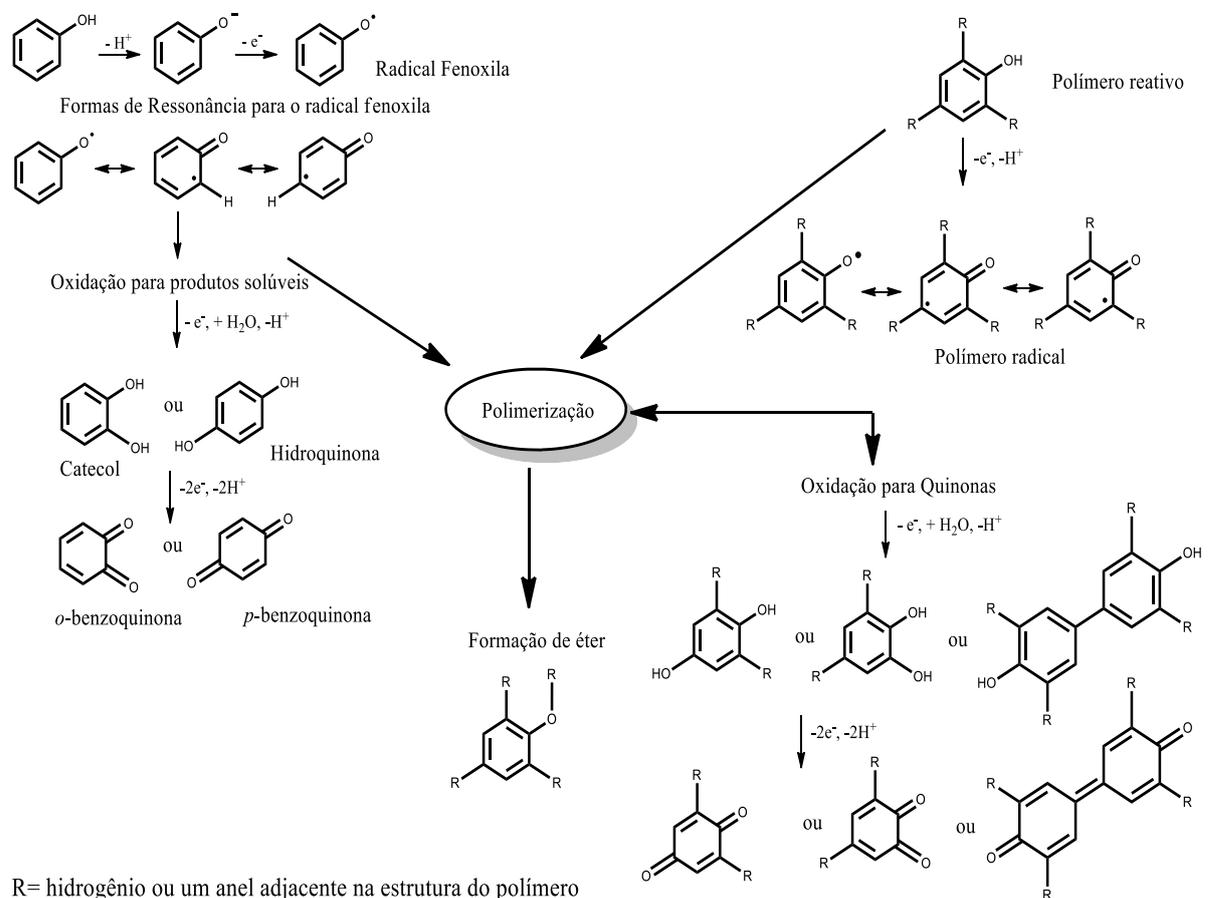
Estudos destes compostos por meio de técnicas eletroquímicas fornecem informações valiosas sobre as reações biológicas redox dessas moléculas. Devido à sua alta sensibilidade, os métodos voltamétricos foram utilizados com sucesso para estudar o comportamento redox de vários compostos de relevância biológica.

Os comportamentos redox de derivados de fenol já foram relatados em diferentes materiais de eletrodo: ouro, platina, carbono, diamante dopado com boro, mercúrio e Ti / IrO₂ (ENACHE; OLIVEIRA-BRETT, 2011)

Na eletrooxidação do fenol e seus derivados, são gerados radicais fenoxila, que podem ser oxidados ou acoplados, formando compostos oligoméricos ou poliméricos com funções éter e quinona. Algumas possíveis vias de eletrooxidação para fenol são mostradas na Figura 8 (EŽERSKIS; JUSYS, 2001).

Durante o processo de eletrooxidação de compostos fenólicos, vários trabalhos relatam a diminuição na corrente devido à formação de um filme polimérico na superfície do eletrodo. Este filme pode promover a passivação dos eletrodos principalmente interferindo na transferência de elétrons que ocorre na interface eletrodo/solução com a diminuição de sítios ativos e aumento de sobrepotencial para conduzir o processo redox (FERREIRA et al., 2006).

Figura 8. Rotas para polimerização de fenóis



Fonte: Adaptado de EŽERSKIS; JUSYS, 2001 .

A passivação dos eletrodos convencionais pode ser evitada através da utilização de nanotubos de carbono. A interação NTC e fenol ocorre através de interações não covalentes (interação π - π entre os anéis aromáticos) e covalentes (formação de éteres que ligam os compostos poliméricos aos NTC) (AJAYAN, 1999; SILVA et al., 2010, 2017, 2016c) (Figura 7).

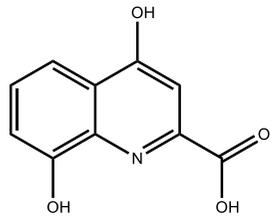
Neste sentido, uma das razões para se investigar fenóis refere-se à versatilidade dos compostos, muitas vezes, polifuncionais, com atenção especial ao grupo hidroxila: (i) que facilita o processo de transferência de elétrons; (ii) pode ser ativado eletroquimicamente *in situ*, por meio da oxidação irreversível da hidroxila fenólica. A quinona resultante pode ser oxidada reversivelmente à correspondente hidroquinona, formando, portanto, um par redox na superfície eletródica, por meio de um processo redox de $2e^-/2H^+$. Esse par redox é um bom candidato a catalisador, tanto através dos dois elétrons envolvidos durante o processo redox, quanto pela liberação de prótons.

Diferentes classes de compostos fenólicos estão presentes na literatura e são utilizados como mediadores redox para análise de compostos de relevância biológica, suas estruturas são apresentadas na Figura 9:

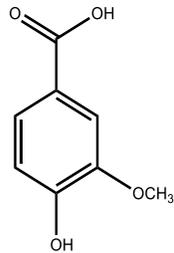
- Ácidos benzoicos: ácido vanílico (AV), ácido gálico (AG) e ácido siríngico (AS);
- Ácidos cinâmicos: ácido ferúlico (AF), ácido caféico (AC), ácido clorogênico (ACL) e Curcumina (CUR);
- Flavonóides: naringenina (NAR), quercetina (Qu), Kaempferol (Kae) e luteolina (Lu);
- Catecóis híbridos: 4-(3-mercaptop-[1,2,4]triazol-1-il)-benzeno-1,2-diol (MTBD), 4-(2-mercaptop-imidazol-1-il)-benzeno-1,2-diol (MIBD); 2,3-diidroxibenzaldeído (2,3-DHB), 3,4-diidroxibenzaldeído (3,4-DHB) e dopamina (DA);
- Aminoácido: *L*-tirosina (Tir);
- Compostos miscelâneos: indofenol (IF), eugenina (EU) e ácido xanturênico (AX).

Figura 9- Estruturas de compostos fenólicos utilizados como mediadores redox, após eletropolimerização.

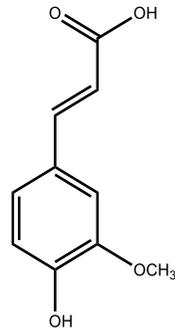
(Continua)



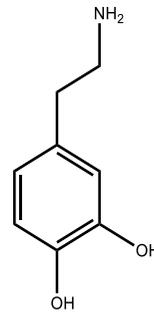
Ácido Xanturênico
(AX)



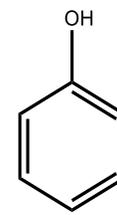
Ácido Vanílico
(AV)



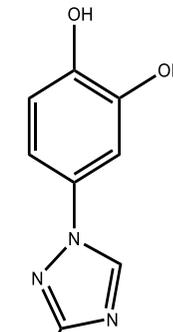
Ácido Ferúlico
(AF)



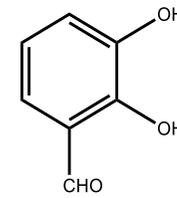
Dopamina
(DA)



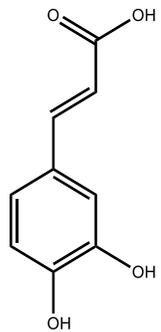
Fenol



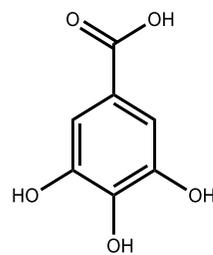
4-(3-Mercapto-
[1,2,4]triazol-1-
il)-benzeno-1,2-
diol (MTBD)



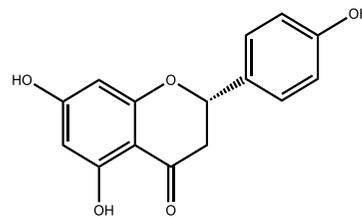
2,3-
Dihidroxibenzaldeído
(2,3-DHB)



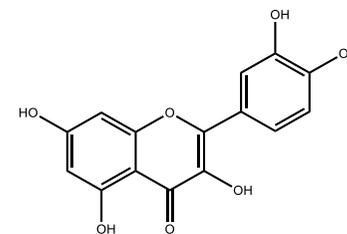
Ácido Caféico
(AC)



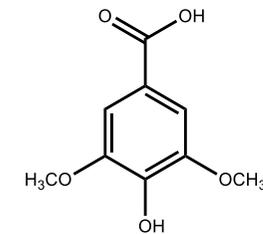
Ácido Gálico
(AG)



Naringenina
(NAR)

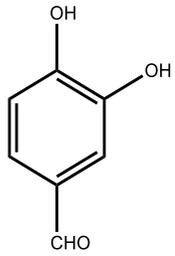
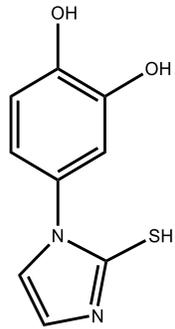
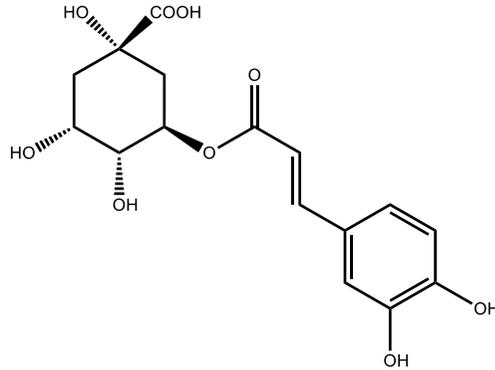
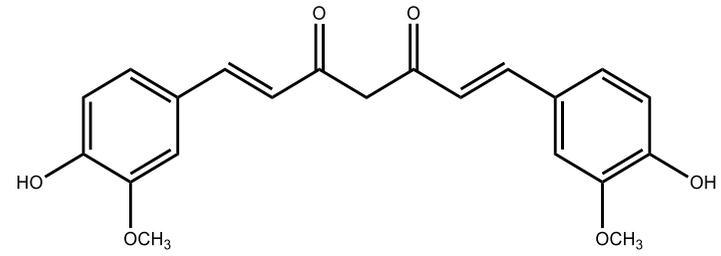
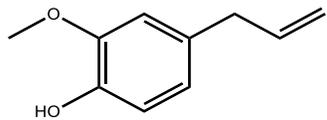
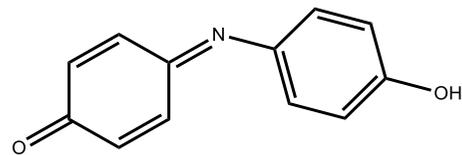
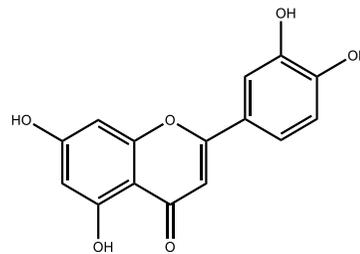
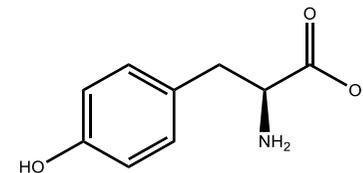
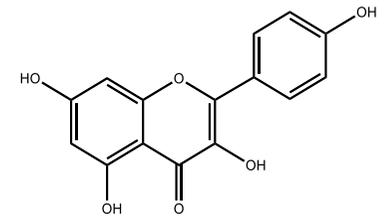


Quercetina
(Qu)



Ácido Siringico
(AS)

(Continuação)

3,4-Diidroxibenzaldeído
(3,4-DHB)4-(2-Mercapto-imidazol-
1-il)-benzeno-1,2-diol
(MIBD)Ácido Clorogênico
(ACL)Curcumina
(CUR)Eugenol
(EU)Indofenol
(IF)Luteolina
(Lut)L-Tirosina
(Tir)Kaempferol
(Kae)

Após a escolha do composto fenólico e das condições ideais para a preparação e aplicação do mediador redox na superfície do eletrodo, vários parâmetros precisam ser avaliados em relação a: influência do pH, natureza e concentração dos tampões influência do oxigênio, faixa de potencial a ser trabalhada, número de ciclos em voltametria cíclica, medida da cobertura da superfície, concentração do mediador redox, tipo de modificador e seu pré-tratamento, técnica de imobilização e caracterização da superfície por diferentes técnicas.

Para a reação entre o mediador redox e o analito, é importante obter:

- (1) O número de elétrons transferidos;
- (2) Parâmetros termodinâmicos;
- (3) Cinética de transferência de carga e constantes cinéticas aparentes;
- (4) Parâmetros analíticos juntamente com análises de interferência e aplicação em amostras reais;
- (5) e por último, mas não menos importante, a definição dos mecanismos eletroquímicos.

2.5.1 Trabalhos com mediadores redox baseados em fenóis presentes na literatura.

A Tabela 1 apresenta uma ampla gama de trabalhos publicados com compostos fenólicos como mediadores, sendo que nessa tese, dar-se-á maior ênfase aos trabalhos já publicados em nosso grupo.

No grupo de eletroquímica da UFAL, o primeiro sensor baseado em composto fenólico foi desenvolvido por Silva et al., (2010) com descrição, pela primeira vez, do desenvolvimento de um sensor químico simples e altamente sensível baseado em um novo material eletroativo, eletrogerado *in situ* a partir da eletrooxidação de ácido xanturênico em um eletrodo de carbono vítreo (ECV) modificado com MWCNT (ECV/MWCNT). A superfície do eletrodo modificado é recoberta gradualmente por filme eletroativo e o par redox eletrogerado corresponde a um processo de

transferência de elétrons quase-reversível (ECV/MWCNT/poli-AX). A sinergia entre poli-AX e MWCNT confere alta sensibilidade e seletividade para a detecção de NADH

O ECV modificado apresentou uma eficiente oxidação eletrocatalítica em relação ao NADH com um potencial aplicado de 0,1 V vs. Ag/AgCl. A constante cinética, k_{cat} , para a oxidação eletrocatalítica de NADH foi avaliada por diferentes técnicas eletroquímicas, cronoamperometria e voltametria, utilizando eletrodo de disco rotatório (EDR), no qual foram obtidos valores próximos de $10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$. O sensor proposto apresentou resposta linear na faixa de concentração de 0,50 a $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, com alta sensibilidade, que pode ser atribuída à eficiência da reação entre o sistema quinônico de poli-AX e NADH. Os limites de detecção e quantificação de $0,10 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,51 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, foram determinados de acordo com as recomendações da IUPAC para análises com NADH (SILVA et al., 2010).

O sensor ECV/MWCNT/poli-AX descrito anteriormente foi aplicado com sucesso para a determinação simultânea dos ácidos ascórbico e úrico. Os voltamogramas cíclicos mostram que o eletrodo modificado exibe uma excelente atividade eletrocatalítica para a oxidação de AA com baixo potencial (0,05 V vs. Ag/AgCl) e diferenças de picos anódicos (E_{paAA} vs. E_{paAU}), próximo de 300 mV vs. Ag / AgCl, em soluções contendo AA e AU. Valores de cerca $10^6 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ foram obtidos para a constante cinética k_{cat} para a oxidação catalítica de AA. O sensor forneceu limites de detecção de $0,19 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,31 \mu\text{mol L}^{-1}$ para AA e AU, respectivamente. Além disso, o sensor proposto apresentou ótimos valores de recuperação em análises de AA e AU em amostras de urina (SILVA et al., 2012).

SILVA et al., (2016) reportaram o desenvolvimento de uma plataforma nanoestruturada eficiente baseada em MWCNT funcionalizadas com um polímero de ácido vanílico (AV), gerado *in situ*. Utilizou-se como sensor analítico para a determinação simultânea de ácido ascórbico (AA), dopamina (DA) e ácido úrico (UA). O processo de eletropolimerização do AV, realizado em eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNT, produz três sistemas redox baseados em sistemas quinônicos. O sensor amperométrico apresentou os seguintes valores para a determinação simultânea de AA, DA e UA: para AA, uma faixa linear de $5\text{-}120 \mu\text{mol L}^{-1}$ de limite de detecção de $3,5 \mu\text{mol L}^{-1}$; para DA, linear de $5\text{-}120 \mu\text{mol L}^{-1}$ e limite de

detecção de $4,5 \mu\text{mol L}^{-1}$; e para AU, faixa linear de $5\text{-}120 \mu\text{mol L}^{-1}$ e um limite de detecção de $1,5 \mu\text{mol L}^{-1}$. A partir dos dados obtidos, o desenvolvimento da plataforma com base em MWCNT e poli-AV apresentou-se eficiente para a determinação simultânea de AA, DA e AU (SILVA et al., 2016b).

A polimerização do ácido ferúlico (poli-AF) em ECV/MWCNT levou à geração de um sistema quase-reversível, sugerindo a formação de um sistema quinônico (SILVA et al., 2017). A plataforma modificada aplicada para a determinação em separado de NADH, epinefrina (EP) e dopamina (DA), apresentou-se como uma plataforma versátil. As técnicas de voltametria cíclica e cronoamperometria foram empregadas para investigar a oxidação eletrocatalítica de NADH, EP e DA no eletrodo modificado. As curvas analíticas obtidas para NADH, EP e DA apresentaram faixas lineares de $59\text{-}1560$, $73\text{-}1406$ e $5\text{-}120 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Os limites de detecção foram $17,7$; $22,2$ e $2,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ para NADH, EP e DA, respectivamente. As constantes catalíticas para a oxidação de NADH, EP e DA no eletrodo modificado (ECV/MWCNT/poli-AF) foram: $5,56 \times 10^3$, $6,99 \times 10^3$ e $1,15 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectivamente. Análises superficiais por MEV revelaram recobrimentos dos NTC após polimerização de AF indicando agregação do material eletrogerado em nanotubos. O sensor proposto apresentou ótimos resultados relativos aos testes de recuperação realizados em amostras farmacêuticas de DA e EP (SILVA et al., 2017).

Tabela 1. Fenóis utilizados para geração de polímeros como mediadores redox.

(Continua)

Mediador	Analitos	Plataforma	Técnica	pH	Faixa Linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Sensibilidade ($\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$)	LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Constante de segunda ordem ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	Referências
AX	NADH	ECV/MWCNT/poli-AX	Amp.	7,0	0,50 – 10,0	2,2	0,10	$7,72 \times 10^4$	SILVA et al., 2010
	AA	ECV/MWCNT/poli-AX	Amp.	7,0	25 - 325	0,36	0,19	$2,3 \times 10^6$	SILVA et al., 2012
	AU	ECV/MWCNT/poli-AX	Amp.	7,0	25 - 325	0,31	0,31	-	SILVA et al., 2012
AG	DA	ECV/poli-AG	VPD	7,4	5-100	-	3,6	-	SONG et al., 2010a
	Polifenóis	ECV/MWCNT/poli-AG	VOQ	2,6	4,97-33,8	-	3,22	$2,75 \times 10^4$	ABDEL-HAMID; NEWAIR, 2016
AF	NADH	ECV/MWCNT/poli-AF	Amp.	7,0	59,1-1560	$6,73 \times 10^{-3}$	17,73	$5,56 \times 10^3$	SILVA et al., 2017
	EP	ECV/MWCNT/poli-AF	Amp	7,0	73-1406	$3,69 \times 10^{-3}$	22,28	$6,99 \times 10^3$	SILVA et al., 2017
	DA	ECV/MWCNT/poli-AF	Amp	7,0	5,0-120	$3,72 \times 10^{-2}$	2,20	$1,15 \times 10^4$	SILVA et al., 2017
	DA	ECV/ERGO-AF	Amp	6,0	0,6-1000	$9,63 \times 10^{-3}$	0,19	-	HAN et al., 2014
NAR	Cu^{+2}	ECV/poli-NAR	VPD	5,0	1×10^{-6} -1,0	-	$1,0 \times 10^{-6}$	-	MÜLAZIMOĞ LU, 2012
Lut	Cu^{+2}	ECV/Poli-Lut	VOQ	5,0	1×10^{-5} -1,0	-	$6,0 \times 10^{-6}$	-	OZTEKIN et al., 2011
Kae	Cu^{+2}	ECV/Poli-Kae	VOQ	5,0	1×10^{-5} -1,0	-	$3,0 \times 10^{-6}$	-	OZTEKIN et al., 2011

(Continua)

Qu	Hidrazina	ECV/pristina-MWCNT@Qu	Amp	7,0	5-3000	$1,57 \times 10^{-2}$	$1,36 \times 10^{-1}$	BARATHI; KUMAR, 2014
	AU	WGE/Qu	VPD	7,0	1-50	-	1,0	HE et al., 2007
	Cisteína	ECV/NG/NFAg/Qu	VPD	7,0	0,9-12,4		0,28	ZARE et al., 2016a
AS	Cisteína	ECV/AS@CL-08	Amp	6,65	100-1000	$5,4 \times 10^{-3}$	0,639	SUNDARAM; KADIR, 2017
AV	AA	ECV/MWCNT/poli-AV	Amp	7,0	5-120	$6,25 \times 10^{-2}$	3,5	SILVA et al., 2016c
	DA	ECV/MWCNT/poli-AV	Amp	7,0	5-120	$4,8 \times 10^{-2}$	4,5	
	AU	ECV/MWCNT/poli-AV	Amp	7,0	5-120	$8,0 \times 10^{-2}$	1,5	
2,3-DHB	NADH	ECV/2,3-DHB	VC	7,0	20-800		10,0	PARIENTE et al., 1996
3,4-DHB	NADH	ECV/3,4-DHB	Amp	6,5	8-10	$2,0 \times 10^{-4}$		PRIETO- SIMÓN; FÀBREGAS, 2004
Fenol	Hidrazina	ECV/HQ@p-MWCNT	Amp	7,0	100-1000	-	78	SUNDARAM; ANNAMALAI, 2012
MTBD	NADH	E @Au/MTBD	Amp.	7,2	80-150	$1,73 \times 10^{-1}$	0,50	DEY et al., 2010
MIBD	NADH	E @Au/MIBD	Amp	7,2				DEY et al., 2010

<i>(Continua)</i>									
AC	AA	ECV/poli-AC	VC	6,64	20-1200	-	9,0		LI; REN; LUO, 2008
	DA	ECV/poli-AC	VC	6,64	1-40		0,40		LI; REN; LUO, 2008
	AA	ECV/poli-AC	VC	7,7	0,20-1000		7,0		REN; LUO; LI, 2006b
	EP	ECV/poli-AC	VC	7,7	2-80		0,20		REN; LUO; LI, 2006b
	AU	ECV/poli-AC	VC	7,7	5-300		0,60		REN; LUO; LI, 2006b
	Glutaciona	ECV/NC-poli-AC	VC	7,0	1000-50000		0,50		LEE et al., 2014
	NADH	EI/Nanocarbono/AC	Amp	7,0	3-60	$1,20 \times 10^{-2}$	1,6		ZANARDI et al., 2015
	NADH	ECV/poli-AC	VVL	7,0				$3,0 \times 10^3$	ZARE; GOLABI, 2000)
ACL	NADH	ECC/ACL	Amp	6,0	1-120	$2,5 \times 10^{-2}$	0,2	$1,7 \times 10^3$	SALIMI; HALLAJ; GHADERMAZI, 2005
	NADH	ECV/ACL	VVL	7,0	-	-	-	$2,1 \times 10^3$	ZARE; GOLABI, 1999
EU	Homocisteína	ECV/poli-EU	VC	1,0					OKUMURA et al., 2008
	Glutaciona	ECV/poli-EU	VC	1,0					OKUMURA et al., 2008
IF	NADH	EPC-FZr/IF	Amp	6,0				$6,2 \times 10^4$	DICU et al., 2003
CUR	Hidrazina	ECV/MWCNT/CUR	Amp	8,0	2-44	$2,3 \times 10^{-2}$	1,4	$6,26 \times 10^3$	ZHENG; SONG, 2009

<i>(Continuação)</i>									
	AA	ECV/MWCNT/politir	VPD	7,4	0,5-1000		2,0		WANG; BI, 2013a
	Polifenóis	ECV/SWCNT/politir	Amp	7,4	0,5-170	$5,2 \times 10^{-1}$	$8,8 \times 10^{-3}$		EGUÍLAZ et al., 2016
	DA	ECV/MWCNT/politir	VPD	7,4	0,1-30		0,02		WANG; BI, 2013a
	AU	ECV/MWCNT/politir	VPD	7,4	1,0-350		0,3		WANG; BI, 2013a
DA	EP	ECV/MWCNT/DA	VPD	5,0	4,9-90,9		1,5		ZARE et al., 2016b
	AA	ECV/MWCNT/DA	VPD	5,0	2,0-13,2		0,62		ZARE et al., 2016b

NOTA: AX: Ácido Xanturênico; AG: Ácido Gálico; AF: Ácido Ferúlico; NAR: Naringenina; Lu: Luteolina; Kae: Kaempferol; Qu: Quercetina; AS: Ácido Siríngico; AV: Ácido Vanílico; 2,3-DHB:2,3-Diidroxibenzaldeído; MTBD: 4-(3-mercapto-[1,2,4]triazol-1-il)-benzeno-1,2-diol; AC: Ácido Caféico; MIBD: 4-(2-mercaptoimidazol-1-il)-benzeno-1,2-diol ACL: Ácido Clorogênico; EU: Eugenol; IF: Indofenol; CUR: Curcumina; Tir: Tirosina; AA: ácido ascórbico; DA: dopamina; EP: epinefrina; AU: ácido úrico; ACE: acetaminofeno.

Amp: Amperometria; VC: Voltametria Cíclica; VPD: Voltametria de Pulso Diferencial; VOQ: Voltametria de Onda Quadrada; VVL: Voltametria de Varredura linear; EPC-FZr: Eletrodo de pasta de carbono modificado com fosfato de zircônio; ECC: eletrodo a base de carbono cerâmico; ERGO: óxido de grafeno reduzido eletroquimicamente; MWCNT: nanotubos de carbono de paredes múltiplas; SWCNT: nanotubos de carbono de paredes simples; NC: Nanocompósitos; pristine-MWCNT@Qu: quercetina ligada a nanotubos de carbono de paredes múltiplas; WGE/Qu: Eletrodo de grafite wax modificado com quercetina; AS@CL-08: carbono black (CL-08) funcionalizado com ácido siríngico (AS); HQ@p-MWCNT: hidroquinona imobilizada em nanotubos de carbono de paredes múltiplas purificado; E@Au: eletrodo policristalino de ouro; Nanocarbono: nanopartículas de carbono; NG: Nanopartículas de grafeno; NFAg: Nanofolhas de prata.

Fonte: Autor desta tese, 2017.

Sensores baseados em polifenóis são também descritos na literatura por outros grupos de pesquisa. A modificação eletroquímica do eletrodo de carbono vítreo (ECV) por naringenina (NAR), um flavonoide, é utilizado para a determinação dos íons cobre (II). A modificação superficial do ECV foi realizada com NAR usando voltametria cíclica, enquanto que a caracterização do sensor proposto foi realizada com voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica. A sensibilidade do sensor em relação aos íons Cu (II) foi avaliada em solução tampão Britton-Robinson, pH 5,0, por voltametria de pulso diferencial, apresentando boa repetibilidade e foi aplicado para a determinação de íons Cu (II) em amostras de água do lago Beyşehir (em Konya, Turquia). O limite de detecção foi obtido inferior a $1,0 \times 10^{-12}$ mol L⁻¹. O método proposto foi simples, rápido, de baixo custo e sensível para a determinação de íons Cu (II) (MÜLAZIMOĞLU, 2012).

Oztekin *et al.*, (2011) também trabalharam com os flavonoides, luteolina e kaempferol, que foram polimerizados eletroquimicamente na superfície do eletrodo de carbono vítreo para obtenção de eletrodos modificados com poli-luteolina e poli-kaempferol. A formação de camada de polifenol na superfície do ECV foi evidenciada por microscopia de força atômica. A voltametria de onda quadrada se mostrou mais sensível em comparação com a voltametria do pulso diferencial. Os sensores propostos apresentaram alta sensibilidade para determinação dos íons Cu (II), além de boa reprodutibilidade, estabilidade e seletividade.

Com o objetivo de desenvolver um sensor para a detecção de *L*-cisteína (*L*-Cis), Sundaram e Kadir (2017) trabalharam com sensor baseado em carbono negro (CL-08) e ácido siríngico (SA) para eletrocatalise seletiva de *L*-Cis que ocorreu em 0,04 V versus Ag/AgCl. Os possíveis produtos redox gerados *in situ*, foram nomeados como 2,6-dimetoxibenzoquinona e o ácido 3,4-di-hidroxi-5-metoxibenzoico e foram propostos para se formar no ECV/AS@CL-08 com dois comportamentos de transferência de elétron e nernstiano, por meio das análises de FTIR e UV-vis, com evidências da presença de quinonas. O sensor apresentou eletrocatalise para *L*-Cis com sensibilidade de 0,42 nA μ mol L⁻¹ na faixa de detecção de 20-100 μ mol L⁻¹, e limite de detecção de 639 nmol L⁻¹ utilizando cronoamperometria. Ensaios de recuperação foram realizados em amostras do soro sanguíneo e de frango processados, com obtenção de ótimos resultados.

Song *et al.*, (2010) verificaram que a interferência do ascorbato com a determinação da dopamina pode ser eficientemente eliminada, sendo essa observação atribuída ao filme de poli-AG, carregado negativamente, o que bloqueia a superfície eletródica, dificultando a transferência de elétrons de espécies carregadas negativamente em solução, fato corroborado por espectroscopia de impedância eletroquímica.

Arquiteturas moleculares redox foram derivadas eletroquimicamente na superfície do eletrodo, por adição de Michael de *o*-quinona com nucleófilos adsorvidos na superfície (DEY *et al.*, 2010). A *o*-quinona eletrogerada sofre uma reação que envolve adição de Michael com os nucleófilos mercaptotriazol e mercaptoimidazol pré-montados em eletrodos de Au. A reação de adição de Michael produz as espécies redox de 4-(3-mercaptop-[1,2,4] triazol-1-il)-benzeno-1,2-diol (MTBD) e 4-(2-mercaptopimidazol-1-il)-benzeno-1,2-diol (MIBD). A adição de Michael da *o*-quinona eletrogerada com o nucleófilo é acompanhada quantitativamente em tempo real, usando microbalança eletroquímica de cristal de quartzo (EQCM). A arquitetura molecular redox na superfície do eletrodo é caracterizada por medições espectrais por ATR e eletroquímicas. Ambos os conjuntos moleculares redox medem eficientemente a oxidação de NADH em baixo potencial.

Três filmes diferentes de polímeros condutores com grupos funcionais carboxílicos livres foram obtidos a partir dos isômeros de ácido 2,3- e 4-hidroxifenilacético (HPA) e os respectivos mecanismos de eletropolimerização foram elucidados por cálculos de teoria do funcional de densidade por Rodrigues *et al.*, (2014). As diferentes propriedades observadas nessas novas características dos novos materiais, obtidos por voltametria cíclica em grafite, estão de acordo com a interpretação teórica apresentada para cada mecanismo de reação, que envolve o acoplamento de cátions radicais diferentes e a formação de poliéteres aromáticos com grupos carboxilatos livres, caracterizados por espectrometria FTIR e testes eletroquímicos. A análise computacional das densidades de spin dos cátions radicais e variação das taxas atômicas parciais durante as oxidações dos monômeros indicam os sítios reativos para o seu acoplamento, permitindo a proposição de mecanismos de eletropolimerização de HPA (RODRIGUES *et al.*, 2014).

Ferreira *et al.*, (2011) realizaram estudos eletroquímicos e morfológicos da formação de poli-(ácido 4-hidroxibenzóico), preparados em diferentes valores de pH, na superfície de grafite. A voltametria cíclica, a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), a microbalança eletroquímica de cristal de quartzo (EQCM) e a microscopia de força atômica (AFM) foram realizadas para estudar os diferentes eletrodos polimerizados. A análise EIS indicou que a resistência à transferência de carga para poli-(4-HBA) eletropolimerizado a pH 12,0 foi de cerca de 2 e 1,4 vezes maior quando comparada a pH 0,5 e 7,0, respectivamente. Os estudos através do EQCM mostraram maior quantidade de massa do polímero depositado em meio ácido. As imagens da AFM indicaram que a topografia é afetada pelo valor do pH, enquanto os filmes preparados em condições ácidas de pH apresentaram maior rugosidade (FERREIRA *et al.*, 2011).

Como pode ser observado, existe na literatura uma ampla variedade de compostos fenólicos utilizados como mediadores redox em diferentes plataformas, agentes modificadores e métodos de imobilização, o que possibilita a construção de novas plataformas para vários analitos de relevância biológica. Os principais obstáculos em comparar os sensores baseados em compostos fenólicos consistem nas diferentes condições de análises, tais como: pH, natureza do tampão, eletrodos, modificadores, técnicas eletroquímicas, analitos, entre outros.

Diante dos trabalhos analisados, podemos destacar que todos mencionam que a transferência de elétrons é mediada por quinonas eletrogeradas das plataformas modificadas com compostos fenólicos, isso fica evidenciado principalmente com experimentos envolvendo FTIR (DEY *et al.*, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2014; SUNDARAM; KADIR, 2017). Entretanto uma grande limitação apresentada está relacionada à ausência de informações estruturais acerca dos produtos eletrogerados da oxidação dos compostos fenólicos apresentados, isso se deve, principalmente, à dificuldade em realizar ensaios espectroscópicos com as plataformas modificadas nas quais estes produtos estão incorporados.

Entretanto, alguns desses mediadores ainda apresentam uma série de limitações como baixa sensibilidade, reprodutibilidade, baixas constantes de velocidade, dificuldade em elucidação dos produtos eletrogerados na superfície dos eletrodos modificados, entre outros. Diante do apresentado, existe uma busca por

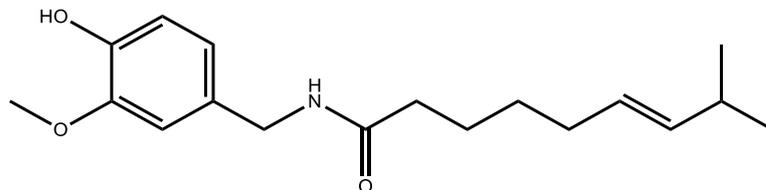
novas interfaces que possibilitem melhores desempenhos, justificando, portanto, o emprego de novos mediadores.

Nos capítulos seguintes apresentamos pesquisas bibliográficas com os compostos fenólicos, ácido ferúlico e capsaïcina, que são utilizados como mediadores redox neste trabalho, além da relevância biológica que motivou a seleção dos analitos: dopamina, epinefrina e 3-nitro-*L*-tirosina para nossas plataformas.

2.6 Capsaïcina

A capsaïcina (*trans*-8-metil-*N*-vanilil-6-nonenamida) (Figura 10) é um fenol de ocorrência natural extraído de frutos de plantas pertencentes ao gênero *Capsicum*. Ela é um membro da família vanilóide de compostos tais como vanilina de baunilha, eugenol de folhas de louro e zingerona de gengibre (SENESE, 2015). Os vanilóides possuem um grupo vanilila (4-hidroxi-3-metoxibenzila) e isto confere sua atividade biológica. Estruturalmente, como outros vanilóides, a capsaïcina possui um anel benzênico com uma relativamente longa cadeia carbônica hidrofóbica, com um grupo amida polar (HAYMAN; KAM, 2008) (Figura 10).

Figura 10. Estrutura da capsaïcina



Fonte: Autor desta tese, 2017

A capsaïcina é um composto polifuncional inodoro e com gosto picante. Apresenta-se como um sólido de ponto de fusão de 62-65°C e massa molecular de 305,4 kDa. Como não é solúvel em água, álcoois e outros solventes são utilizados para facilitar sua solubilização em preparações tópicas e sprays (HAYMAN; KAM, 2008)

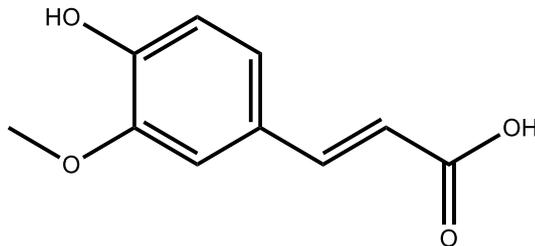
Capsaicinóides possuem algumas propriedades biológicas que podem ser benéficas para a saúde humana. Eles têm alto poder antioxidante, além de apresentarem propriedades anti-tumoral, anti-mutagênica, antibacteriana e

anticancerígena. Eles também exibiram efeitos protetores contra o aumento do colesterol e obesidade, e também têm sido usados como analgésicos tópicos para o tratamento de algumas doenças, como nevralgia pós-herpética e hipersensibilidade química gastro-intestinal (HAYMAN; KAM, 2008; KACHOOSANGI; WILDGOOSE; COMPTON, 2008).

2.7 Ácido Ferúlico

Ácido ferúlico (ácido 4-hidroxi-3-metoxi-*trans*-cinâmico) (Figura 11) tem recebido muita atenção em medicina chinesa desde que foi relacionado como um dos componentes eficazes em ervas chinesas, tais como *Angelica sinensis*, *Cimicifuga heracleifolia* e *Lignsticum chuangxiong*, sendo um dos ácidos fenólicos mais abundantes em plantas (SAKAI et al., 1999).

Figura 11. Estrutura do ácido ferúlico



Fonte: Autor desta tese, 2017.

Em plantas, o ácido ferúlico é raramente encontrado na forma livre. Encontra-se geralmente na forma de ésteres em ligações cruzadas com polissacarídeos na parede celular, tais como arabinoxilanos em gramíneas, pectina em espinafre e beterraba e xiloglicanas em bambu (IIYAMA; LAM; STONE, 1994).

Ele também pode formar ligações cruzadas com proteínas. A propriedade de ligação cruzada de ácido ferúlico com ambos os polissacarídeos e proteínas sugere que o mesmo pode ser usado na preparação de géis (OU; KWOK, 2004).

Nos últimos anos, tem havido um número crescente de registros sobre as funções fisiológicas do ácido ferúlico e de seus derivados em seres humanos. Muitas aplicações de ácido ferúlico na indústria de alimentos também foram reveladas.

Podemos citar como principais propriedades do ácido ferúlico, sua atividade antioxidante, preventiva contra aterosclerose, anticâncer, com precursor na produção de vanilina, na conservação de alimentos e como agente de ligações cruzadas em proteínas (OU; KWOK, 2004).

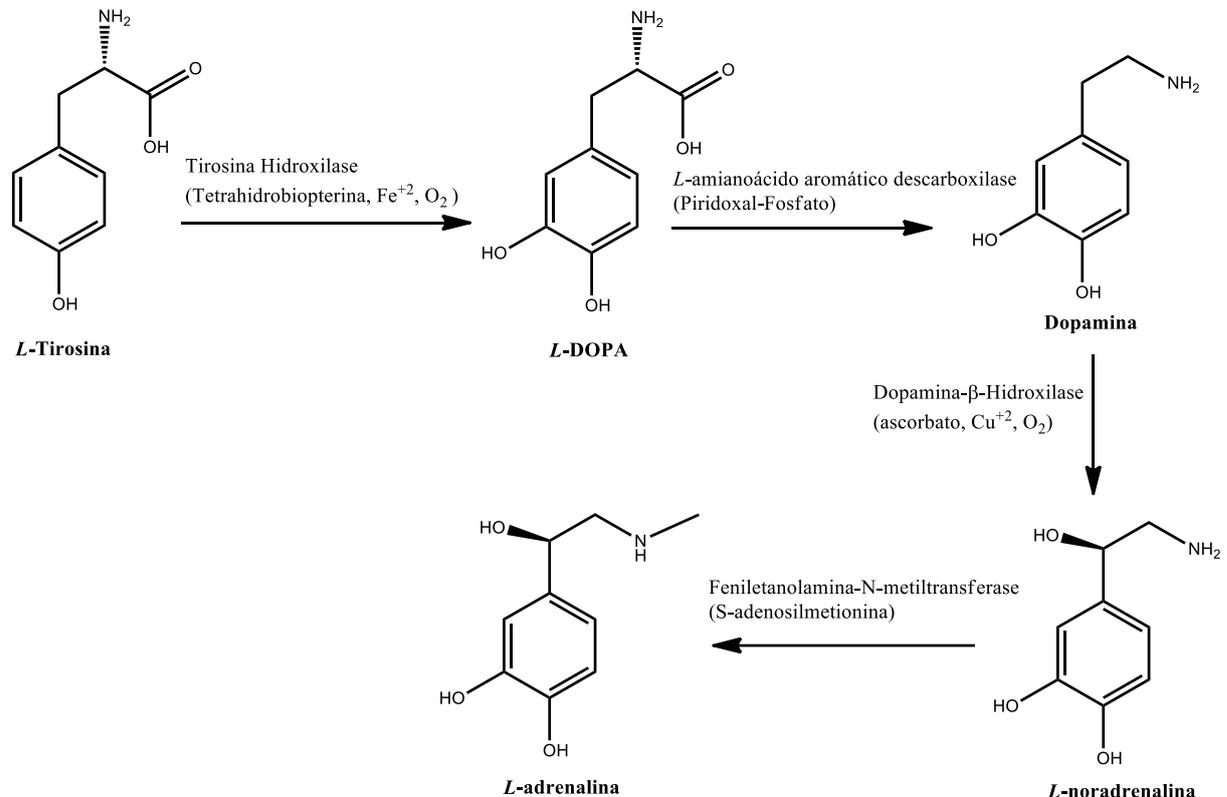
2.8 Catecolaminas

As catecolaminas são neurotransmissores e/ou hormônios presentes no sistema nervoso periférico e central. Elas excitam, inibem ou influenciam a atividade das células. Esta classe de mensageiros químicos é composta por dopamina (DA), noradrenalina (NA, também chamada *nor*-epinefrina) e adrenalina (Adr, também chamada epinefrina). Em termos de biossíntese, todas as catecolaminas são derivadas de um precursor comum, o aminoácido tirosina (Tir) como apresentado na Figura 12 (DAVISON, 1989; PURVES et al., 2001).

A DA atua como um neurotransmissor em várias vias importantes no sistema nervoso central e tem também importante atividade biológica no sistema nervoso periférico. A DA também tem sido associada com o sistema de recompensa, o circuito no cérebro responsável pela motivação para estímulos, bem como as emoções de sentir-se satisfeito e saciado no ambiente. Pensa-se que este sistema é ativado por recompensas naturais, como alimentos, bebidas, sexo e drogas viciantes. Por exemplo, a cocaína e outras drogas agem estimulando a liberação de DA em áreas cerebrais (DAVISON, 1989; PURVES et al., 2001; VENTON; WIGHTMAN, 2003).

A relação entre esses compostos e doenças é reconhecida há mais de 150 anos. Sabe-se que estão envolvidos em vários mecanismos fisiológicos e estão relacionados com algumas das patologias humanas mais prevalentes, tais como distúrbios neurológicos como a doença de Parkinson, a doença de Alzheimer, a esquizofrenia e a hiperatividade (MEDINA et al., 2003).

Figura 12. Biossíntese de catecolaminas



Fonte: Adaptado de KVETNANSKY; SABBAN; PALKOVITS, 2009 .

Muitos pesquisadores estão interessados em quantificar as catecolaminas, uma vez que as mesmas têm o potencial de atuar como biomarcadores clinicamente relevantes para doenças específicas, buscando monitorar a eficácia de tratamentos medicamentosos. Os neurotransmissores estão presentes em vários fluidos biológicos, incluindo soro, plasma, plaquetas, líquido cefalorraquidiano, saliva e urina (MARC et al., 2011). A concentração de dopamina encontrada no cérebro é de 50 nmol g^{-1} e em fluidos extracelulares é de $0,01 - 1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ (RATTANARAT et al., 2012).

A Epinefrina (EP), também conhecida como adrenalina, é secretada pela medula das glândulas suprarrenais. Também é produzida nas extremidades das fibras nervosas simpáticas e serve como um mediador químico para transmitir impulsos nervosos para os órgãos efetores. A EP é principalmente responsável por ativar o sistema simpático associado com o mecanismo de luta ou fuga. Os valores normais de EP em sangue estão na faixa de 20 e 460 pmol L^{-1} (PEASTON; WEINKOVE, 2004).

Diante da importância apresentada das catecolaminas, uma ampla gama de abordagens analíticas, a partir da espectrofotometria (NAGARAJA; VASANTHA; SUNITHA, 2001a, 2001b; SÁNCHEZ-RIVERA et al., 2003), infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) (WANG; JIN; LIN, 2002), Raman (BARRETO; PONZONI; SASSI, 1998), cromatografia (CARRERA et al., 2007; YOSHITAKE et al., 2007, 2004), fluorescência (FOTOPOULOU; IOANNOU, 2002; SECOR; GLASS, 2004), injeção em fluxo (DU; SHEN; LU, 2003) e eletroforese capilar (KARTSOVA et al., 2004), foram relatadas para a detecção e caracterização dos intermediários e/ou produtos oriundos dos processos redox das catecolaminas.

Embora estes métodos possam oferecer uma boa seletividade e baixos limites de detecção, eles muitas vezes requerem etapas complexas de pré-tratamento, além de apresentarem instrumentações caras. Por outro lado, os sensores eletroquímicos proporcionam uma ferramenta analítica barata e facilmente operável para a determinação sensível, rápida e seletiva de catecolaminas. Além disso, estes sensores são capazes de ser incorporados em dispositivos robustos, portáteis ou miniaturizados para aplicações específicas em campos clínicos e de diagnóstico como biomarcadores de várias doenças, como as doenças de Alzheimer e Parkinson, que apresentam relação com estresse oxidativo (FERAPONTOVA, 2017; RIBEIRO et al., 2016).

2.9 Estresse Oxidativo

Em sistemas biológicos, diversos fatores metabólicos e ambientais são responsáveis pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) (Tabela 2). Quando a produção é exacerbada ou quando há uma diminuição significativa na eficácia das defesas contra essas espécies, ocorre o desequilíbrio redox, causando a disfunção da sinalização redox e dos mecanismos de controle, com consequentes danos a macromoléculas biológicas, sendo, alguns deles, irreversíveis (Figura 12) (FREITAS; LIMA; FERNANDES, 2009; RIBEIRO et al., 2013; SIES, 2015) (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

Tabela 2. Espécies oriundas do estresse oxidativo

RADICAIS	NÃO- RADICAIS
Espécies Reativas de oxigênio (ERO)	
<i>Superóxido, O₂^{•-}</i>	Peróxido de Hidrogênio, H ₂ O ₂
<i>Hidroxila, [•]OH</i>	Ácido Hipobromoso, HOBr
<i>Hidroperoxila, HO₂[•]</i>	Ácido Hipocloroso, HOCl
<i>Peroxila, RO₂[•]</i>	Ozônio, O ₃
<i>Alcoxila, RO[•]</i>	Oxigênio singleto (O ₂ ¹)
<i>Carbonato, CO₃^{•-}</i>	Peróxidos orgânicos, ROOH
<i>Dióxido de carbono, CO₂^{•-}</i>	Peroxinitrito, ONOO ⁻
	Ácido Peroxinitroso, ONOOH
Espécies Reativas de Cloro (ERCI)	
<i>Cloro atômico, Cl[•]</i>	Ácido Hipocloroso, HOCl
	Cloreto de nitrila (nitrônio), NO ₂ Cl
	Cloroaminas
	Gás cloro (Cl ₂)
Espécies reativas de Nitrogênio (ERN)	
<i>Óxido nítrico, NO[•]</i>	Ácido nitroso, HNO ₂
<i>Dióxido de nitrogênio, NO₂[•]</i>	Cátion nitrosila, NO ⁺
	Ânion nitroxila, NO ⁻
	Tetróxido de dinitrogênio, N ₂ O ₄
	Trióxido de dinitrogênio, N ₂ O ₃
	Peroxinitrito, ONOO ⁻
	Ácido Peroxinitroso, ONOOH
	Cátion nitrônio (nitrila) , NO ₂ ⁺
	Peroxinitrito de Alquila, ROONO
	Cloreto de nitrila (nitrônio), NO ₂ Cl

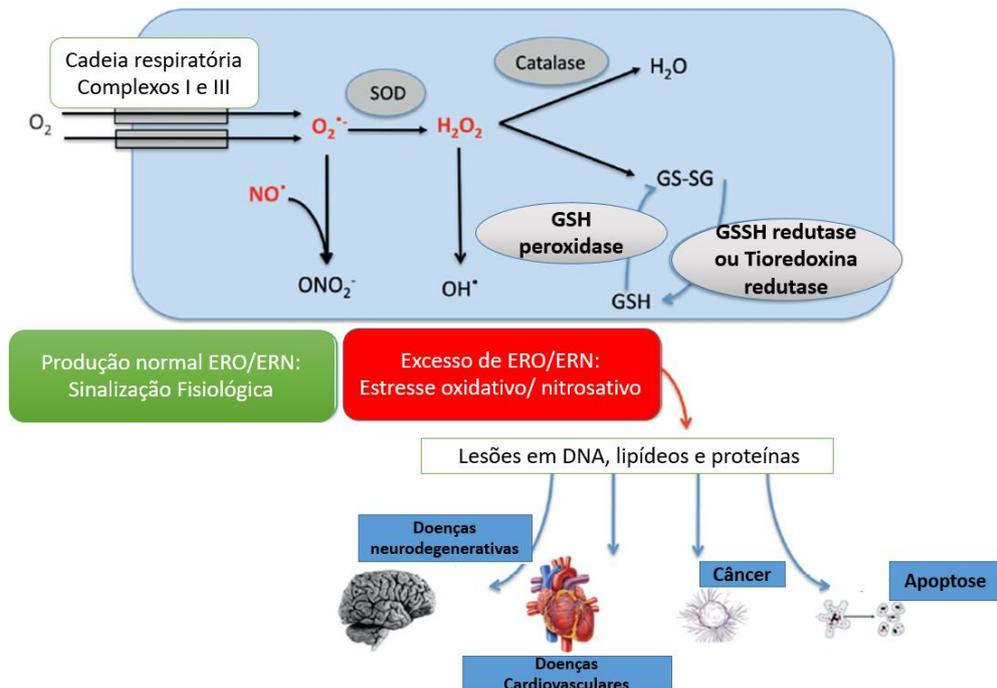
Fonte: Adaptado de HALLIWELL; WHITEMAN, 2004 .

A geração de EROs ocorre, normalmente, nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma. A mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons, é a principal fonte geradora dessas espécies (Figura 13) (GREEN; BRAND; MURPHY, 2004).

A redução do O₂ gera as seguintes espécies: ânion radical superóxido (O₂^{•-}), radical hidroxila (OH[•]) e, ainda, peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Esse processo se dá mediante reações específicas, catalisadas por enzimas e com a participação de íons ferro e de cobre. O H₂O₂ não é uma espécie radicalar, entretanto é uma espécie com

alta reatividade, está relacionada com a geração de $\cdot\text{OH}$ que apresenta ação fortemente deletéria, uma vez que esse se constitui no mais reativo dos radicais livres, pois pode alterar qualquer estrutura celular que se encontre próxima.

Figura 13. Geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) durante a cadeia respiratória mitocondrial e seus efeitos em condições normais e patológicas.



Nota: SOD: Superóxido Dismutase; GSH: Glutaciona reduzida; GSSG: Glutaciona oxidada.

Fonte: Adaptado de CALAS-BLANCHARD; CATANANTE; NOGUER, 2014 .

Diferente das demais espécies radicalares, estudos apontam que H_2O_2 tem vida longa e é capaz de atravessar as membranas celulares, apresentando-se potencialmente tóxico para as células. Esta toxicidade pode ser aumentada em dez mil vezes pela presença de íons ferro (FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, 1997; SCHNEIDER; DE OLIVEIRA, 2004). Além da capacidade do $\text{O}_2^{\cdot-}$ em participar de reações de geração de $\cdot\text{OH}$, pode ainda, por meio da reação com o monóxido de nitrogênio (NO^{\cdot}), gerar a espécie reativa de nitrogênio, peroxinitrito (ONOO^{\cdot}), também potencialmente reativa (GREEN; BRAND; MURPHY, 2004).

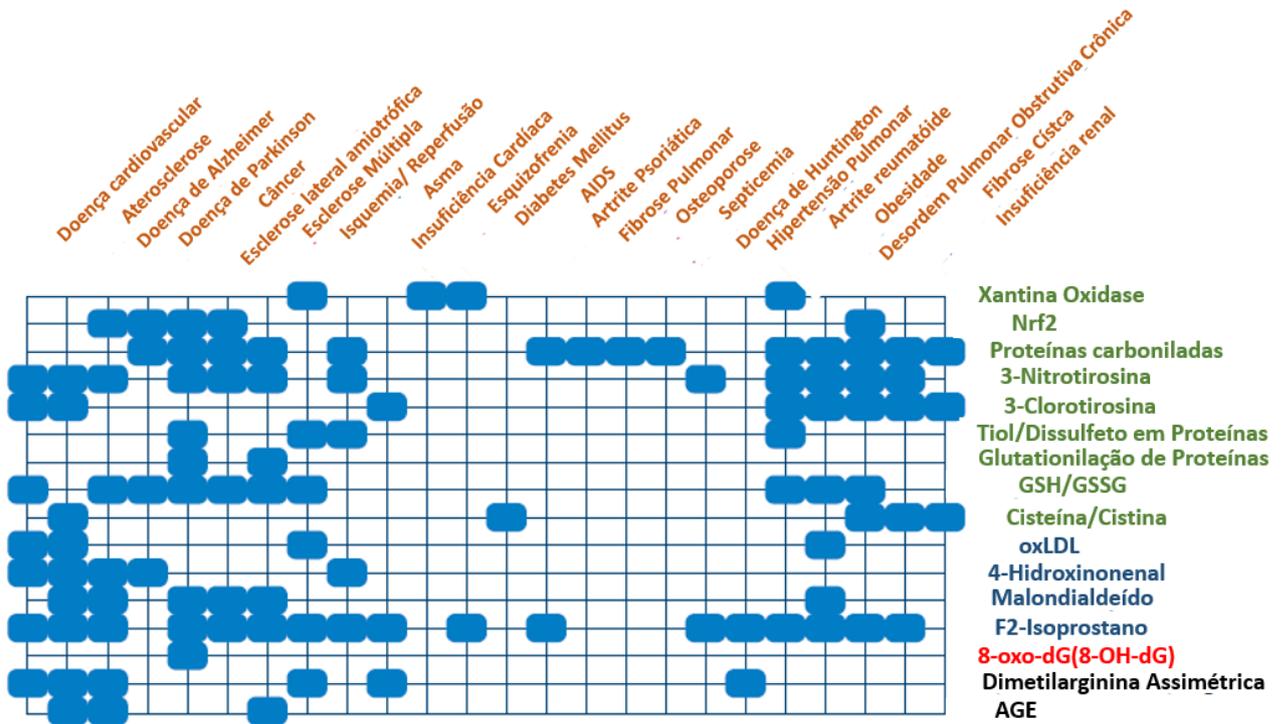
O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria das espécies reativas. Este sistema é dividido em

enzimático e não-enzimático. Tais ações podem ser alcançadas por meio de diferentes mecanismos de ação, entre eles, impedindo a formação de espécies reativas, impedindo a ação destes ou favorecendo o reparo e a reconstituição das estruturas biológicas lesadas (CLARKSON; THOMPSON, 2000; KOURY; DONANGELO, 2003).

O sistema antioxidante não-enzimático é constituído de substâncias antioxidantes, que podem ter origem endógena ou dietética. Os antioxidantes são definidos por Halliwell como qualquer substância que, presente em menores concentrações que as do substrato oxidável, seja capaz de atrasar ou inibir a oxidação deste de maneira eficaz. Tais substâncias podem agir diretamente, neutralizando a ação das espécies reativas, ou indiretamente, participando dos sistemas enzimáticos com tal capacidade (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). O sistema de defesa enzimático inclui as enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx). Essas enzimas agem através dos seguintes mecanismos: prevenção, impedindo e/ou controlando a formação de espécies reativas, envolvidos com a iniciação das reações em cadeia que culminam com propagação e amplificação do processo e, conseqüentemente, com a ocorrência de danos oxidativos (FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, 1997; SCHNEIDER; DE OLIVEIRA, 2004).

Quando a produção de espécies reativas supera a capacidade de ação dos antioxidantes, a oxidação de biomoléculas é favorecida, gerando metabólitos específicos, os biomarcadores do estresse oxidativo, que podem ser identificados e quantificados (Figura 14). Tais marcadores são derivados, sobretudo, da oxidação de lipídeos, proteínas e DNA (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004; MAYNE, 2003; VINCENT; INNES; VINCENT, 2007). Outra forma de avaliar o estresse oxidativo é a que emprega métodos indiretos, baseados na determinação da capacidade antioxidante (BARBOSA et al., 2010; HUANG; BOXIN; PRIOR, 2005). Como apresentado, é de suma importância o desenvolvimento de métodos para quantificar os biomarcadores de estresse oxidativo. No próximo tópico será descrita a relevância relacionada ao desenvolvimento de sensores para determinação de 3-nitro-*L*-tirosina, um biomarcador importante para a determinação de danos oxidativos mediados por peroxinitrito.

Figura 14. Relevância clínica de biomarcadores de estresse oxidativo. Os biomarcadores de proteína (verde), lipídeos (azul) e de DNA (vermelho) foram analisados em várias doenças listadas no topo.



Nota: AGE: Produtos de Glicação avançada; GSH: glutationa reduzida; GSSG: glutationa oxidada; Nrf2: fator nuclear E2 relacionado ao fator 2; oxLDL: lipoproteína oxidada de baixa densidade; 8-oxo-dG: 8-Oxo-2'-deoxyguanosina.

Fonte: Adaptado de SIES; BERNDT; JONES, 2017 .

2.9.1 3-Nitro-L-tirosina

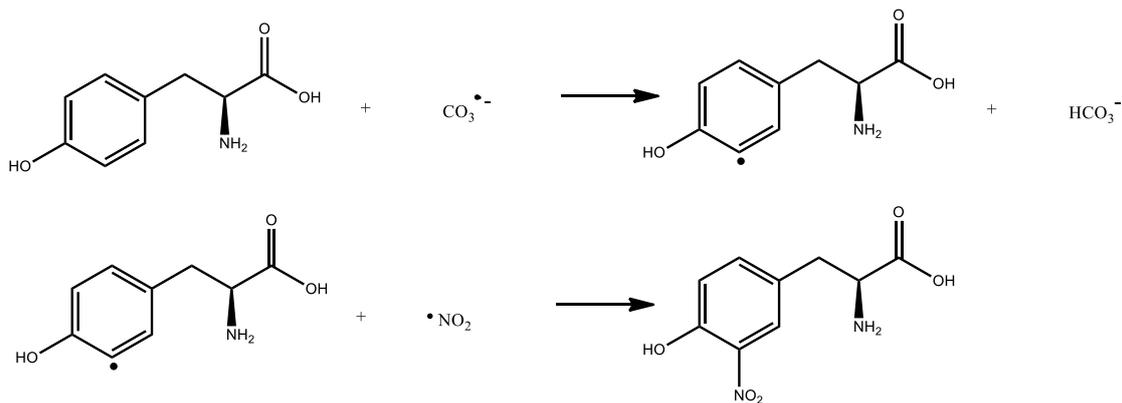
A tirosina (Tir) (4-hidroxifenilalanina) é um aminoácido não-essencial e pertence ao grupo dos aminoácidos aromáticos. A maioria das proteínas encontradas na natureza contêm resíduos de Tir em sua composição (AHSAN, 2013; RADU, 2013).

A Tir é moderadamente hidrofílica, o que pode ser explicado pelo seu anel aromático hidrofóbico ligado ao grupo hidroxila (BARTESAGHI et al., 2007; TSIKAS, 2012) . Como resultado, a Tir é frequentemente exposta na superfície de proteínas, permitindo modificações por nitração. A nitração de resíduos de Tir em proteínas está associada ao estresse nitro-oxidativo, resultando na formação de 3-nitrotirosina (3-NT) ou outros resíduos de Tir-nitrados, em proteínas (AHSAN, 2013; TSIKAS, 2012).

Quando ERNs reagem com *L*-tirosina e proteínas associadas, a 3-nitro-*L*-tirosina livre (3-NT) e a 3-nitro-*L*-tirosina associada a proteínas são formadas (TSIKAS; CAIDAHL, 2005). A 3-NT [ácido (2-amino-3-(4-hidroxi-3-nitrofenil)propanóico)] é o resultado da modificação pós-translacional em proteínas ocasionados por ERN (espécies reativas de nitrogênio) como óxido nítrico (NO), derivados oxidantes (por exemplo, peroxinitrito (ONOO⁻) e ácido peroxinitroso (ONOOH) e dióxido de nitrogênio

A formação de 3-NT ocorre após a substituição de um hidrogênio por um grupo nitro (NO₂) na posição *orto* do anel fenólico, em resíduos de tirosina (Figura 15) (AHSAN, 2013; RADI, 2013; TSIKAS, 2012).

Figura 15. Mecanismo de formação da 3-nitro-*L*-Tirosina



Fonte: Adaptado de TEIXEIRA et al., 2016 .

O peroxinitrito é uma ERN bastante instável, e sua decomposição pode conduzir à formação de 3-NT, por reação com resíduos de tirosina livres ou ligados a proteínas. A 3-NT tem sido correlacionada como biomarcador para a determinação de danos oxidativos mediados por peroxinitrito (CONVENTZ et al., 2007; DALLE-DONNE et al., 2006; DUNCAN, 2003; HALLIWELL, 1997), sendo passível de avaliação e mensuração, como indicadores de processos biológicos normais, processos patogênicos ou de resposta farmacológica (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

Mergola e colaboradores relacionam níveis elevados de 3-NT com algumas doenças, tais como: doença arterial coronariana (DAC), inflamação do miocárdio, insuficiência cardíaca e aterosclerose. (MERGOLA et al., 2013).

As principais técnicas utilizadas para detecção e quantificação de 3-NT são cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/MS), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e ELISA (imunoensaio enzimático) em tecidos e fluidos biológicos, incluindo o plasma, soro, urina, amostras de tecidos e outras amostras biológicas.

Diante do exposto neste levantamento bibliográfico, os resultados apresentados, nesse trabalho, foram divididos em três partes para uma maior compreensão, na parte 1 foram descritos os estudos eletroquímicos da 3-NT em meio prático, além do desenvolvimento de um sensor baseado em nanotubos de carbono para quantificação e detecção da 3-NT com metodologias adaptadas de Costa (2016).

Na parte 2, relata-se a construção de um sensor eletroquímico à base de NTC e polímero de ácido ferúlico para determinação de dopamina, e na parte 3 são apresentados resultados relativos ao desenvolvimento de sensor eletroquímico baseado em NTC e polímero de capsaicina para determinação de dopamina e epinefrina.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Este trabalho visa o desenvolvimento de diferentes plataformas nanoestruturadas baseadas em nanotubos de carbono e polímeros derivados de ácido ferúlico (AF) e capsaïcina (CAP) para determinação e quantificação de dopamina e epinefrina, além de sensor baseado em nanotubos de carbono para determinação e quantificação de 3-nitro-*L*-tirosina (3-NT).

3.2 Específicos

- Realizar o estudo eletroquímico da 3-NT, utilizando técnicas tais como voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial, em meio aquoso, em diferentes valores de pH;
- Construir o sensor baseado em nanotubos de carbono para determinação e quantificação de 3-NT;
- Determinar os parâmetros analíticos tais como: limite de detecção, sensibilidade e faixa linear de resposta para a detecção e quantificação de 3-NT;
- Investigar o comportamento eletroquímico de AF e CAP em diferentes valores de pH;
- Preparar e investigar o comportamento eletroquímico das plataformas ECV/MWCNT/poli-AF e ECV/MWCNT/poli-CAP na ausência e presença dos analitos;
- Verificar a estabilidade e repetibilidade das medidas e no preparo dos sensores;
- Estudar o comportamento eletrocatalítico das plataformas nanoestruturadas na detecção de DA e EP;
- Investigar os mecanismos das reações eletroquímicas;

- Calcular os parâmetros cinéticos das reações;
- Determinar os parâmetros analíticos tais como: limite de detecção, quantificação, sensibilidade e faixa linear de resposta das plataformas nanoestruturadas para determinação e quantificação de DA e EP;
- Estudo de recuperação em amostras farmacêuticas para DA e EP;
- Realizar estudo de interferentes dos analitos presentes neste trabalho.

4 EXPERIMENTAL

4.1 Reagentes

Os seguintes reagentes de grau analítico foram adquiridos de seus respectivos fornecedores e utilizados sem tratamento prévio (Tabela 3).

Tabela 3: Reagentes utilizados e seus respectivos fornecedores.

Reagentes	Fornecedor
3-nitro- <i>L</i> -tirosina (3-NT)	Sigma-Aldrich
Ácido Ascórbico (AA)	Sigma-Aldrich
Ácido clorídrico	Vetec
Ácido Ferúlico (AF)	Sigma-Aldrich
Ácido nítrico (HNO ₃)	Vetec
Ácido úrico (AU)	Sigma-Aldrich
Capsaicina (CAP)	Sigma-Aldrich
Dopamina (DA)	Sigma-Aldrich
Epinefrina (EP)	Sigma-Aldrich
Etanol	Sigma-Aldrich
Fosfato de sódio dibásico diidratado (Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O)	Sigma-Aldrich
Fosfato de sódio monobásico monoidratado (NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O)	Sigma-Aldrich
Hidróxido de Sódio	Vetec
NADH	Sigma-Aldrich
Serotonina (SER)	Sigma-Aldrich

Fonte: Autor desta tese, 2017.

Nanotubos de carbono de paredes múltiplas (do inglês *multi-walled carbon nanotubes*, MWCNT) código 698849 (D.E.x C 6-13 nm x 2,5-20 µm) obtidos da Sigma-Aldrich , passaram por tratamento prévio com ácido nítrico (HNO₃), como descrito na metodologia.

As soluções foram preparadas usando água deionizada obtida através de um sistema Milli-Q Millipore e os valores de pH das soluções tampão foram ajustadas com um pHmetro modelo Quimis Q400A.

4.1.1 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, adicionaram-se 20 mL de ácido nítrico concentrado. Deixou-se o sistema em aquecimento entre 140-150 °C, sob refluxo durante 4 horas. Após o aquecimento, a amostra foi resfriada até a temperatura ambiente e filtrada a vácuo através de uma membrana PTFE hidrofílica de 0,2 µm (Omnipore, Millipore) para recolher os nanotubos de carbono. Os NTCs foram então lavados com água deionizada até se obter uma solução com valor de pH 7,0 (ROSCA et al., 2005). Os nanotubos de carbono foram caracterizados por espectroscopia RAMAN (apresentados em anexos).

4.2 Equipamentos e materiais

As micrografias foram obtidas utilizando um microscópio eletrônico de varredura (MEV) Shimadzu VEGA3 com detectores de elétrons secundários (SE) e retroespalhados (BSE). O eletrodo foi metalizado com ouro utilizando um sistema de revestimento (Quorum Technologies LTD, shford, modelo Q150R).

As análises eletroquímicas foram realizadas em potenciostato modelo PGSTAT30 da AUTOLAB, interfaceado a um microcomputador (software GPES 4,9). Além disso, os estudos amperométricos para obtenção da curva analítica foi empregado um eletrodo de disco rotatório (EDR) da Metrohm, com uma velocidade de rotação otimizada (100 rpm).

Uma célula eletroquímica com três eletrodos foi usada, sendo o eletrodo de referência Ag/AgCl (KCl saturado), fio de platina como eletrodo auxiliar e eletrodo de carbono vítreo (Metrohm $\varnothing = 3,0$ mm) para as análises envolvendo AF e CAP com a superfície modificada ou não como eletrodo de trabalho, nos estudos envolvendo 3-NT foram utilizados diferentes eletrodos de trabalho, foram eles: eletrodo de carbono vítreo da Basi $\varnothing = 3,0$ mm, e eletrodo impresso da Dropsens (ref. 110).

As medidas foram realizadas em meio prático usando 5,0 mL de soluções tampão com diferentes valores de pH. As soluções tampão utilizadas foram as seguintes: Tampão acetato pH 4,5 ($c = 0,075$ mol L⁻¹ e força iônica 0,029 mol L⁻¹) e tampão fosfato com os seguintes valores de pH 7,4 e 10 ($c = 0,1$ mol L⁻¹ e força iônica 0,20 mol L⁻¹). A eliminação de oxigênio dissolvido foi feita pelo borbulhamento de um fluxo de nitrogênio (N_{2(g)}) nas soluções, durante 10 minutos antes das análises.

4.3 Limpeza do eletrodo de carbono vítreo (ECV)

O ECV de diâmetro 3 mm foi polido com alumina (0,3 μ m), lavado com água deionizada, levado ao ultrassom por 1 min, em etanol e lavado com água novamente. A limpeza do eletrodo foi verificada por voltametria cíclica, utilizando K₃[Fe(CN)₆] e K₄[Fe(CN)₆] 1 mmol L⁻¹, em KCl 0,1 mol L⁻¹, sistema bem reversível em potenciais adequados. Em seguida, o ECV foi lavado com água e secado à temperatura ambiente.

4.4 Preparação das soluções estoque de 3-NT

Solução de 3-NT: foram pesados 0,565 mg da 3-NT e adicionados 250 μ L de tampão fosfato pH 7,4 ($c = 10$ mmol L⁻¹).

Solução de CAP: foram pesados 0,76 mg e adicionados 250 μ L de etanol (PA) para melhor solubilização, antes das polymerizações como solução estoque ($c = 10$ mmol L⁻¹).

Solução de AF: foram pesados 0,485 mg de ácido ferúlico e adicionados 250 μ L de tampão fosfato pH 7,0, preparando assim a solução estoque para análises eletroquímicas ($c = 10$ mmol L⁻¹).

As demais soluções dos analitos presentes neste trabalho foram preparadas para obter soluções estoque com concentração 10 mmol L^{-1} . Utilizando a solução estoque, por diluição, os volumes foram calculados para as correspondentes concentrações para o volume de 5 mL da célula eletroquímica. Estas soluções foram preparadas antes das análises e utilizadas no mesmo dia.

4.5 Preparação da plataforma ECV/MWCNT

4.5.1 Preparação da dispersão de MWCNT

Em um eppendorf, foi pesado 1 mg de MWCNT (obtido do tratamento com ácido nítrico) e adicionado 1,0 mL de DMF. Esta mistura ficou sob agitação no ultrassom por 2 h para uma melhor dispersão.

4.5.2 Modificação do eletrodo de carbono vítreo com MWCNT

Uma alíquota de $5,0 \mu\text{L}$ desta dispersão foi adicionada à superfície do eletrodo, em 5 frações sucessivas de $1,0 \mu\text{L}$. Em cada adição, o DMF foi lentamente evaporado em estufa a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 minutos para só então serem adicionadas as próximas frações, esta etapa é comum aos demais eletrodos modificados com MWCNT presente neste trabalho.

4.5.3 Análise de 3-NT com ECV/MWCNT

Após o resfriamento da plataforma nanoestruturada ECV/MWCNT, o eletrodo modificado foi imerso em uma solução tampão fosfato pH 7,4, para sucessivas adições de alíquotas da solução estoque de 3-NT para análise em Voltametria de Pulso Diferencial com os seguintes parâmetros: velocidade de varredura $0,010 \text{ V s}^{-1}$, modulação de amplitude 50 mV, tempo de modulação 0,05 s e intervalo de tempo 1 s para construção de curvas analíticas com varreduras em sentidos anódico e catódico.

4.6 Modificação do eletrodo de carbono vítreo com MWCNT e AF

Após a modificação do eletrodo de carbono vítreo com MWCNT, este foi imerso em uma solução de ácido ferúlico com concentração de 0,4 mmol L⁻¹ e realizadas 10 ciclagens na faixa de - 0,25 a +0,75 V vs. Ag/AgCl no sentido anódico em 5,0 mL de tampão fosfato pH = 4,5, em velocidade de 0,020 V s⁻¹ para geração da espécie eletroativa por eletropolimerização.

Após esse procedimento, o eletrodo foi removido da solução, lavado com água deionizada e colocado em uma nova solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0 para análises na ausência e presença de DA.

4.7 Modificação do eletrodo de carbono vítreo com MWCNT e CAP

A plataforma nanoestruturada ECV/MWCNT foi imersa em uma solução de capsaicina, com concentração de 0,8 mmol L⁻¹ e realizadas 20 ciclagens na faixa de - 0,5 a 1,0 V versus Ag/AgCl no sentido anódico em 5,0 mL de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH = 5,5, em velocidade de 0,050 V s⁻¹.

Após esta etapa, o eletrodo foi removido da solução, lavado com água deionizada e colocado em uma nova solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0 para análises na ausência e presença de DA e EP.

4.8 Determinação da área ativa dos eletrodos quimicamente modificados (EQM's)

A áreas ativa de ECV/MWCNT/poli-AF e ECV/MWCNT/poli-CAP, foram calculadas, com a utilização da sonda eletroquímica ferricianeto de potássio e a equação de Randles-Sevcik (Equação 1):

$$I_p = (2,69 \times 10^5) n^{2/3} A D^{1/2} \nu^{1/2} C_o \quad (\text{Equação 1})$$

Sendo D e C_o o coeficiente de difusão e a concentração do ferricianeto de potássio no seio da solução, respectivamente. Experimentos de voltametria cíclica em diferentes velocidades de varredura foram realizados no ECV/MWCNT/poli-AF, em

uma solução de 1 mmol L^{-1} de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ e $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A partir das inclinações de i_p vs. $v^{1/2}$ e utilizando $D = 7,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $n = 1$, a área ativa foi então obtida, a qual apresentou um valor de $0,110 \text{ cm}^2$ e $0,147 \text{ cm}^2$ para ECV/MWCNT/poli-AF e ECV/MWCNT/poli-CAP, respectivamente (SANTHIAGO et al., 2009; SILVA et al., 2011).

4.9 Análise de amostras farmacêuticas e testes de interferência

Os sensores propostos foram utilizados diretamente para determinar a concentração de DA e EP em amostras farmacêuticas com concentração padrão de 5 mg mL^{-1} e 1 mg mL^{-1} para o cloridrato de dopamina e epinefrina, respectivamente, da Hipolabor Farmacêutica, Minas Gerais, Brasil.

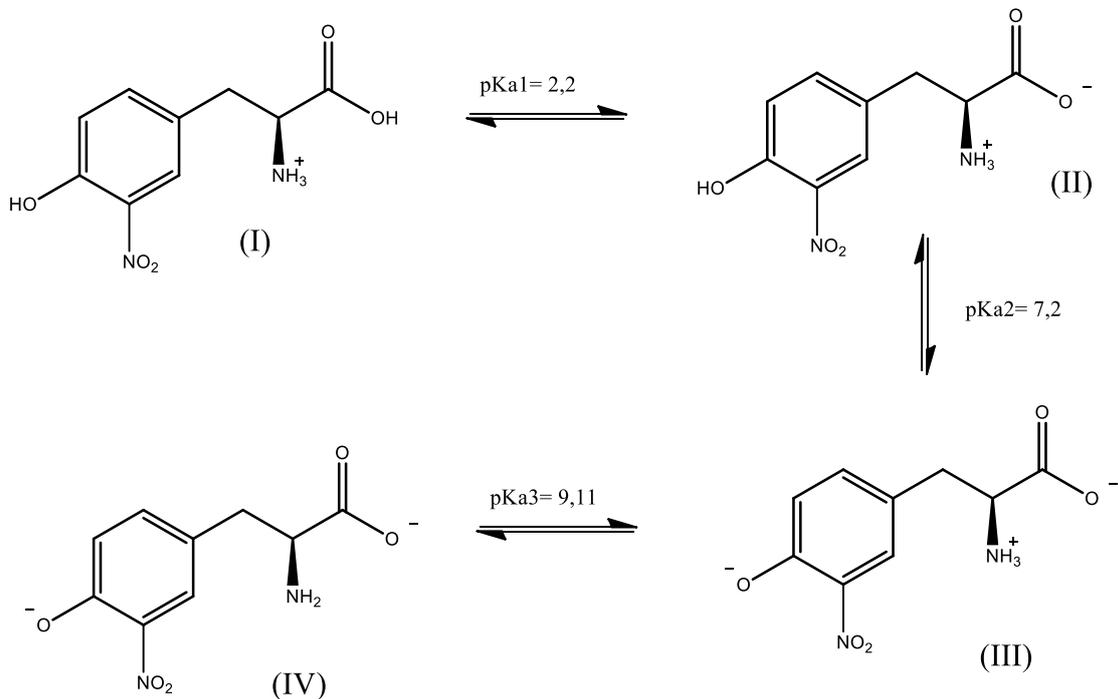
Inicialmente, as amostras farmacêuticas foram diluídas em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). Em seguida, foram adicionados DA e EP da solução estoque em suas respectivas amostras para avaliar recuperação. O estudo de interferentes foi realizado com vários analitos (AA, AU, NADH e SER) todos em uma mesma concentração ($200 \mu\text{mol L}^{-1}$) e a variação da corrente foi medida por cronoamperometria, aplicando-se o potencial de $+0,200 \text{ V vs. Ag/AgCl/Cl}^-$ para adições sucessivas de cada analito, em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO (PARTE 1)

5.1 Estudos eletroquímicos da 3-NT em meio prótico

Os estudos eletroquímicos da 3-NT, em meio prótico, foram realizados em tampões fosfato e acetato com a utilização das técnicas de voltametrias cíclica e de pulso diferencial para avaliar o comportamento em diferentes valores de pH. A Figura 16 apresenta o processo de dissociação de 3-NT e os respectivos valores de $pK_{a1}=2,20$ referente à desprotonação do grupo carboxila, $pK_{a2}=7,2$ da hidroxila fenólica e $pK_{a3}=9,11$ do cátion amônio para gerar as bases conjugadas. Esses dados são de alta relevância, uma vez que o comportamento eletroquímico da substância é dependente do pH do meio, com espécies diferentes sendo geradas, de acordo com o pH (Figura 16).

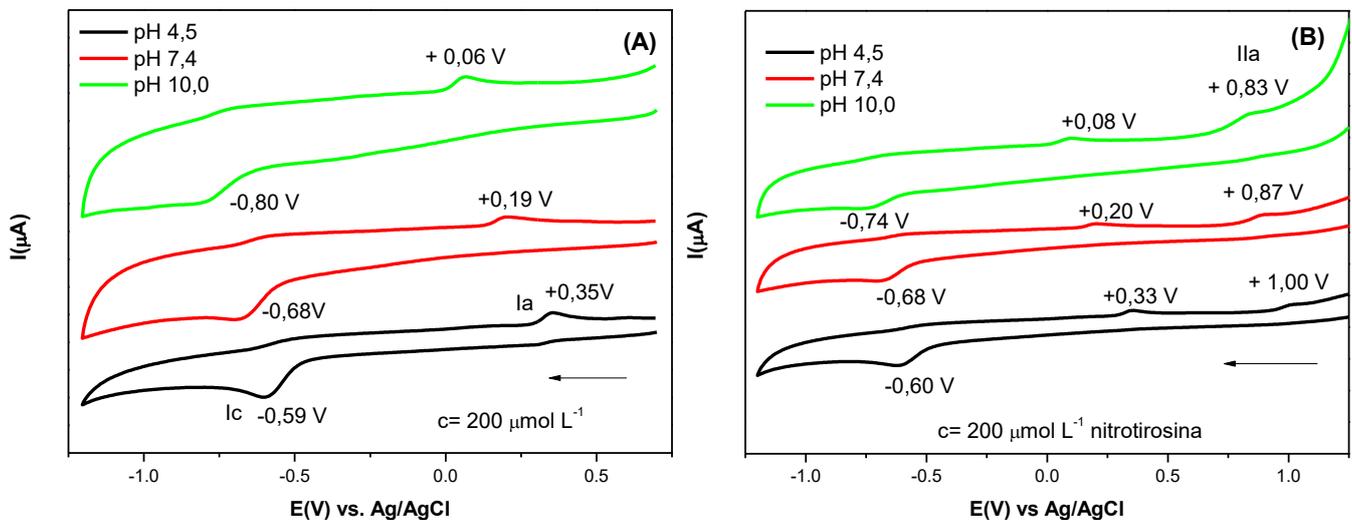
Figura 16. Equações relativas à dissociação de 3-NT e respectivos valores de pK_{a1} , pK_{a2} e pK_{a3}



Fonte: Adaptado de COSTA, 2016.

A Figura 17 apresenta os voltamogramas cíclicos de 3-NT, em diferentes valores de pH, com $E_i = 0$, na direção catódica. O experimento mostrado na Figura 16A foi obtido, com varredura entre +0,70 V e -1,20 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, $E_{plc} = -0,59$ V (pH 4,5), $E_{plc} = -0,68$ V (pH 7,4) e $E_{plc} = -0,80$ 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 (ANDRES; ECKMANN; SMITH, 2013; SQUELLA; BOLLO; NUNEZ-VERGARA, 2005).

Figura 17. VC de 3-NT ($c = 200 \mu\text{mol L}^{-1}$), em tampão acetato 0,10 mol L^{-1} pH 4,5, tampão fosfato pH 7,4 e 10,0, ECV, $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. (A) Faixa de potencial + 0,70 V a -1,2 V; (B) Faixa de potencial + 1,25 V a -1,2 V.



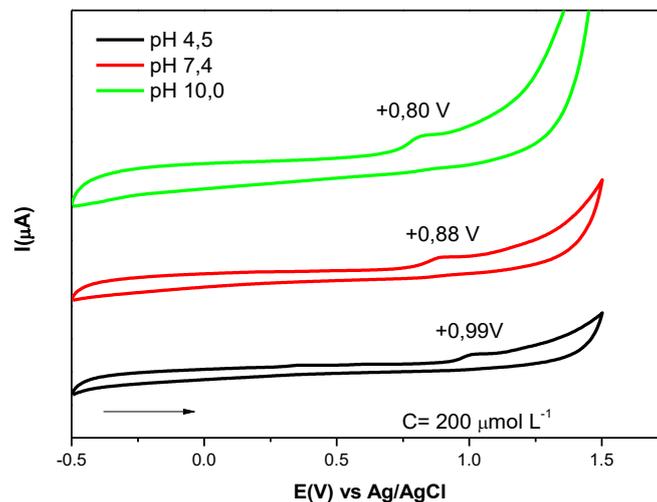
Fonte: Autor desta tese, 2017.

Observa-se um pico anódico irreversível (I_a) em $E_{pa} = +0,35$ V (pH 4,5), $E_{pa} = +0,19$ V (pH 7,4) e $E_{pa} = +0,06$ V (pH 10,0), que corresponde à oxidação da hidroxilamina eletrogerada, durante o processo de redução. O pico II_a em $E_{pa} = +1,00$ V, $+0,87$ V e $+0,83$ V para os valores de pH 4,5; 7,4 e 10,0, respectivamente (Figura 17B), 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 devido a desprotonação deste grupo.

Na Figura 18, observa-se a presença de uma única onda anódica referente à oxidação da hidroxila fenólica, não sendo possível evidenciar a presença de outros grupos susceptíveis à oxidação, uma vez que não houve redução do grupo nitro como apresentado nas figuras anteriores (Figura 18).

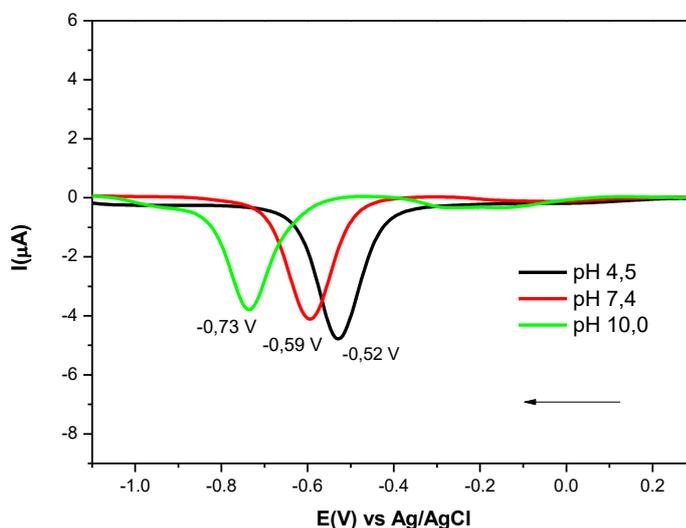
Figura 18. VC de 3-NT ($c = 200 \mu\text{mol L}^{-1}$), em tampão acetato, pH 4,5, tampão fosfato pH 7,4 e 10,0, $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$, ECV.



Fonte: Autor desta tese, 2017.

A voltametria de pulso diferencial foi utilizada para avaliar a redução da 3-NT, em diferentes valores de pH. Na Figura 19, observa-se a onda I_c referente à redução do grupo nitro, presente na voltametria cíclica, sofre deslocamento para valores mais negativos com o aumento do pH, indicando que o processo de redução é dificultado (ABREU; GOULART; BRETT, 2002).

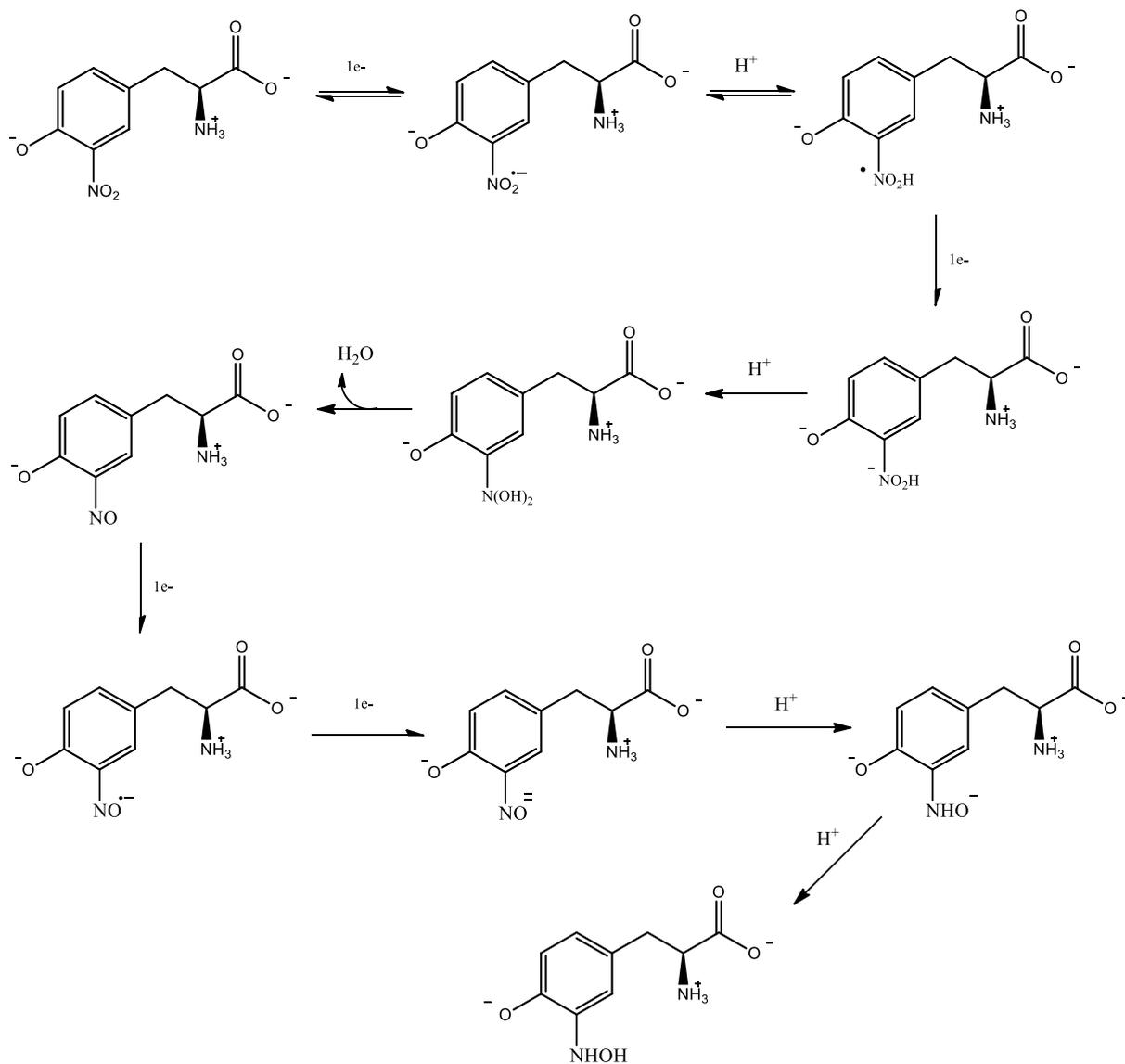
Figura 19. VPD de 3-NT ($c = 200 \mu\text{mol L}^{-1}$), em tampão acetato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5, tampão fosfato pH 7,4 e 10,0, $v = 0,005 \text{ V s}^{-1}$, ECV.



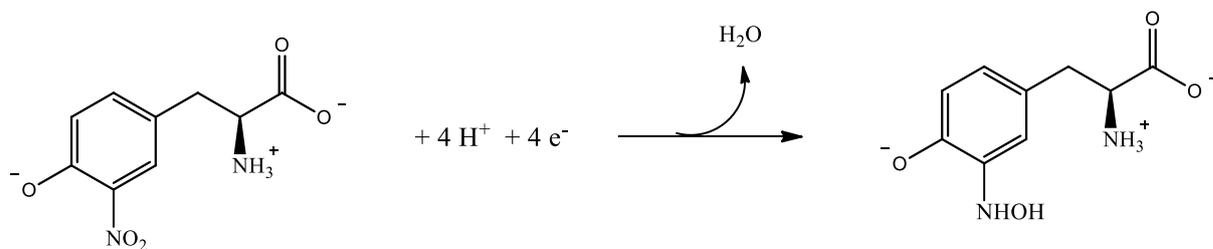
Fonte: Autor desta tese, 2017.

A racionalização mecanística para a redução da 3-NT em meio aquoso pH 7,4 pode ser resumida na Figura 20, ressaltando que as espécies que podem estar presentes nesse valor de pH são as espécies II e III (Figura 16), e foi selecionado a espécie III para o mecanismo devido à maior quantidade desta espécie, o mecanismo envolve processos eletroquímico-químico-eletroquímico (ECE), com transferências de elétrons, protonações e desidratação.

Figura 20. Racionalização mecânica da redução eletroquímica da 3-NT em pH 7,4.



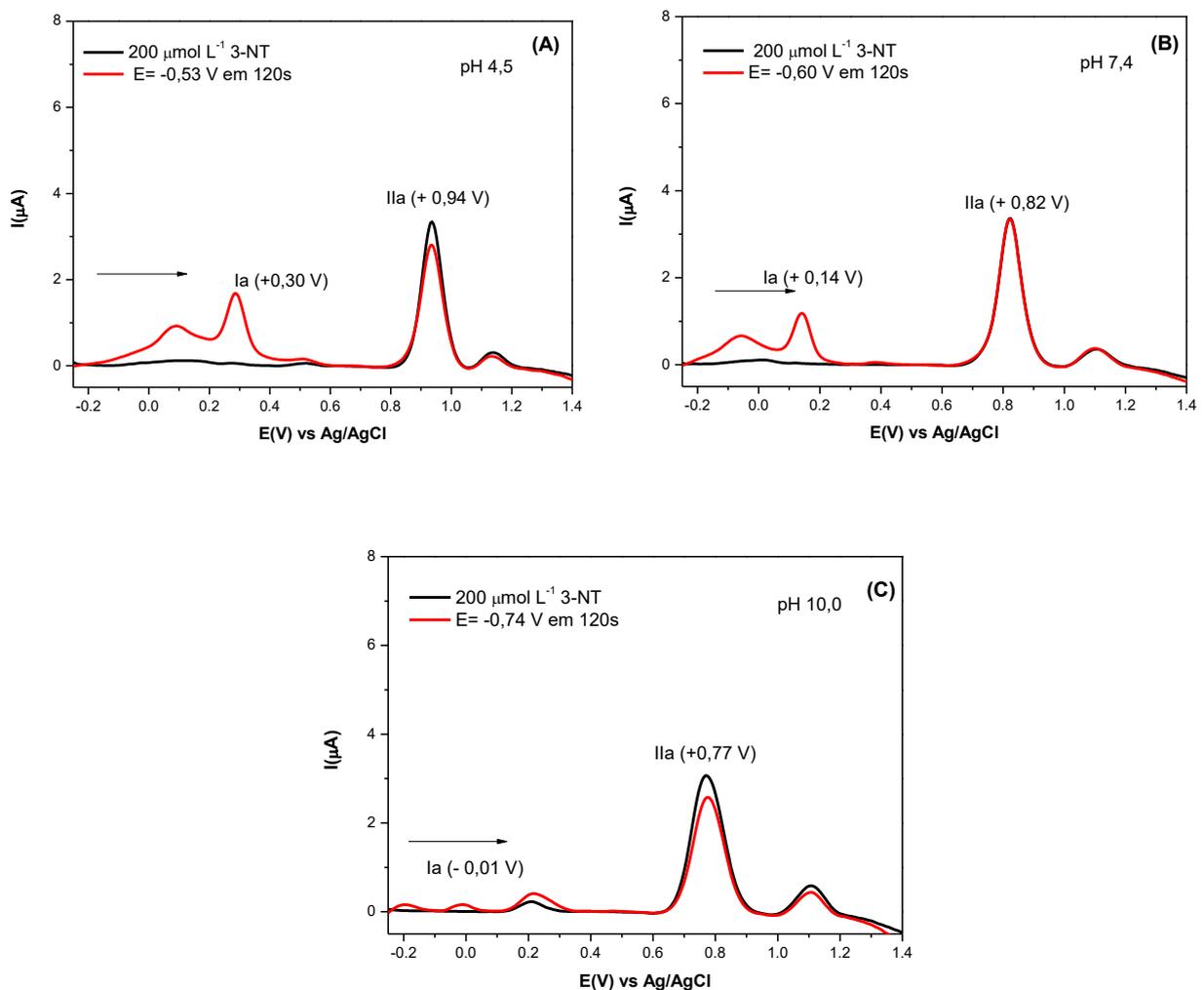
Esse mecanismo pode ser resumido em:



Fonte: Autor desta tese, 2017.

A Figura 21, apresenta varreduras iniciais no sentido anódico sem a aplicação do potencial de redução do nitro, onde foi possível observar apenas uma onda de oxidação 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 ($E_p = -0,53$ V, $E_p = -0,60$ V e $E_p = -0,74$ 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 (0,30 V, 0,14 V e -0,01 V) referente à formação e oxidação da hidroxilamina, e que este se desloca para potenciais menos positivos, à medida que o valor do pH do meio aumenta.

Figura 21. VPD de 3-NT ($c = 200 \mu\text{mol L}^{-1}$), (A) tampão acetato pH 4,5; (B) tampão fosfato pH 7,4 e (C) 10,0, ECV, $v = 0,005 \text{ V s}^{-1}$.



Fonte: Autor desta tese, 2017.

5.6 Desenvolvimento de sensor eletroquímico para determinação de 3-NT

Diante dos resultados obtidos em meio prático, podemos relacionar o comportamento eletroativo da 3-NT com o grupo nitro e a hidroxila fenólica. Com a presença destes grupos eletroativos podemos trabalhar com o desenvolvimento de sensor eletroquímico para 3-NT.

Há na literatura, somente um sensor impresso com detecção eletroquímica deste composto, utilizando nanopartículas de Fe e Pd (ROY et al., 2015).

Conforme já relatado, devemos ressaltar a alta relevância biológica de 3-NT e sua correlação com uma série de doenças, tais como: aterosclerose, Parkinson, insuficiência cardíaca. Faz-se necessário o desenvolvimento de sensores que apresentem alta sensibilidade, estabilidade e especificidade para este analito.

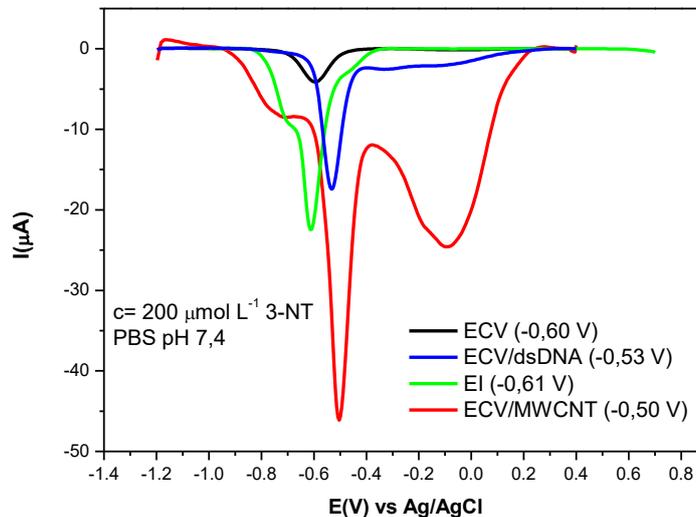
Com o intuito de desenvolver um sensor eletroquímico eficaz para determinação de 3-NT, avaliaram-se várias plataformas:

- a) ECV (eletrodo de carbono vítreo),
- b) ECV/dsDNA,
- c) EI (eletrodo impresso)
- d) ECV/MWCNT.

A análise da Figura 22 permite observar que a plataforma ECV/MWCNT apresenta maior sensibilidade e especificidade para determinação de 3-NT, quando comparada às demais, devido à maior corrente faradaica e potencial menos negativo associado à redução do 3-NT.

Este comportamento é proveniente da alta área eletroativa adquirida ao modificar o eletrodo de carbono vítreo com MWCNTs funcionalizados em meio ácido que leva à formação de grupos carboxila e carbonila, resultando em maiores correntes e alta seletividade com alteração do potencial redox. Desta forma esta plataforma foi selecionada para determinação e quantificação de 3-NT, nos estudos posteriores.

Figura 22. VPD para avaliação de diferentes plataformas na determinação de 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 3-NT em 0,1 mol L^{-1} tampão fosfato pH 7,4, $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

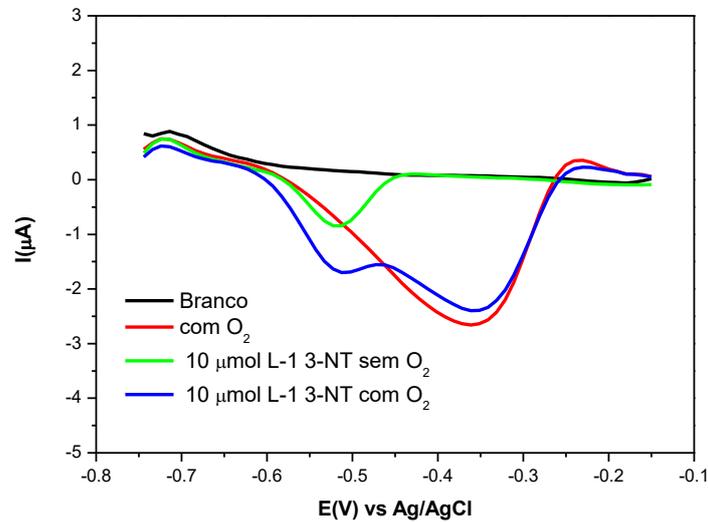


Fonte: Autor desta tese, 2017.

Um ensaio necessário foi avaliar a interferência de O_2 na determinação de 3-NT, pois este é capaz de se dissolver em soluções aquosas e interferir nas análises. Em soluções não-tampoadas, os produtos oriundos da redução do oxigênio podem ocasionar mudanças no pH da solução, resultando em precipitação de substâncias eletroativas, deslocamento dos potenciais de redução, aumento de corrente residual que levam ao mascaramento da corrente produzida pela espécie eletroativa de interesse. Diante disso é necessário avaliar o comportamento de O_2 frente a 3-NT e plataforma ECV/NTC.

A análise da Figura 23, permite verificar que, ao introduzir O_2 na solução, há aumento na corrente relacionada com a redução de 3-NT e um pequeno deslocamento para potenciais menos negativos, resultando em mascaramento da corrente e potencial relacionados a redução de 3-NT, sendo, portanto, de extrema importância o processo de desaeração anterior às análises.

Figura 23. VPD relacionados à avaliação do efeito da adição de O_2 em solução de 3-NT, em tampão fosfato, pH 7,4, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$

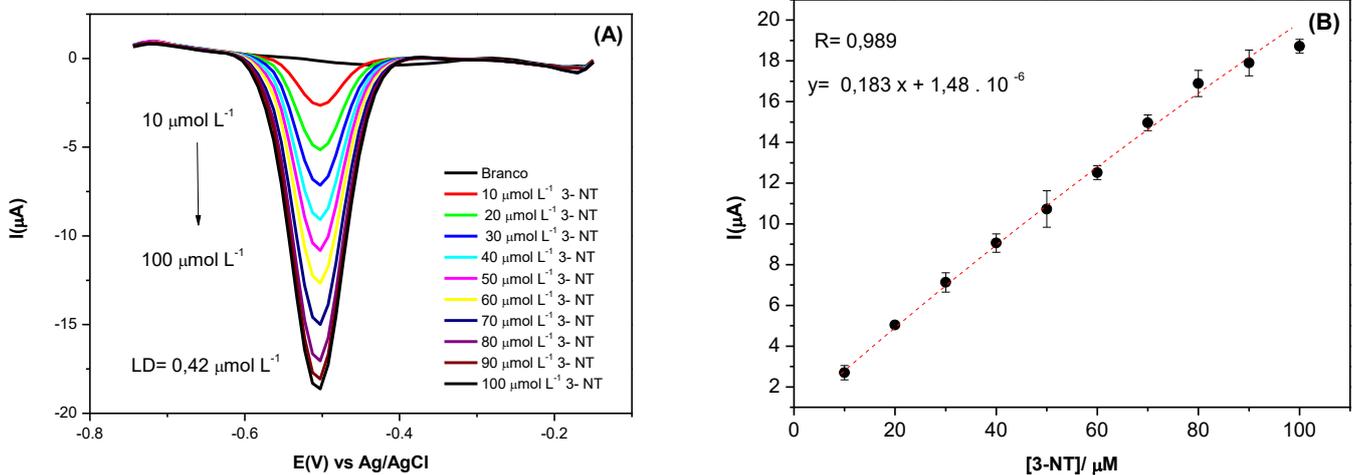


Fonte: Autor desta tese, 2017.

5.2 Determinação da curva analítica

Com o objetivo de obter uma curva analítica para 3-NT, foram utilizadas diferentes concentrações do analito, em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4), na redução e oxidação, utilizando a plataforma ECV/MWCNT. Na redução, foi considerada a corrente relacionada à redução do grupo nitro ($-0,50 \text{ V}$), em diferentes concentrações de 3-NT (Figura 24A). Nessas condições, o sensor voltamétrico apresentou uma faixa linear de resposta de 10 a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ com um coeficiente de correlação de $0,989$ para $n=10$ (Figura 24B), em presença de 3-NT. Os limites de detecção e quantificação encontrados foram $0,42 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $1,38 \mu\text{mol L}^{-1}$, 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).

Figura 24. (A) Voltametrias de pulso diferencial relacionadas à redução do grupo nitro, em diferentes concentrações de 3-NT, em ECV/MWCNT, tampão fosfato pH 7,4, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$; (B) Curva analítica para determinação de 3-NT na redução.

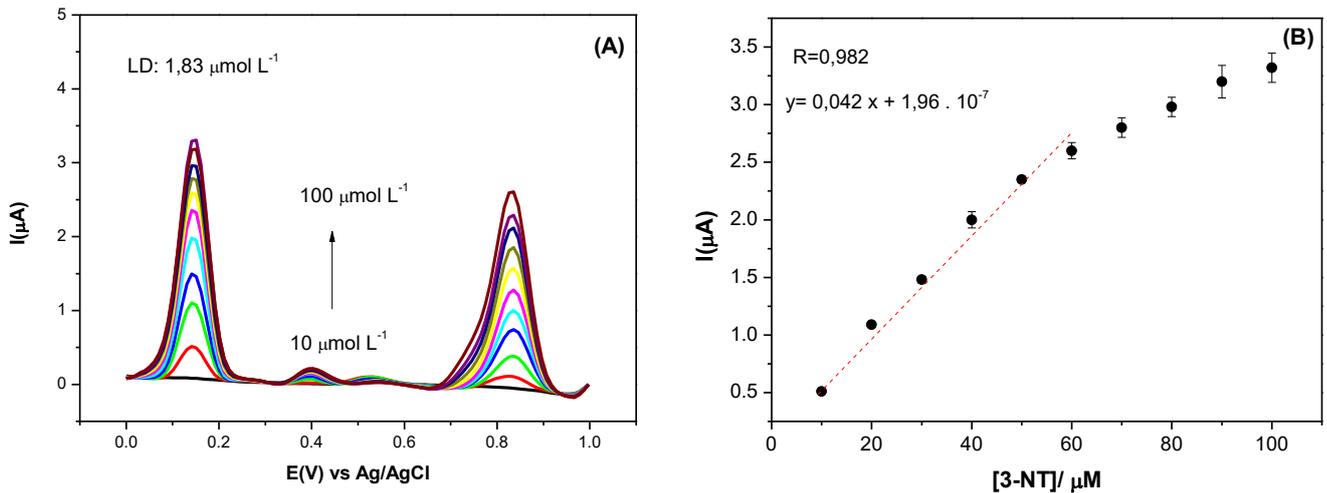


Fonte: Autor desta tese, 2017.

Na oxidação, foi considerada a corrente relacionada à oxidação da hidroxilamina eletrogerada (+0,14 V) a partir da redução do grupo nitro, após condicionamento ($E_p = -0,60 \text{ V}$) por 240 s, em diferentes concentrações de 3-NT (Figura 25A). Nestas condições, o sensor voltamétrico apresentou uma faixa linear de resposta de 10 a 60 μM com um coeficiente de correlação de 0,982 para $n=6$ (Figura 25B) em presença de 3-NT. Os limites de detecção e quantificação encontrados foram 1,83 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 6,10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, determinados usando uma razão $3 \sigma/b$ e $10 \sigma/b$, sendo σ , o desvio padrão do valor médio para 10 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 dos resultados obtidos podemos concluir que a melhor metodologia para análise de 3-NT, de uma forma simples e segura, envolve o emprego de voltametria de pulso diferencial, em potencial de redução, pois abrange uma maior faixa linear e sensibilidade. A diminuição da resposta da análise na oxidação pode estar relacionada com a pré-concentração da hidroxilamina após o potencial de condicionamento, levando à saturação da região eletródica.

Figura 25. (A) Voltametrias de Pulso diferencial relacionadas à oxidação para diferentes concentrações de 3-NT em ECV/MWCNT, tampão fosfato pH 7,4, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$; (B) Curva analítica para determinação de 3-NT na redução.



Fonte: Autor desta tese, 2017.

A Tabela 4 lista algumas publicações, com o propósito de comparação envolvendo diferentes técnicas e matrizes para detecção de 3-NT. A partir dela, podemos observar que a literatura reporta apenas um sensor eletroquímico desenvolvido por ROY e colaboradores para detecção de 3-NT, e os demais trabalhos utilizam cromatografia (ROY et al., 2015).

O presente trabalho apresenta limites de detecção elevados quando comparados aos presentes na Tabela 4, a melhora destes valores pode ser adquirida com a incorporação de nanopartículas de ouro, grafeno, líquidos iônicos, entre outros para aumentar sensibilidade e seletividade. Entretanto o mesmo apresenta boa reprodutibilidade, fácil preparação e é uma alternativa mais barata para as análises.

Uma aplicação futura para este sensor está relacionada ao controle de qualidade referente aos alimentos processados, estes apresentam nitrito em sua composição que leva a formação de 3-NT. Ao contrário dos instrumentos espectroscópicos e cromatográficos, os sensores eletroquímicos podem ser facilmente adaptados para detectar uma ampla gama de analitos, mantendo-se de

baixo custo. Além disso, esses sensores são capazes de serem incorporados em dispositivos robustos, portáteis ou miniaturizados, permitindo adaptar-se a aplicações específicas (KIMMEL et al., 2012).

Tabela 4. Diferentes métodos para detecção de 3-NT em amostras biológicas

Matriz biológica	Método de detecção	LD (nmol L ⁻¹)	Referências
Plasma	CLAE/Fluorescência	0,5	ZHANG; LANG; KAYE, 2007
Plasma	CLAE/UV	200	FATOUROS et al., 2004
Fígado	CLAE/EDC	0,5	RICHARDS; SILVA; DEVALL, 2006
Plasma	IE	2,0	INOUE et al., 2002
Urina	EC	90	MAESO; CIFUENTES; BARBAS, 2004
Plasma	CLAE/UV	0,2	POURFARZAM et al., 2013
Tecido Cerebral	CLAE/DAD	6,7	GUVENÇ et al., 2014
-	VOQ	5,3	ROY et al., 2015
-	VPD	1830 (Oxidação)	Este trabalho
-	VPD	420 (redução)	Este trabalho

DAD: arranjo de diodo; CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência; EDC: detector eletroquímico; IE: imunoenensaio enzimático; EC: eletroforese capilar; VPD: Voltametria de Pulso Diferencial; VOQ: Voltametria de Onda Quadrada.

Fonte: Autor desta tese, 2017.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO (PARTE 2)

6.1 Processo de Polimerização de AF em ECV/MWCNT

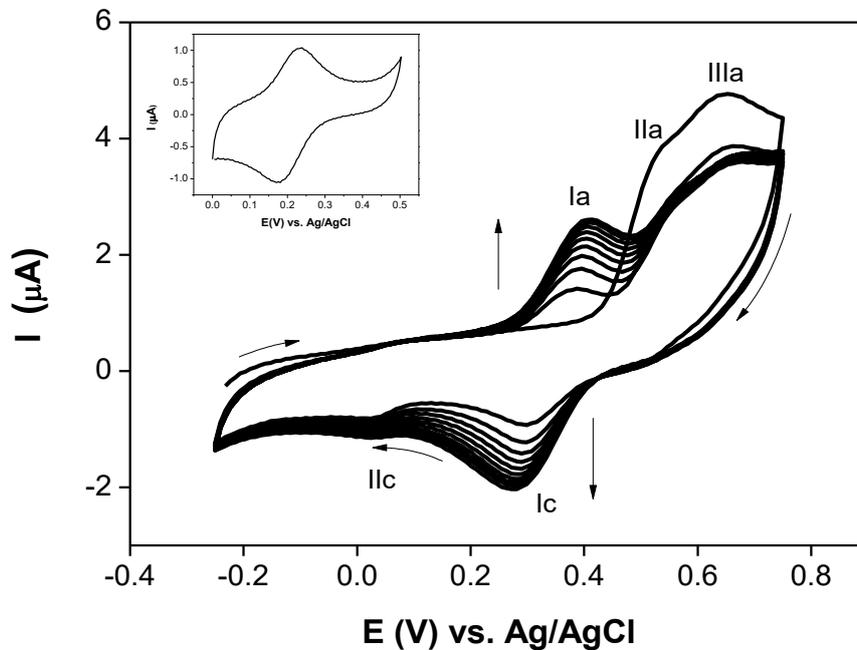
A partir dos resultados obtidos e metodologias adotadas nos estudos com a plataforma nanoestruturada e ácido ferúlico (AF)(LOPES, 2014), para detecção de NADH e EP, no Laboratório de Eletroquímica e Estresse Oxidativo (LEEO) da Universidade Federal de Alagoas, aplicamos o sensor desenvolvido para detecção de outra molécula de relevância biológica, de modo a complementar a investigação. A plataforma foi construída a partir da eletropolimerização *in situ* de AF, no ECV/MWCNT, após ciclos potenciais na faixa de -0,25 a +0,75 V vs. Ag/AgCl/Cl⁻, em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,5), com uma velocidade de varredura de 0,02 V s⁻¹ (Figura 26). A eletropolimerização de AF foi otimizada e as melhores condições experimentais foram: 10 varreduras sucessivas aplicadas ao eletrodo, concentração de AF de 0,4 mmol L⁻¹ e pH 4,5.

Inicialmente, o voltamograma cíclico registrado em um eletrodo modificado por ECV/MWCNT, usando AF dissolvido em tampão fosfato pH 4,5, exibiu dois picos de oxidação irreversíveis em IIa = +0,53 V e IIIa = +0,65 V vs. Ag/AgCl, o que corresponde ao início do processo de eletropolimerização. Assim, como apresentado na Figura 26, os picos IIa e IIIa diminuem e um novo par de picos, Ia/Ic são gerados e aumentam em varreduras sucessivas, indicando cobertura gradual da superfície do eletrodo de trabalho, com filme eletroativo. O par de picos Ia/Ic, na Figura 26, corresponde a um processo redox quase-reversível.

O ECV/MWCNT/poli-AF obtido pelo processo de eletropolimerização descrito acima, foi cuidadosamente lavado com água destilada e imerso em uma nova solução de tampão fosfato (pH 7,0) para detecção de analitos (Figura 26, insert). A resposta voltamétrica do ECV/MWCNT/poli-AF consiste em processo quase-reversível bem formado cujo potencial formal é próximo de 0,204 V vs. Ag/AgCl/Cl⁻. Essas condições foram utilizadas para todas os estudos eletroquímicos.

A presença de MWCNT impediu a passivação do eletrodo que é comumente observada em ECV, quando uma espécie fenólica está presente (SILVA et al., 2012, 2016c)

Figura 26. Voltamogramas Cíclicos sucessivos de AF em ECV/MWCNT. Condições Experimentais: AF 0,4 mmol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 4,5 e $\nu = 0,02 \text{ V s}^{-1}$, 10 ciclos; Inset: Voltamograma Cíclico de ECV/MWCNT/poli-AF em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7.0 e $\nu = 0.005 \text{ V s}^{-1}$.

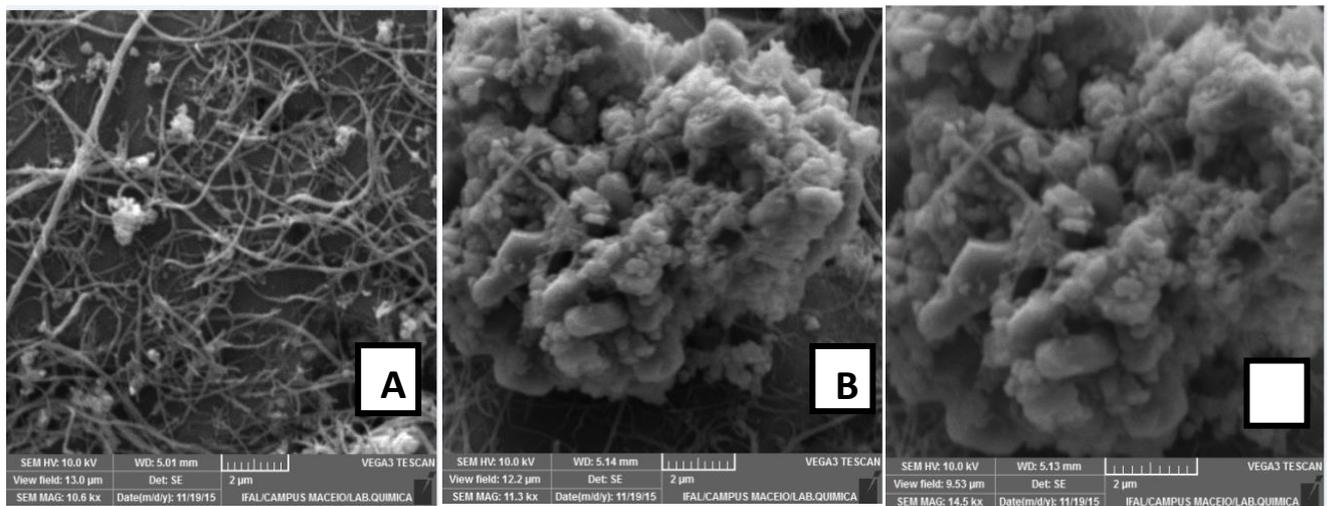


Fonte: Retirado de SILVA et al., 2017 .

6.2 Caracterização de ECV / MWCNT / poli-AF

Foi realizada microscopia eletrônica de varredura (MEV) para caracterizar a morfologia superficial do filme ECV/MWCNT e ECV/MWCNT/poli-AF com diferentes aumentos (A) 10.600 x, (B) 11.300 x e (C) 14.500 x, respectivamente. A Figura 27A mostra a morfologia típica dos nanotubos bem dispersos na matriz, isto é, na superfície modificada. Pode ser visto, a partir da imagem que o diâmetro dos nanotubos de carbono se distribui principalmente na faixa de 50-250 nm. Por outro lado, após o processo de modificação da superfície (Figura 27B), é evidente a alteração na morfologia dos MWCNTs, possivelmente devido à cobertura pela matriz polimérica de AF, resultando em regiões rugosas e irregulares. Além disso, a partir da Figura 27C pode-se observar que os MWCNTs são densamente embalados, eficientemente aprisionados dentro da rede polimérica, gerando uma grande área superficial, matriz ideal para o sensor eletroquímico, por facilitar a difusão dos analitos no filme polimérico (LOPES et al., 2015; SILVA et al., 2016c).

Figura 27- Micrografias de MEV de ECV/MWCNT (A), ECV/MWCNT/poli-AF com diferentes aproximações (B, C).



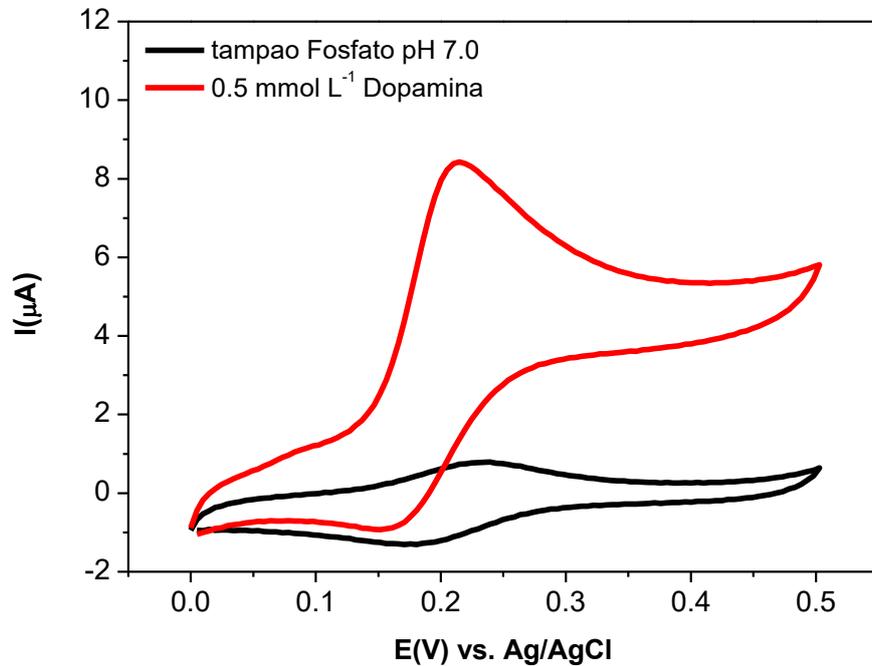
Fonte: Autor desta tese, 2017.

6.3 Atividade Eletrocatalítica de ECV/MWCNT/poli-AF frente a DA

Como já mencionado, a plataforma ECV/MWCNT/poli-AF apresentou efeito eletrocatalítico para a detecção de NADH e epinefrina, trabalhos realizados no LEEO da Universidade Federal de Alagoas (LOPES, 2016; SILVA, 2010). Para dar continuidade aos estudos com esta plataforma foram avaliados seus efeitos eletrocatalíticos para DA, uma vez que este é um analito de extrema relevância, e sua concentração aumentada ou diminuída pode estar relacionada a uma série de patologias, tanto em termos de diagnóstico como de agravamento da doença.

Alguns ensaios foram realizados com DA para avaliar se haveria catálise redox, a partir do polímero eletrogerado, na plataforma nanoestruturada. Após adição de DA, o pico de oxidação aumentou significativamente, enquanto o pico de redução diminuiu, indicando catálise redox eficiente para a detecção de DA, na plataforma ECV/MWCNT/poli-AF (Figura 28).

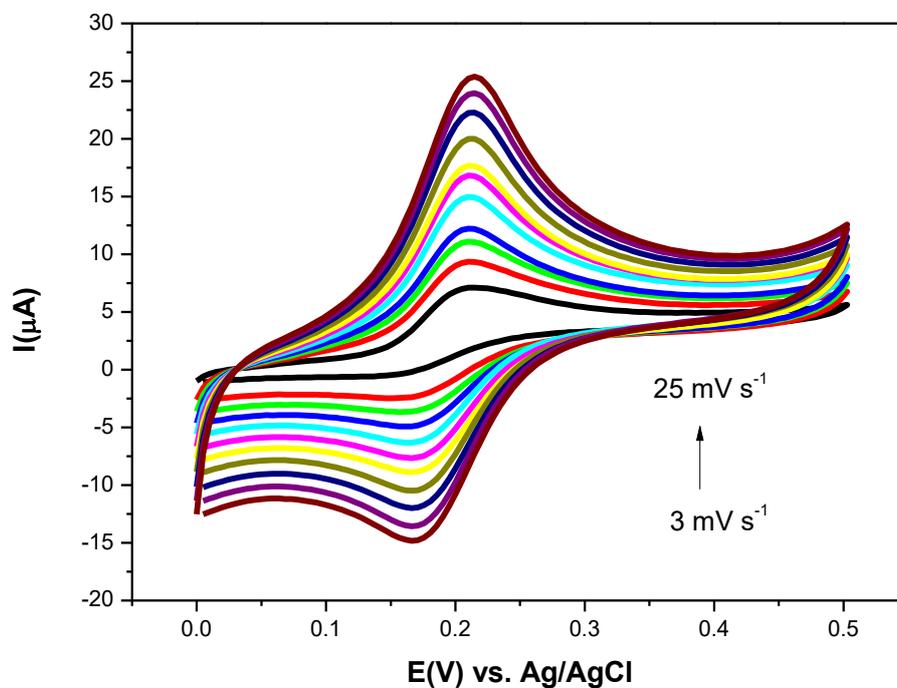
Figura 28. Voltamogramas cíclicos para o ECV/MWCNT/poli-AF, na ausência e presença de dopamina. $v = 0,005 \text{ V s}^{-1}$, em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0.



Fonte: Autor desta tese, 2017.

Através de estudos realizados em diferentes velocidades de varredura verifica-se o aumento da corrente de pico anódico de DA com o aumento da velocidade de varredura, bem como o deslocamento do potencial de oxidação de DA para valores mais positivos, indicando desta forma uma limitação cinética para este processo redox na plataforma utilizada (Figura 29).

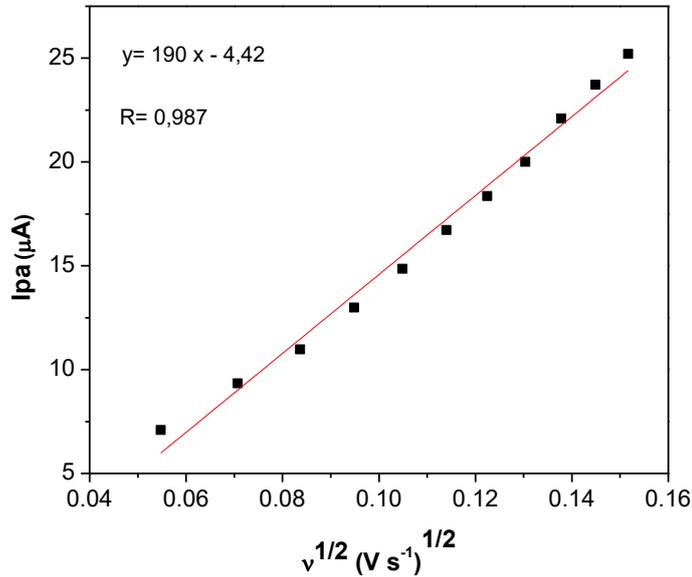
Figura 29. Voltamogramas Cíclicos de ECV/MWCNT/poli-AF em várias velocidades de varredura em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0 na presença de 0,5 mmol L⁻¹ DA.



Fonte: Autor desta tese, 2017.

O gráfico de corrente catalítica I_{pa} vs. a raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial ($\nu^{1/2}$) na faixa de velocidade de 0,003 a 0,025 V s^{-1} foi construído e resultou em dependência linear. Dessa forma, podemos concluir que o transporte de massa para esse processo é controlado por difusão (Figura 30).

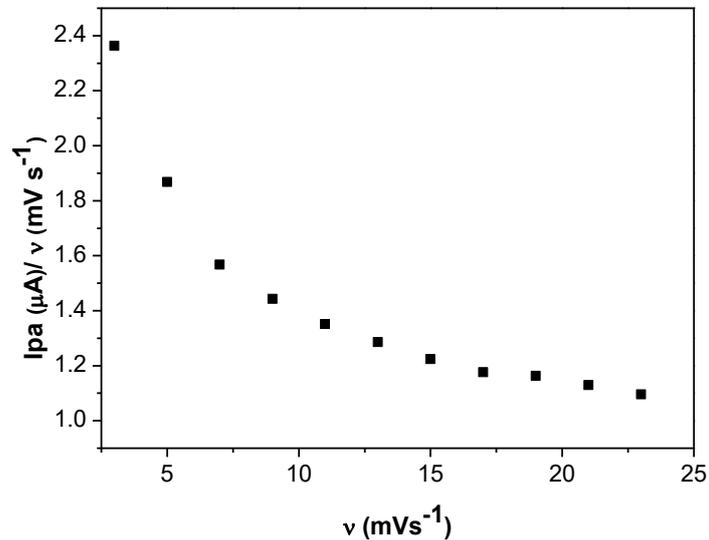
Figura 30- Variação da corrente de pico anódica I_{pa} vs. $v^{1/2}$ no ECV/MWCNT/poli-AF, em solução contendo $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de DA. Medidas realizadas em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0 e v : $0,003\text{-}0,025 \text{ V s}^{-1}$.



Fonte: Autor desta tese, 2017.

Para comprovar que o processo de oxidação eletrocatalítica entre DA e a plataforma ECV/MWCNT/poli-AF apresenta uma etapa química acoplada, foi elaborado um gráfico da corrente de pico normalizada com a velocidade de varredura (I_{pa}/v) vs. v (Figura 31), com evidência de perfil característico de um processo eletroquímico-químico catalítico (EC_{cat}) (BARD e FAULKNER, 2001).

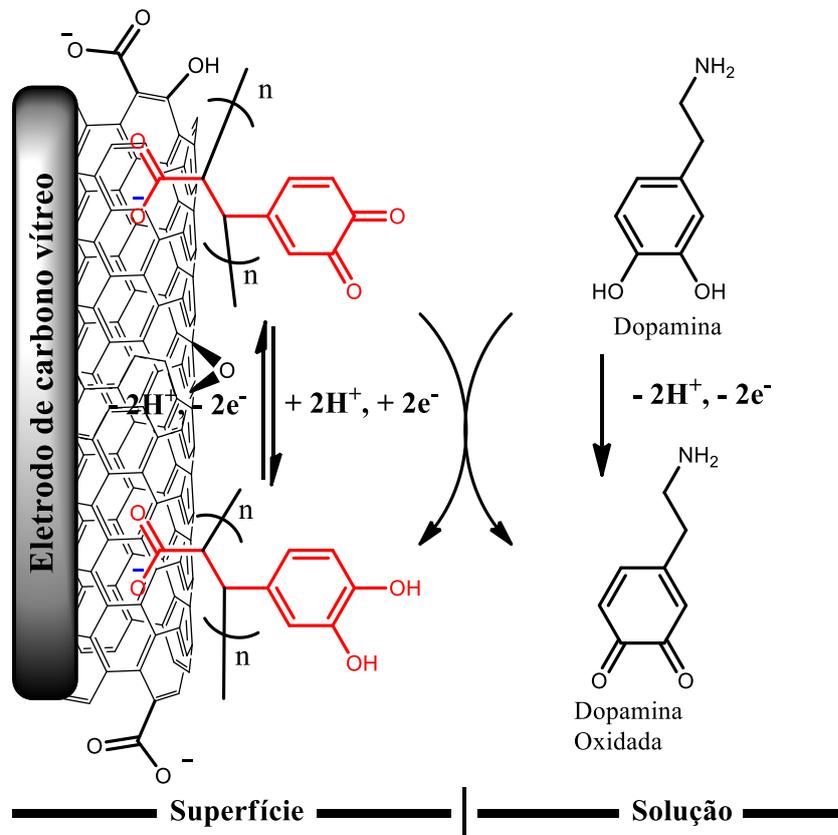
Figura 31. Variação da corrente de pico anódica normalizada I_{pa}/v vs. v no ECV/MWCNT/polí-AF em solução contendo $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de DA. Medidas realizadas em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0 e v : $0,003\text{-}0,023 \text{ V s}^{-1}$.



Fonte: Autor desta tese, 2017.

Esse mecanismo eletrocatalítico pode ser explicado através da interação entre o polímero eletroativo contendo sistemas quinônicos gerados por meio de oxidação de AF na plataforma com nanotubos de carbono, com dopamina. O grupo quinona do polímero eletroativo pode ser reduzido à hidroquinona por um processo de dois elétrons e dois prótons, formando um ciclo catalítico para a oxidação eletrocatalítica de DA, o qual envolve o par redox (quinona/hidroquinona) (Figura 32), semelhante a vários mediadores redox presentes na literatura (SILVA et al., 2012, 2016c)

Figura 32- Modelo simplificado do mecanismo proposto para o processo de eletrocatalise de DA sobre a plataforma ECV/MWCNT/poli-AF.



Fonte: Adaptado de Lopes, 2016.

6.4 Estudos Cronoamperométricos

A cronoamperometria de salto de potencial foi aplicada para a investigação do processo eletrocatalítico em ECV/MWCNT/poli-AF.

A Figura 33A apresenta uma série de cronoamperogramas bem definidos de ECV/MWCNT/poli-AF, na presença de várias concentrações de DA com $E_{\text{inicial}} = +0,20$ V e $E_{\text{final}} = -0,05$ V vs. Ag/AgCl.

Como pode ser observado na Figura 33A, não existe corrente catódica líquida correspondente à redução do mediador na presença de DA, enquanto os cronoamperogramas de duplo salto de potencial direto e reverso para o mediador na ausência de DA, mostraram-se simétricos com um consumo de carga igual para

redução e oxidação do sistema redox eletrogerado, na superfície da plataforma ECV/MWCNT/poli-AF.

A corrente aumenta com o aumento da concentração de DA a +0,200 V e a corrente de redução permanece praticamente inalterada a -0.050 V vs. Ag/AgCl/Cl⁻. A área sob cada cronoamperograma foi integrada (Fig. 33B).

A cronoamperometria foi utilizada para estimar o coeficiente de difusão de DA em solução. Para obter o coeficiente de difusão (D), a corrente correspondente da reação eletroquímica (sob controle de difusão) é descrita pela lei de Cottrell (Equação 2) (NGAMCHUEA et al., 2014; SANTHIAGO et al., 2009a) .

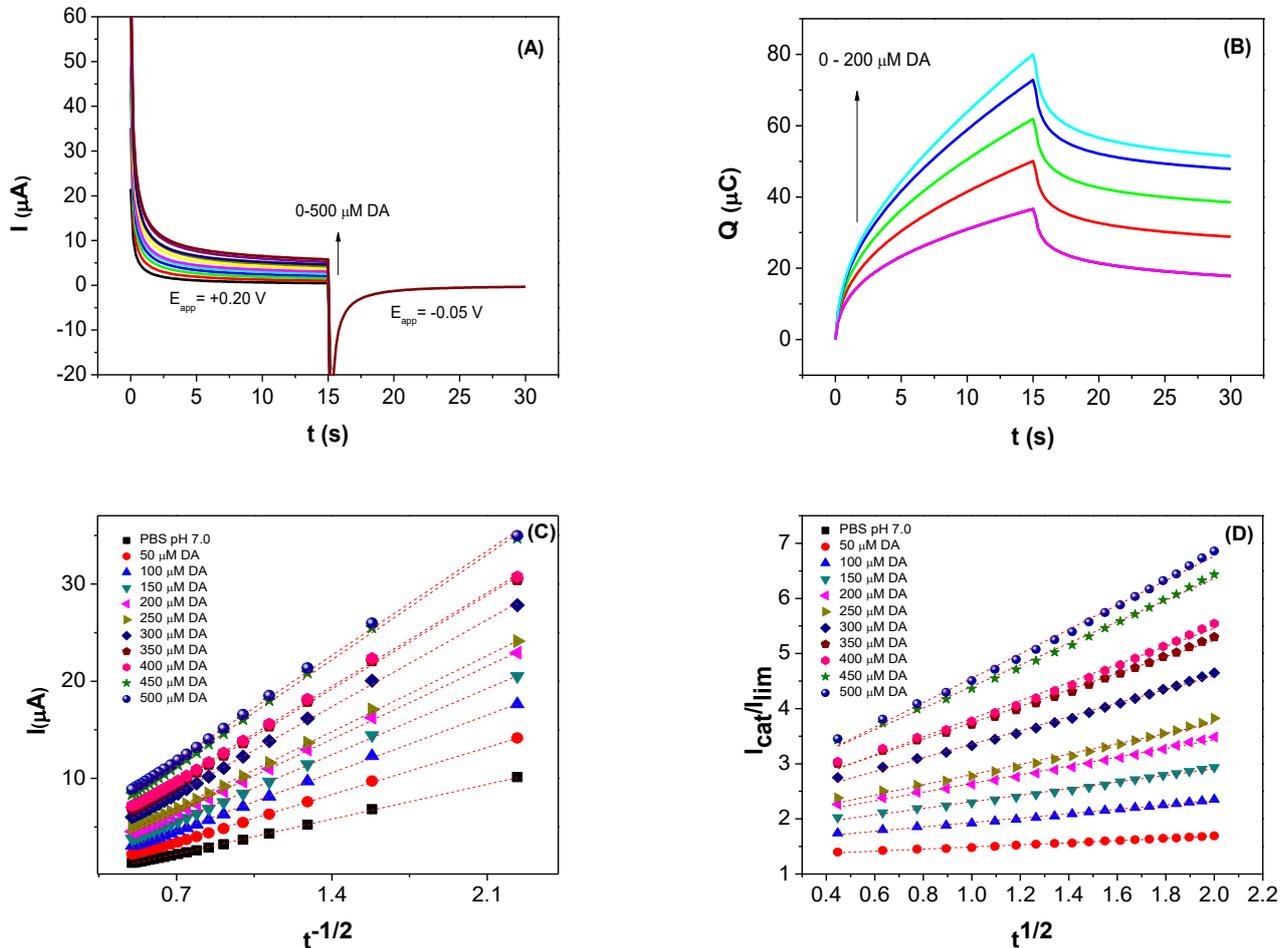
$$I = nFAD_{Ddopa}^{1/2} C_0 \pi^{-1/2} t^{-1/2} \quad (\text{Equação 2})$$

Sendo D_{DA} 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. O valor médio de D_{DA} , obtido a partir das inclinações de I versus $t^{1/2}$ (Fig. 32C) para DA foi $2,48 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ na faixa de concentração $50 - 500 \mu\text{mol L}^{-1}$. A constante de velocidade catalítica (k_{cat}) foi calculada por cronoamperometria, de acordo com o método descrito na literatura (Equação 3) (GALUS, 1976):

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

A partir das inclinações do gráfico I_{cat}/I_{Lim} vs. $t^{1/2}$ em cada concentração estudada (Figura 33D), foi possível obter o valor de k_{cat} , o qual apresentou o valor de $1,15 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, na faixa de concentração estudada.

Figura 33. (A) Cronoamperogramas de ECV/MWCNT/poli-AF em tampão fosfato 0.1 mol L⁻¹ pH 7.0 na ausência e presença de várias concentrações de DA, E_{inicial}= + 0,20 V e E_{final}= -0.05 V vs. Ag/AgCl; (B) Integração dos cronoamperogramas; (C) Gráfico de I vs. $t^{1/2}$; (D) Gráfico de I_{cat}/I_{lim} vs. $t^{1/2}$.



Fonte: Autor desta tese, 2017.

6.5 Estudos com Eletrodo de Disco Rotatório

Foram realizadas análises com eletrodo de disco rotatório para obter parâmetros cinéticos correspondentes à oxidação electrocatalítica de DA, utilizando ECV/MWCNT/poli-AF. Com este objetivo, as correntes catalíticas foram obtidas em várias velocidades de rotação para diferentes concentrações de DA (Figura 34A).

Além disso, na Figura 34B, observa-se que a corrente de pico apresenta desvio da linearidade no gráfico de Levich, sugerindo limitação cinética quando se utilizaram velocidades de rotação elevadas. De acordo com a equação de Koutecky-Levich, uma

corrente líquida pode ser dividida em dois componentes - corrente limitada pela transferência de massa e cinética (ou reação limitada). A equação de Koutecky-Levich pode ser usada para determinar a constante de velocidade, k_{cat} para a reação catalítica entre o mediador oxidado e DA e é formulada como se segue (Equação 4):

$$\frac{1}{I} = \frac{1}{nFAk_{cat}\Gamma[DA]} + \frac{1}{0,620nFA\nu^{-1/6}D^{2/3}[DA]\omega^{1/2}} \quad (\text{Equação 4})$$

Onde n é o número de elétrons transferidos, F é a constante de Faraday, A é a área do eletrodo (cm^2), Γ é a cobertura total da superfície (mol/cm^2), ω é a velocidade de rotação do eletrodo (rad s^{-1}), D é o coeficiente de difusão de DA, $[DA]$ é a concentração do substrato (mol/cm^3), e ν é a viscosidade cinemática ($0,01 \text{ cm}^2/\text{s}$).

A cobertura total foi estimada em cerca de $3,35 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^2$, usando a equação típica (Equação 5) (BARD; FAULKNER, 2002):

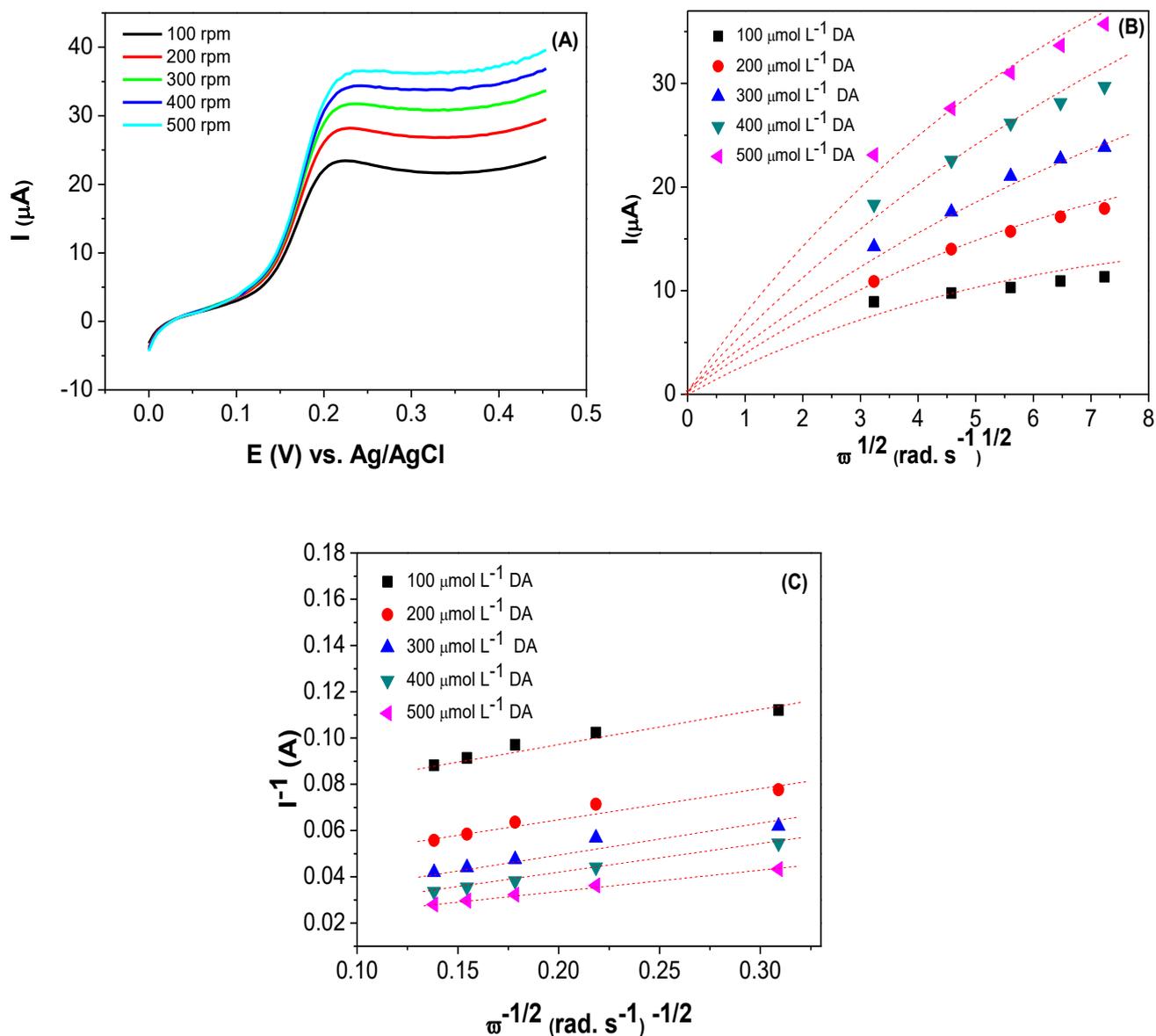
$$\Gamma = Q / nFA \quad (\text{Equação 5})$$

Onde Q é a carga obtida ($7,11 \times 10^{-6} \text{ C}$) integrando a onda anódica a 50 mVs^{-1} , A é a área geométrica do eletrodo ECV/MWCNT/poli-AF e $n = 2 \text{ e}^-$, envolvida na transferência de carga por molécula (SANTHIAGO et al., 2009b; SILVA et al., 2013).

A partir da equação acima (Equação 3), o valor de k_{cat} pode ser determinado a partir dos interceptos dos gráficos de I^{-1} versus $\omega^{1/2}$, que é chamado de gráfico de Koutecky-Levich (Figura 34C) em diferentes velocidades de rotação, com base no número conhecido de elétrons (2) e a cobertura superficial (Γ), para diferentes concentrações de DA. O valor médio para k_{cat} obtido foi de $1,90 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}\text{s}^{-1}$, para DA.

O resultado é próximo ao valor obtido a partir dos experimentos cronoamperométricos ($1,15 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

Figura 34. (A) Voltamogramas com eletrodo de disco rotatório para oxidação de DA em várias velocidade de rotação em ECV/MWCNT/poli-AF, tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$ e $[\text{DA}] = 500 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. (B) Gráfico de Levich para oxidação catalítica de DA no eletrodo modificado em várias concentrações. (C) Gráfico de Koutecky-Levich derivado de (B).



Fonte: Autor desta tese, 2017.

6.6 Detecção Amperométrica de DA

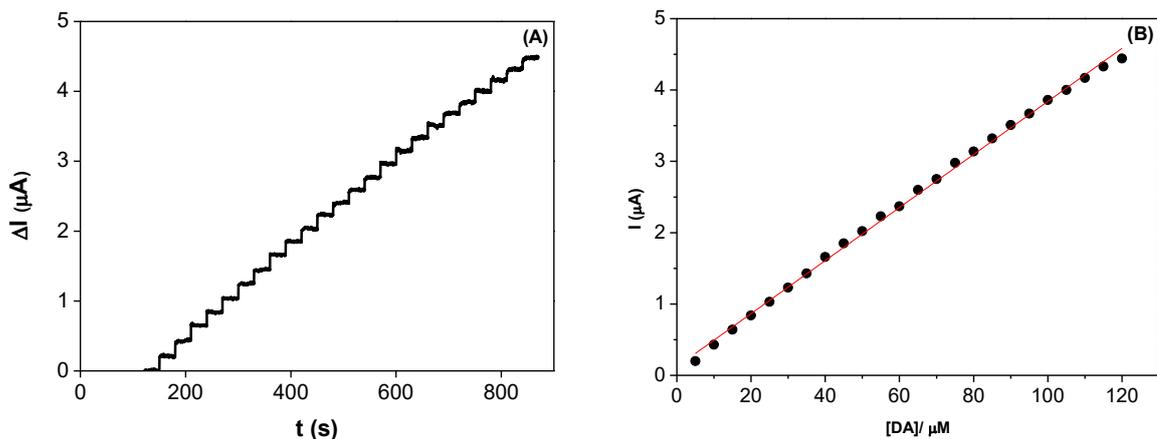
As propriedades eletrocatalíticas de ECV/MWCNT/poli-AF para detecção de DA também foram investigadas. A Figura 35A mostra uma curva amperométrica de ECV/MWCNT/poli-AF com sucessivas adições de DA (pH 7,0). O melhor potencial a ser aplicado foi +0,2 V. A plataforma ECV/MWCNT/poli-AF responde rapidamente às variações nas concentrações de DA, em menos de 1 s. A relação entre a concentração de DA e o sinal de corrente para ECV/MWCNT/poli-AF está ilustrada na Figura 35B.

A corrente aumentou linearmente em uma faixa linear de 5 a 120 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($R^2 = 0,991$, $n = 24$) para detecção de DA com uma sensibilidade de 37,20 $\text{nA L } \mu\text{mol}^{-1}$, limites de detecção e quantificação de 2,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, determinados de acordo com as recomendações da IUPAC (1987).

O processo desenvolvido pode ser expresso de acordo com a seguinte equação:

$$\Delta I(\mu\text{A}) = 0.1207 + 0.0372[\text{DA}]/\mu\text{mol L}^{-1}$$

Figura 35. (A) Medidas cronoamperométricas para a eletrooxidação de DA no ECV/MWCNT/poli-AF obtidas em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ em pH 7,0, E_{aplicado}= +0,200 V vs. Ag/AgCl; (B) Curva analítica para a eletrooxidação de DA no ECV/MWCNT/poli-AF, em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, em pH 7,0.



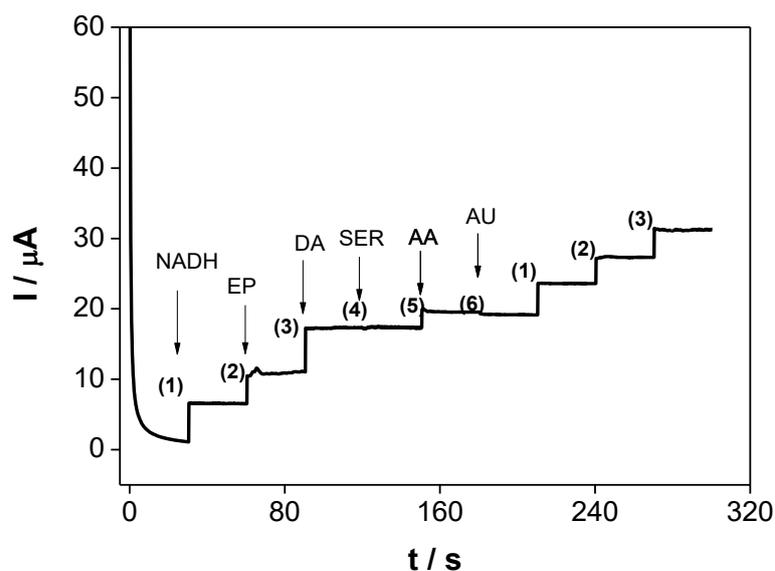
Fonte: Autor desta tese, 2017.

6.7 Estudo de interferentes

O estudo de interferentes na resposta do eletrodo é útil para mostrar a seletividade e abrangência do mesmo, assim como para estabelecer o preparo da amostra, com o objetivo de minimizar os efeitos destes, nas análises. A interferência de compostos eletroativos tipicamente presentes numa amostra fisiológica (por exemplo, serotonina (SER), ácido ascórbico (AA) e ácido úrico (AU)) normalmente impede a determinação de NADH, EP e DA. A seletividade do sensor foi examinada na presença de SER, AA e AU. A Figura 36 apresenta a resposta amperométrica do eletrodo modificado quando aplicado +0,2 V, com adições sucessivas de NADH, EP, DA, SER, AA, AU, NADH, EP e DA.

Apenas AA interferiu nos resultados, uma vez que é possível oxidá-lo, com o mesmo potencial de NADH, EP e DA. Entretanto, SER e AU não interferiram na resposta do eletrodo. A interferência de AA pode ser minimizada, usando ascorbato oxidase para promover a oxidação de AA (LIMA et al., 2008). Outras abordagens podem ser aplicadas, como o uso de nafion (RIBEIRO et al., 2016).

Figura 36. Resposta amperométrica de ECV/MWCNT/poli-AF, em adições de (1) NADH ($750 \mu\text{mol L}^{-1}$), (2) EP ($170 \mu\text{mol L}^{-1}$), (3) DA ($250 \mu\text{mol L}^{-1}$), (4) SER ($210 \mu\text{mol L}^{-1}$), (5) AA ($210 \mu\text{mol L}^{-1}$) e (6) AU ($210 \mu\text{mol L}^{-1}$), em tampão fosfato pH 7.0, potencial aplicado de +0.2 V.



6.8 Análises de amostras reais e testes de recuperação

O método proposto foi aplicado para a determinação de DA em amostras farmacêuticas, utilizando o método de adição padrão. A amostra de DA foi diluída 10 vezes, esta diluição ajuda a reduzir os efeitos de matriz em amostras reais. Para confirmar os resultados, as amostras farmacêuticas foram fortificadas com solução padrão de DA e, em seguida, as quantidades totais foram determinadas. O valor de recuperação das amostras fortificadas foi de 101% para DA (Tabela 5). O teste de recuperação foi realizado utilizando amostra real, no caso de DA, com diluição ($2,64 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). Em seguida, 100 μL da amostra diluída foi colocada na célula eletroquímica (5 mL) e quantificadas por amperometria.

Tabela 5. Determinação de DA em amostras farmacêuticas

	DA
Detectado ($\mu\text{mol L}^{-1}$) ^a	647,41
Adicionado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	75,00
Após adição ($\mu\text{mol L}^{-1}$) ^a	729,69
Recuperação (%)	101
D.P.R. (%) ^b	2,06

^a Número de amostras analisadas, 3.

^b Desvio padrão relativo

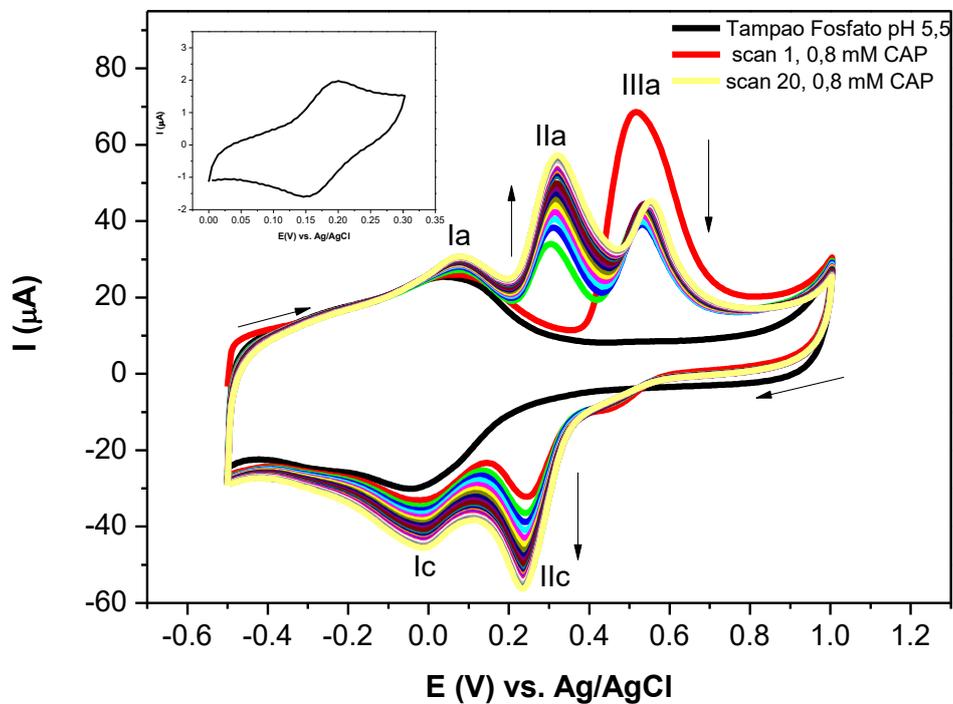
Fonte: Autor desta tese, 2017.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO (PARTE 3)

7.1 Preparação do eletrodo modificado

Inicialmente, o eletrodo de carbono vítreo (ECV) foi modificado através da deposição de 5 μL de uma dispersão 1 mg mL^{-1} de nanotubos de carbono (MWCNT), previamente tratados em meio ácido, e dispersos em DMF. Posteriormente, CAP foi eletrogerada sobre ECV/MWCNT, a partir de uma solução 0,8 mmol L^{-1} , através de sucessivas varreduras na faixa de potencial -0,50 V a +1,0 vs. Ag/AgCl/ Cl^- (20 ciclos, $\nu = 0,050 \text{ V s}^{-1}$), nas condições otimizadas. Assim, foi possível observar a formação de sistema quinônico bem definido (Figura 37), a partir da eletrooxidação de capsaicina.

Figura 37. Voltamogramas Cíclicos na faixa de -0,5 a +1,0 V vs. Ag/AgCl para a polimerização e ativação do ECV/MWCNT com capsaicina a 0,8 mmol L^{-1} , em solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} , pH 5,5 e $\nu = 0,05 \text{ V s}^{-1}$; Insert: Voltamograma Cíclico de ECV/MWCNT/poli-CAP em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} , pH 7.0 e $\nu = 0.005 \text{ V s}^{-1}$.



Fonte: Autor desta tese, 2017.

Na Figura 37 podemos verificar, na ausência de capsaïcina, a presença dos picos Ia (+0,07 V) e Ic (-0,014 V) relativos aos grupos provenientes do tratamento ácido em nanotubos de carbono que levam a formação de cetonas e carboxilas, esses grupos geram sítios energeticamente favoráveis à deposição de partículas e formação de mediadores redox com fenóis.

Na primeira varredura do voltamograma, na presença de capsaïcina, na Figura 37, um pico anódico irreversível (IIIa), largo, é observado, em +0,52 V vs. Ag/AgCl, com conseqüente aparecimento de uma onda catódica (IIc), em +0,24 V. Na segunda e subseqüentes varreduras, na presença de capsaïcina, pode-se observar a formação de uma onda anódica (IIa), permitindo concluir que as ondas IIc e IIa são eletrogeradas a partir do pico IIIa. Nas varreduras posteriores, verificamos a diminuição da corrente relacionada ao pico IIIa, indicando consumo de capsaïcina e aumento de corrente para as ondas IIa/IIc em varreduras sucessivas constituindo desta forma um sistema redox bem definido, assim como Ia/Ic. O par redox IIa/IIc não desaparece, quando o eletrodo é lavado e transferido a uma nova solução tampão livre de CAP, indicando a permanência do material eletrogerado na superfície modificada (Insert da Figura 37) .

Sem utilização de nanotubos de carbono sobre o eletrodo de carbono vítreo, não se observa a formação de espécies redox, devido, provavelmente, à passivação do eletrodo, fato este característico de compostos fenólicos (EŽERSKIS; JUSYS, 2001).

7.2 Mecanismo de oxidação de CAP

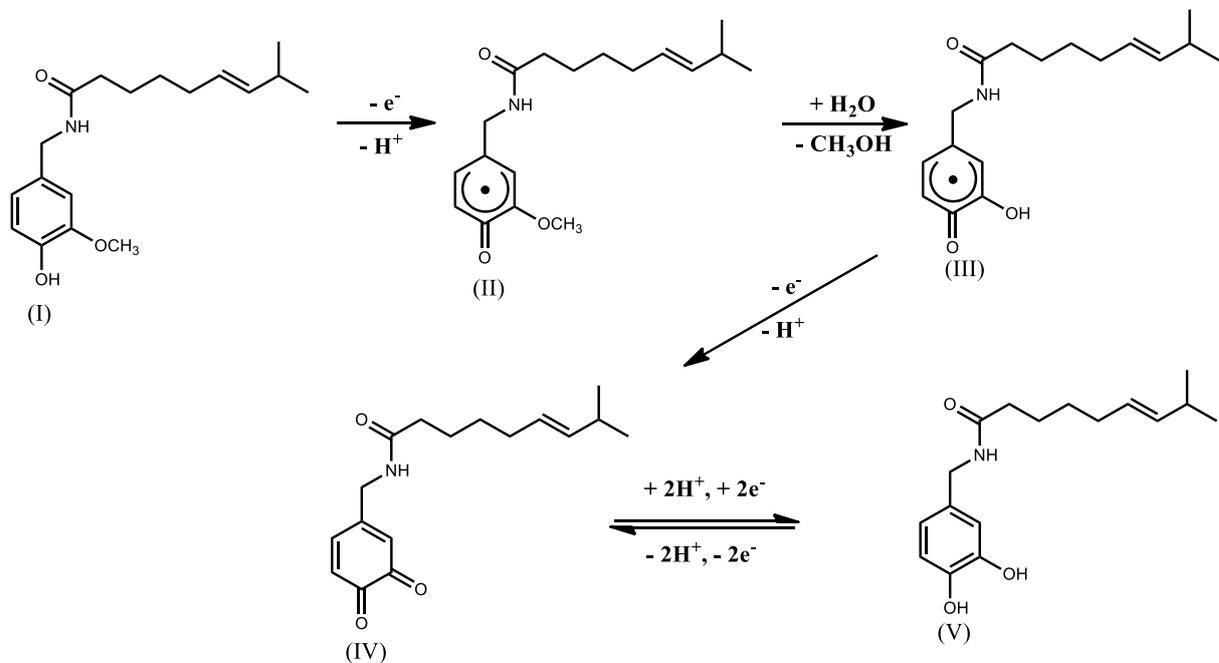
Na Figura 38 é apresentado o mecanismo proposto para a oxidação de CAP. No composto I da Figura 38, ocorre a oxidação monoeletrônica de CAP com saída de 1 próton, o que leva à formação de radicais. Essa etapa está relacionada, provavelmente, à onda IIIa, em 0,52 V vs. Ag/AgCl (Figura 37), e sua irreversibilidade devido às reações químicas acopladas e geração de espécies mais estáveis nas etapas seguintes, conforme mostrado no esquema (Figura 38) (MANAIA et al., 2012).

O sistema redox, IIa/IIc pode ser compreendido através da oxidação monoeletrônica dos radicais fenoxila, que levará à formação de carbocátions que, por sua vez, sofrerão hidrólise, levando à formação de quinonas (espécies IV e V).

É importante salientar que os carbonos com maior facilidade em sofrerem oxidação são os que apresentam grupos hidroxila e metoxila, devido a maior densidade eletrônica, pois estes possuem HOMO de mais alta energia, sendo mais favorável a oxidação.

A reversibilidade dos sistemas redox gerados podem ser explicados pela formação de *orto*- e *para*-quinonas, por possuírem habilidade em sofrer reações redox reversíveis facilitada pela formação de sistemas aromáticos (CHAMBERS, 1988).

Figura 38- Mecanismo apresentando a formação dos produtos gerados através da oxidação de CAP.

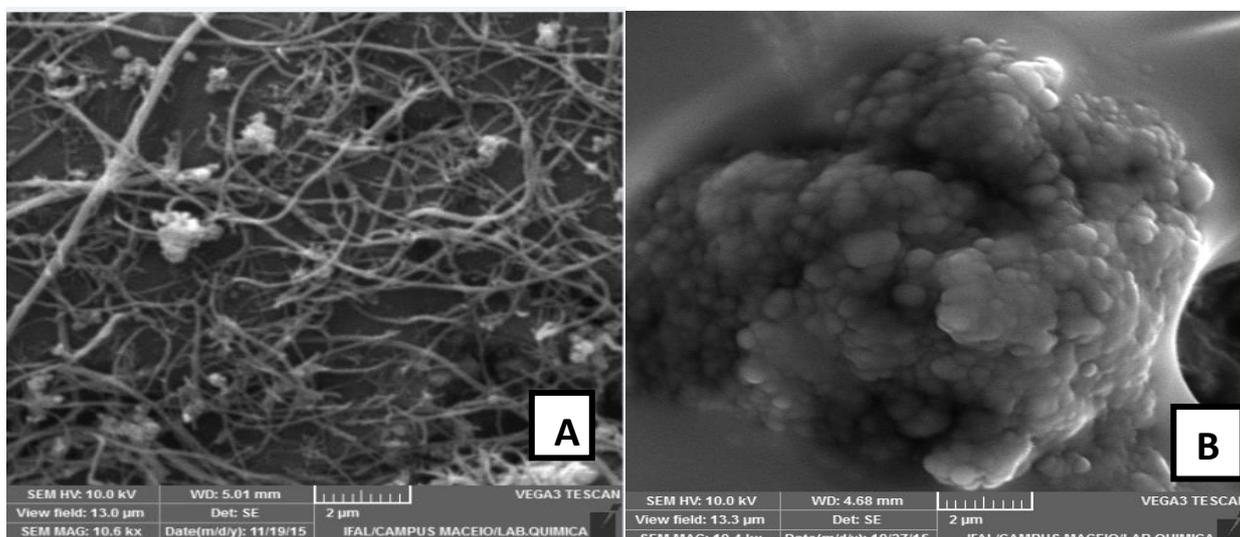


Fonte: Adaptado de KACHOOSANGI; WILDGOOSE; COMPTON, 2008 .

7.3 Caracterização de ECV/MWCNT/poli-CAP

Foi realizada microscopia eletrônica de varredura (MEV) para caracterizar a morfologia superficial de ECV/MWCNT e ECV/MWCNT/poli-CAP. A Figura 39A mostra a morfologia típica de nanotubos de carbono bem dispersos na matriz com visualização de “fios”. Por outro lado, após o processo de modificação da superfície (Figura 39B), é evidente que ocorreu uma alteração na morfologia dos MWCNTs, possivelmente devido à cobertura pela matriz polimérica de CAP, resultando em regiões rugosas e irregulares.

Figura 39- Micrografias de MEV de ECV/MWCNT (A), ECV/MWCNT/poli-CAP (B)



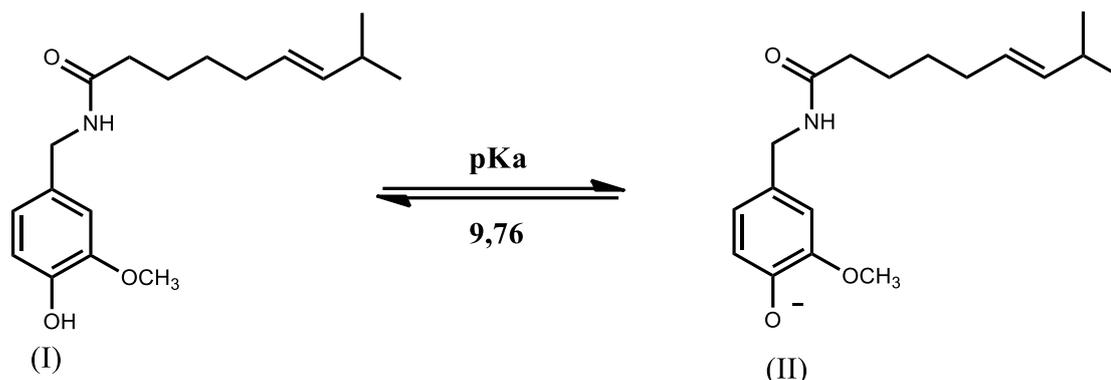
Fonte: Autor desta tese, 2017.

7.4 Comportamento Eletroquímico da capsaicina em diferentes valores de pH

Fez-se necessário verificar a influência do pH no processo de eletropolimerização da capsaicina na plataforma ECV/MWCNT, uma vez que o comportamento eletroquímico pode ser alterado de acordo com o valor de pH, sendo necessário conhecer o valor de pKa para compreender a extensão da ionização dos grupos funcionais presentes na molécula em estudo para desta forma alcançar uma maior sensibilidade e estabilidade ao sistema ECV/MWCNT/poli-CAP.

A Figura 40 apresenta as formas protonada e desprotonada referentes a CAP, dependendo do valor de pH do meio (GUSTAFSSON et al., 2009).

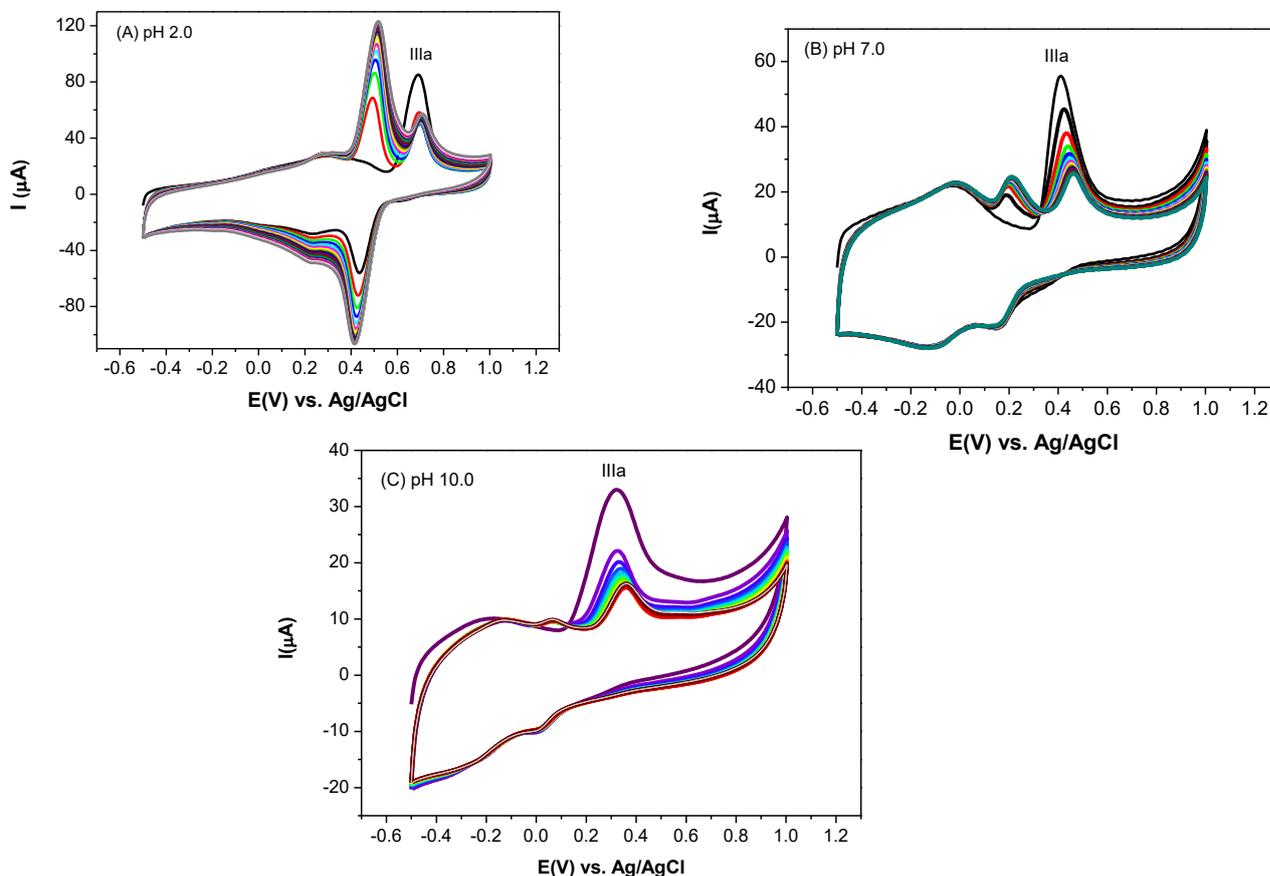
Figura 40. Formas protonada e desprotonada para capsaïcina e respectivo valor de pKa



Fonte: Adaptado de GUSTAFSSON et al., 2009.

Os voltamogramas cíclicos apresentados na Figura 41 evidenciam a ocorrência do deslocamento do potencial de oxidação do pico IIIa da capsaïcina, para potenciais menos positivos, com o aumento dos valores de pH do meio. Os potenciais necessários para oxidar CAP são +0,69 V, +0,40 V e +0,32 V para os valores de pH 2, 7 e 10 respectivamente, indicando que o potencial anódico (IIIa) diminui com o aumento do valor de pH, devido ao aumento na densidade eletrônica causada pela presença do grupo aniônico fenóxido, relacionado com a predominância da espécie II (Figura 40) com o aumento do valor do pH. O grupo fenóxido, eletrodoador, favorece a dispersão de carga no anel aromático, facilitando a geração do cátion radical para iniciar o processo de polimerização (FERREIRA et al., 2012).

Figura 41. Voltamogramas Cíclicos para a polimerização e ativação do ECV/MWCNT com capsaicina a $0,8 \text{ mmol L}^{-1}$, em solução tampão fosfato $0,1 \text{ M}$, $v= 0,050 \text{ V s}^{-1}$ em pH (A) 2,0; (B) 7,0;(C) 10,0.

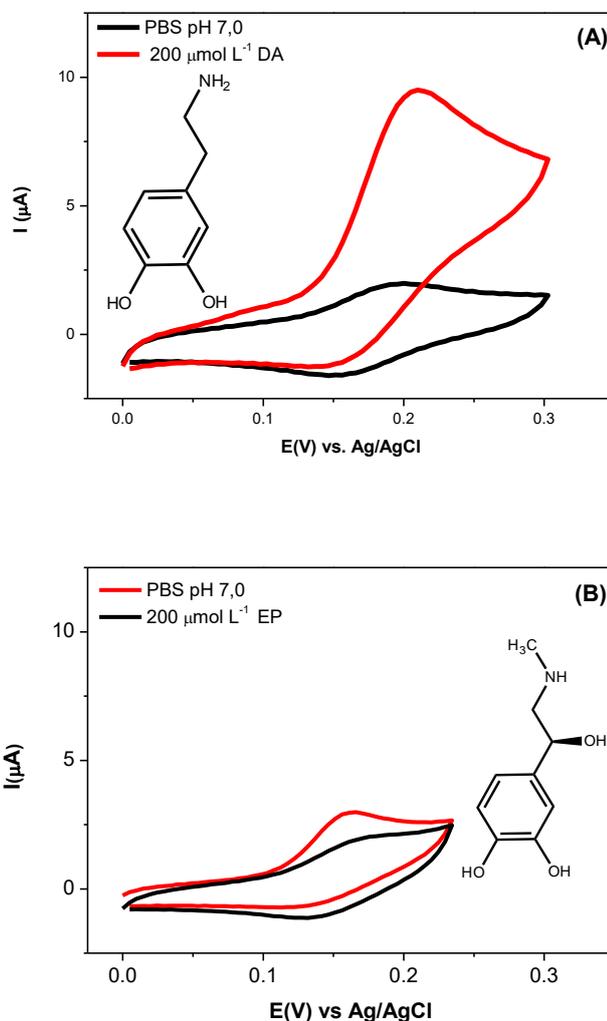


Fonte: Autor desta tese, 2017.

7.5 Atividade eletrocatalítica de ECV/MWCNT/poli-CAP frente a DA e EP

Alguns ensaios foram realizados com dopamina para avaliar o efeito eletrocatalítico do par redox eletrogerado. Após adição de dopamina, o pico de oxidação aumenta significativamente enquanto que o pico de redução diminui, indicando catálise redox eficiente para a detecção de dopamina, através da plataforma ECV/MWCNT/poli-CAP. O mesmo comportamento é apresentado para EP (Figura 42).

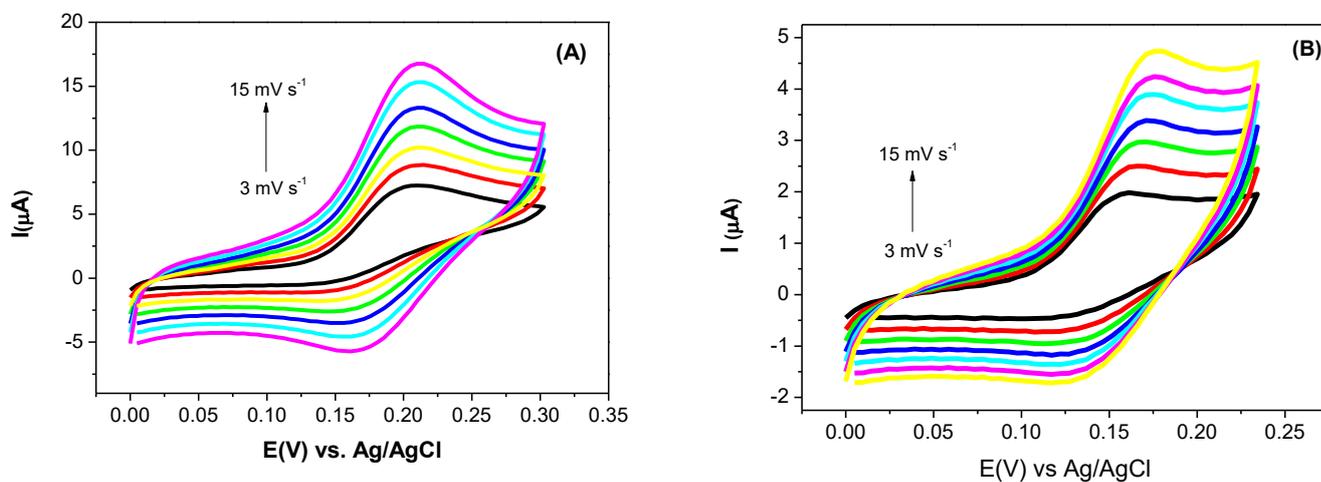
Figura 42 Voltamogramas cíclicos para o ECV/MWCNT/poli-CAP na ausência e na presença de dopamina (A) e epinefrina (B). $v = 0,005 \text{ V s}^{-1}$, em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0.



Fonte: Autor desta tese, 2017.

Através de estudos realizados em diferentes velocidades de varredura, verifica-se o aumento da corrente de pico anódico de DA e EP, com o aumento da velocidade de varredura, bem como o deslocamento do potencial de oxidação para valores mais positivos, indicando desta forma uma limitação cinética para estes processos redox na plataforma utilizada (Figura 43).

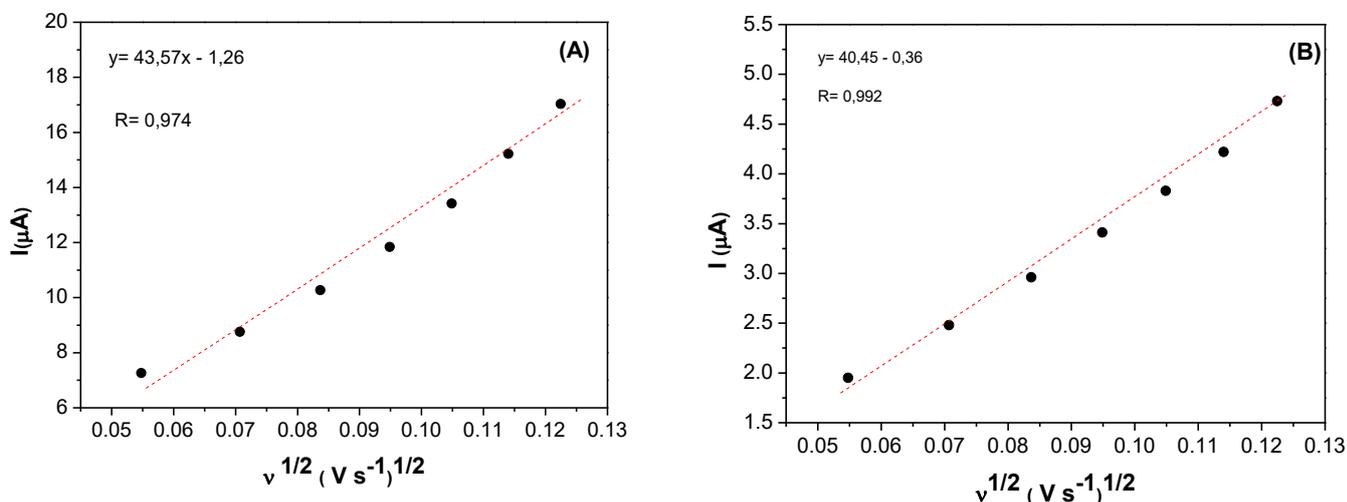
Figura 43. Voltamogramas Cíclicos de ECV/MWCNT/poli-CAP em várias velocidades de varredura em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0 na presença de 0,2 mmol L⁻¹ de DA (A) e EP (B).



Fonte: Autor desta tese, 2017.

O gráfico de corrente catalítica I_{pa} vs. a raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial ($v^{1/2}$) na faixa de velocidade de 0,003 a 0,015 V s⁻¹ foi construído para cada analito e resultou numa dependência linear, desta forma podemos concluir que o processo é controlado por difusão para interação de DA e EP com a plataforma proposta (Figura 44).

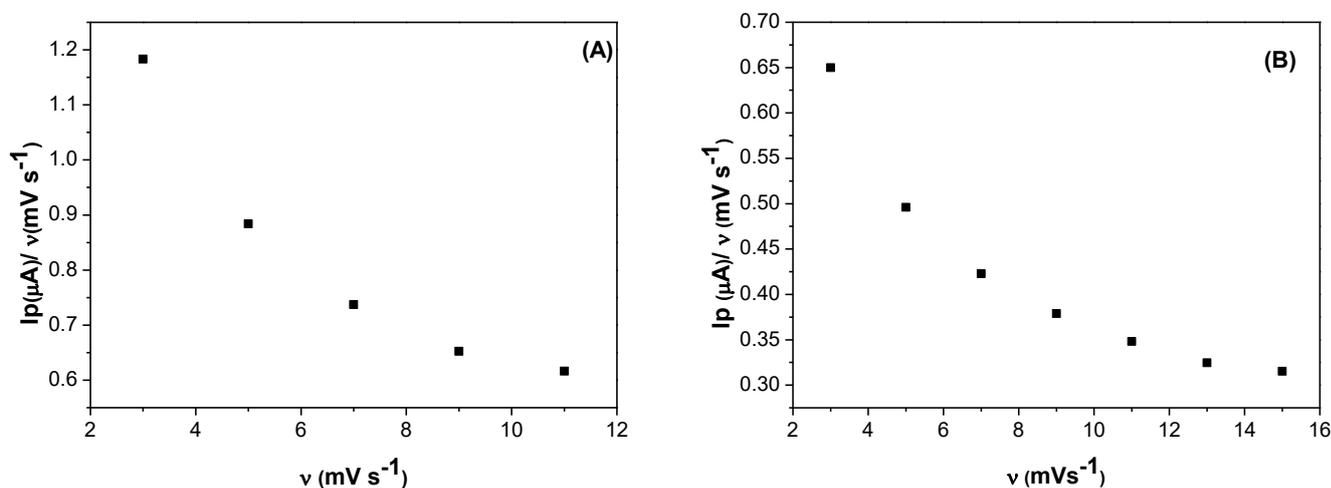
Figura 44- Variação da corrente de pico anódica I_{pa} vs. $v^{1/2}$ no ECV/MWCNT/poli-CAP, em solução contendo $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de DA (A) e EP (B). Medidas realizadas em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0 e v : $0,003\text{-}0,015 \text{ V s}^{-1}$.



Fonte: Autor desta tese, 2017.

Para comprovar que o processo de oxidação eletrocatalítica entre DA, EP e a plataforma ECV/MWCNT/poli-CAP apresenta uma etapa química acoplada, foi elaborado um gráfico da corrente de pico normalizada com a velocidade de varredura (I_{pa}/v) vs v (Figura 45) é possível observar um perfil característico de um processo eletroquímico-químico catalítico (EC_{cat}) (BARD e FAULKNER, 2001).

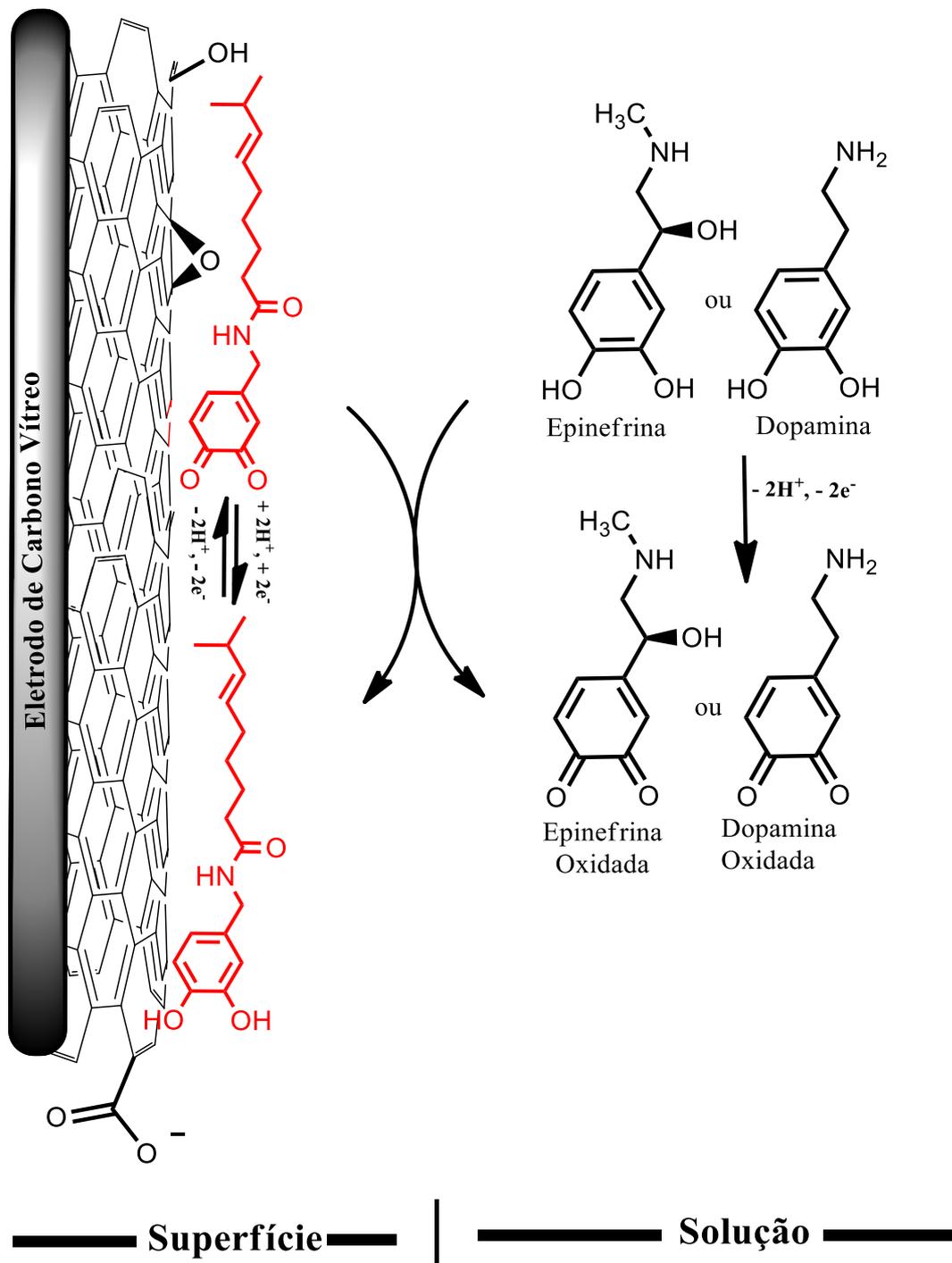
Figura 45. Variação da corrente de pico anódica normalizada I_{pa}/ν vs. ν no ECV/MWCNT/poli-CAP em solução contendo $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de DA (A) e EP (B). Medidas realizadas em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0 e ν : $0,003\text{-}0,015 \text{ V s}^{-1}$.



Fonte: Autor desta tese, 2017.

Esse mecanismo eletrocatalítico pode ser explicado através da interação entre o polímero eletroativo quinônico, gerado através da oxidação de CAP na plataforma com nanotubos de carbono através da oxidação dos substituintes metoxila e hidroxila levando à formação de quinonas. O grupo quinona do polímero eletroativo pode ser reduzido à hidroquinona por um processo de dois elétrons e dois prótons, formando um ciclo catalítico para a oxidação eletrocatalítica de DA e EP, que envolve o par redox (quinona/hidroquinona) (Figura 46), semelhante a vários mediadores redox presente na literatura (REN; LUO; LI, 2006a; SILVA et al., 2012, 2016b)

Figura 46- Modelo simplificado do mecanismo proposto para o processo de eletrocatalise de DA e EP sobre a plataforma ECV/MWCNT/poli-CAP.



Fonte: Adaptado de Lopes, 2016.

7.6 Estudos Cronoamperométricos

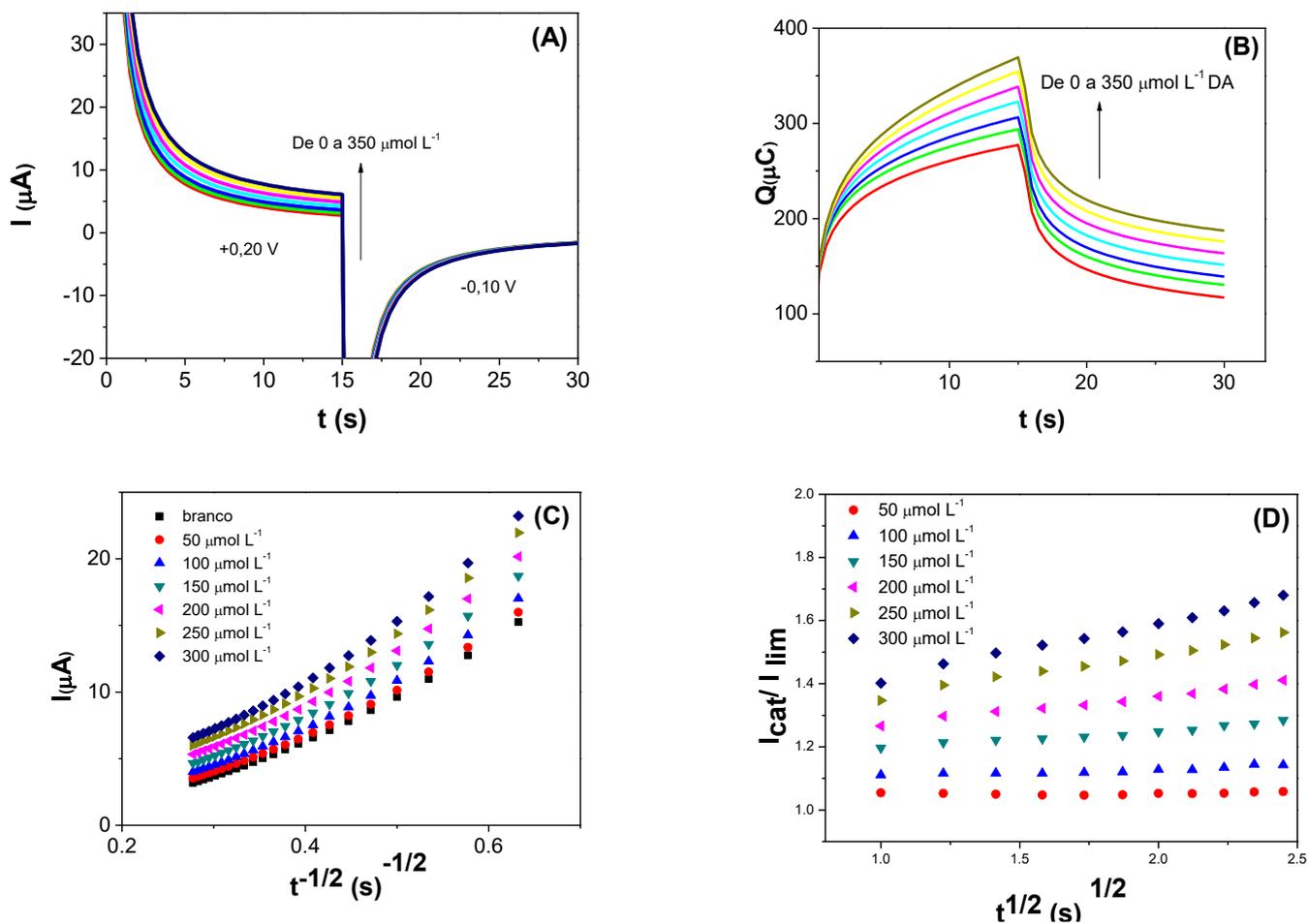
A cronoamperometria de salto de potencial foi aplicada para a investigação do processo eletrocatalítico em ECV/MWCNT/ poli-CAP da mesma forma que foi utilizado no capítulo anterior para a plataforma derivada de ácido ferúlico.

A Figura 47A apresenta uma série de cronoamperogramas bem definidos de ECV/MWCNT/poli-CAP, na presença de várias concentrações de DA com $E_{inicial} = +0,20$ V e $E_{final} = -0,10$ V vs. Ag/AgCl. Como pode ser observado na Figura 47A, não existe corrente catódica líquida correspondente à redução do mediador na presença de DA, enquanto que os cronoamperogramas de duplo salto de potencial direto e reverso para o mediador na ausência de DA, mostraram-se simétricos com um consumo de carga igual para redução e oxidação do sistema redox eletrogerado na superfície da plataforma ECV/MWCNT/poli-CAP.

O valor médio de D_{DA} , obtido a partir das inclinações de I vs. $t^{1/2}$ (Figura 47C) para DA foi $6,97 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, utilizando a mesma abordagem o valor do coeficiente de difusão para EP obtido foi $4,00 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (Figura 48).

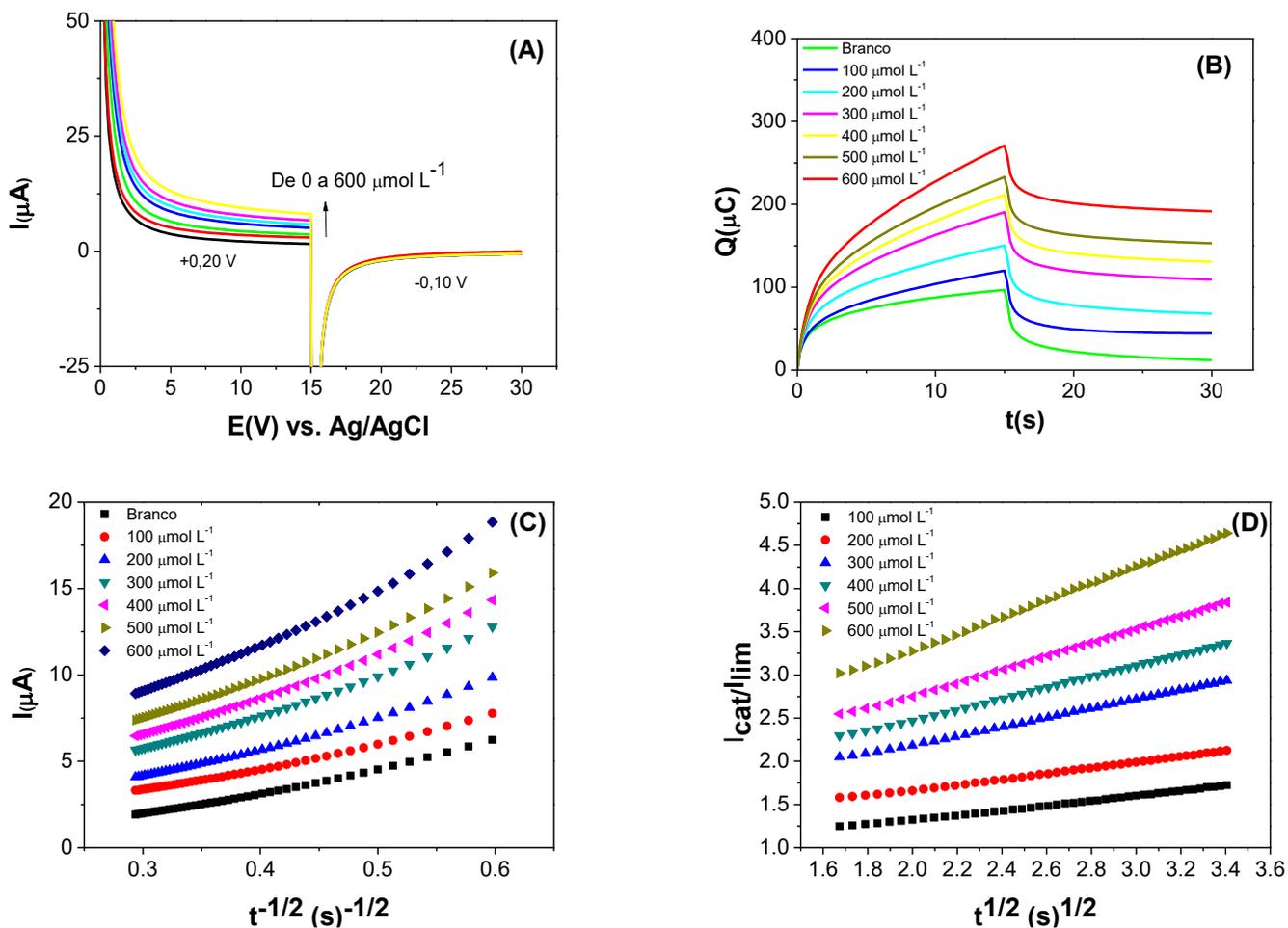
A partir das inclinações do gráfico I_{cat}/I_{Lim} vs. $t^{1/2}$ em cada concentração estudada (Figura 47D e 48D), foi possível obter o valor de k_{cat} , o qual apresentou um valor calculado na faixa de concentração estudada de $3,12 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e $2,41 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para DA e EP respectivamente.

Figura 47. (A) Cronoamperogramas de ECV/MWCNT/poli-CAP em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7.0 na ausência e presença de várias concentrações de DA, E_{inicial}= + 0,20 V e E_{final}= - 0.100 V vs. Ag/AgCl; (B) Integração dos cronoamperogramas; (C) Gráficos de I vs. $t^{1/2}$; (D) Gráficos de I_{cat}/I_{lim} vs. $t^{1/2}$.



Fonte: Autor desta tese, 2017.

Figura 48. (A) Cronoamperogramas de ECV/MWCNT/poli-CAP em tampão fosfato 0.1 mol L⁻¹ pH 7.0, na ausência e presença de várias concentrações de EP, $E_{inicial} = +0,20$ V e $E_{final} = -0,100$ V vs. Ag/AgCl; (B) Integração dos cronoamperogramas; (C) Gráfico de I vs. $t^{1/2}$; (D) Gráfico I_{cat}/I_{lim} vs. $t^{1/2}$.



Fonte: Autor desta tese, 2017.

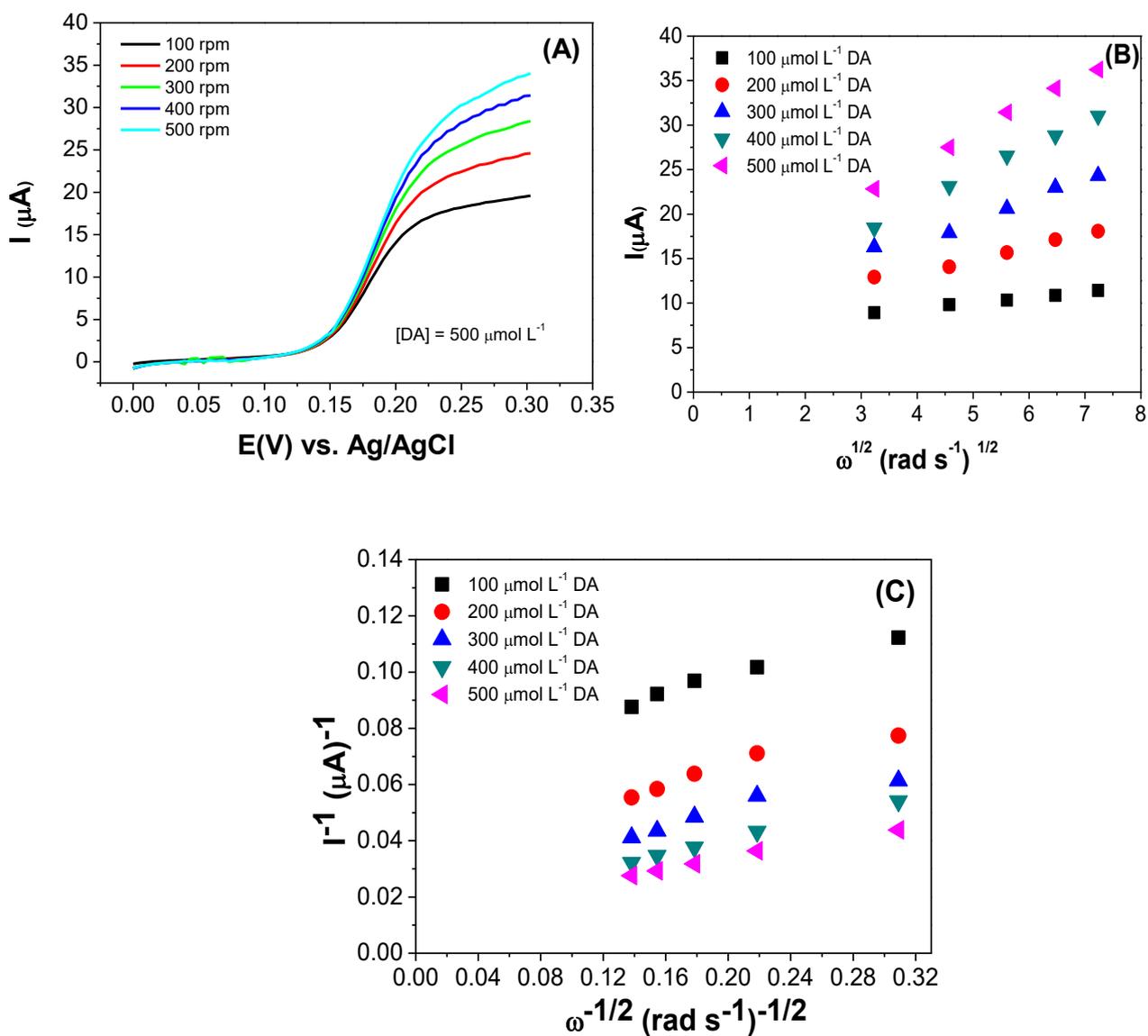
7.7 Estudos com Eletrodo de Disco Rotatório

Foram realizadas análises com eletrodo de disco rotatório para medição de parâmetros cinéticos correspondentes à oxidação eletrocatalítica de DA, utilizando ECV/MWCNT/poli-CAP. As correntes catalíticas foram obtidas em várias velocidades de rotação para diferentes concentrações de DA (Figura 49A).

Podemos observar nas Figuras 49A e 49B que a corrente de pico apresenta desvio da linearidade no gráfico de Levich, sugerindo limitação cinética quando se utilizaram velocidades de rotação elevadas.

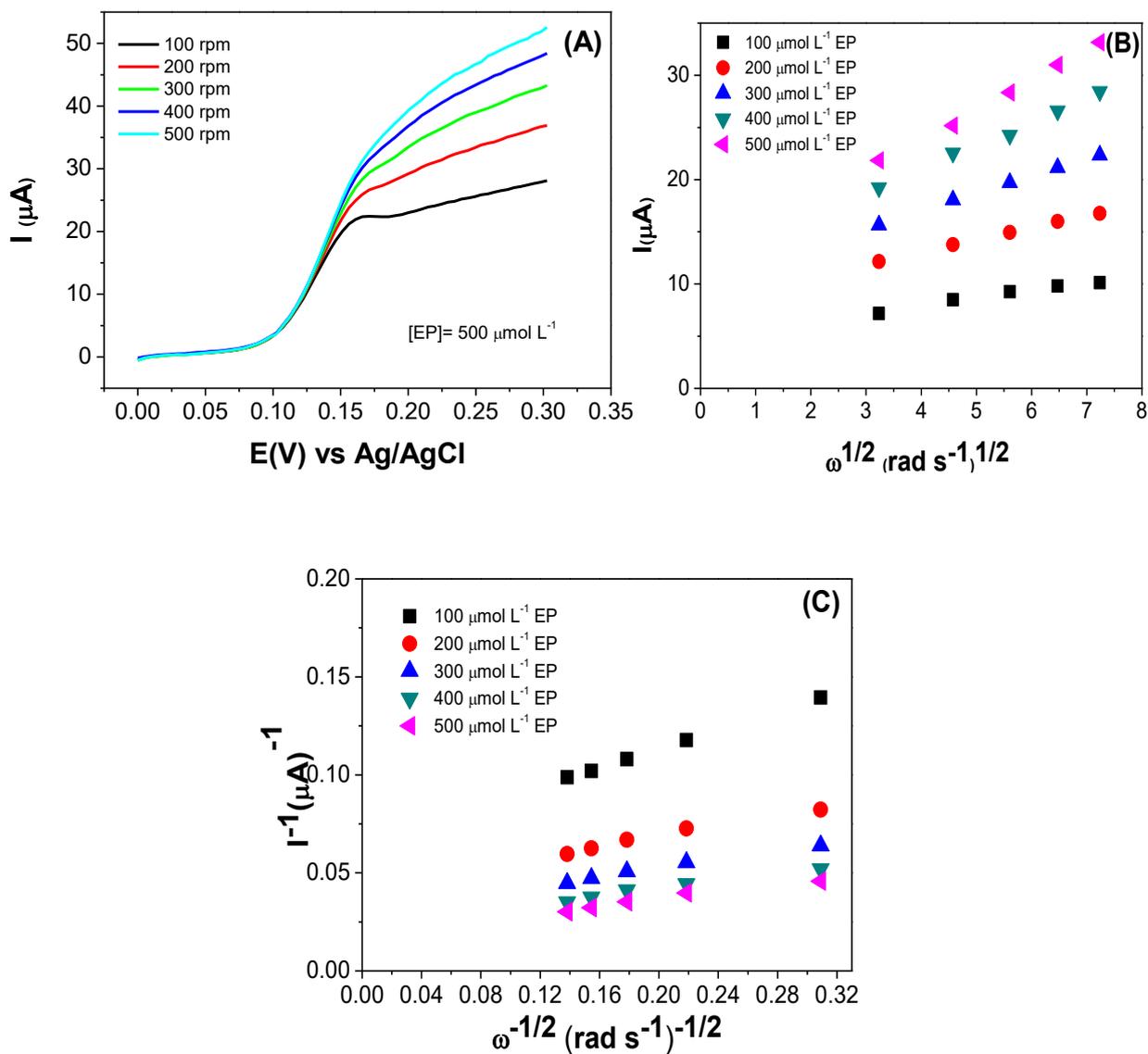
A cobertura total (Γ) foi estimada em cerca de $9,8 \times 10^{-10}$ mol cm² para utilizar nos cálculos visando a obtenção de k_{cat} . A partir do gráfico de Koutecky-Levich (Figura 49C), o valor médio para k_{cat} obtido foi de $4,79 \times 10^5$ L mol⁻¹ s⁻¹ e $5,23 \times 10^4$ L mol⁻¹ s⁻¹ para DA e EP (Figura 50), respectivamente. O resultado é próximo aos valores obtidos a partir dos experimentos cronoamperométricos.

Figura 49-(A) Voltamogramas com eletrodo de disco rotatório para oxidação de DA em várias velocidade de rotação em ECV/MWCNT/poli-CAP, tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$ e $[\text{DA}] = 500 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. (B) Gráfico de Levich para oxidação catalítica de DA no eletrodo modificado em várias concentrações. (C) Gráfico de Koutecky-Levich derivado de (B).



Fonte: Autor desta tese, 2017.

Figura 50. (A) Voltamogramas com eletrodo de disco rotatório para oxidação de DA em várias velocidade de rotação em ECV/MWCNT/poli-CAP, tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0, $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$ e $[\text{EP}] = 500 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. (B) Gráfico de Levich para oxidação catalítica de DA no eletrodo modificado em várias concentrações. (C) Gráfico de Koutecky-Levich derivado de (B).



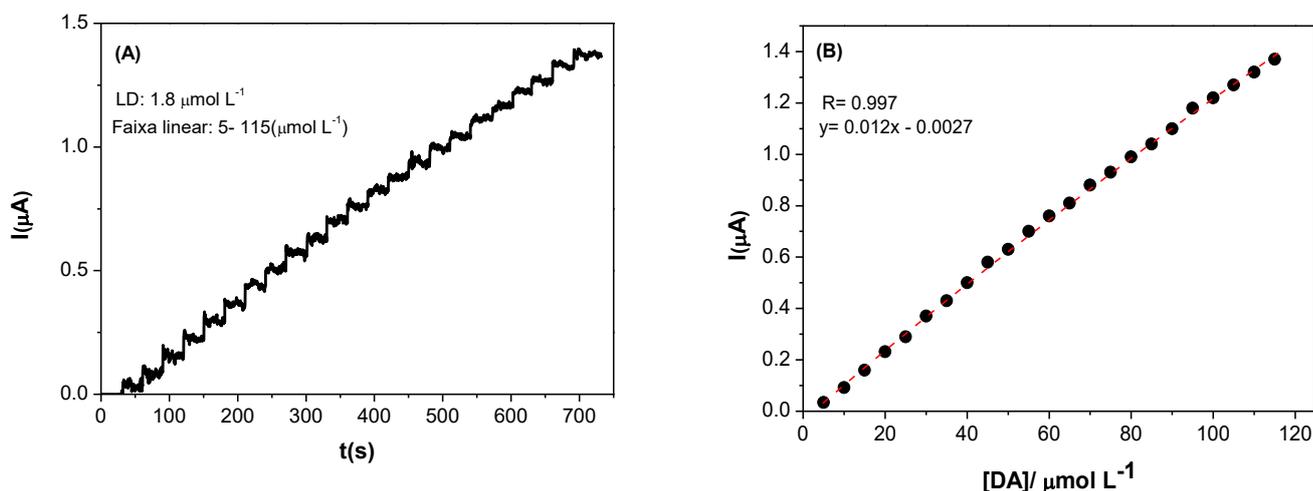
Fonte: Autor desta tese, 2017.

7.8 Detecção Amperométrica de DA e EP

As propriedades electrocatalíticas de ECV/MWCNT/poli-CAP para detecção de DA foram investigadas. A Figura 51A mostra uma curva amperométrica de ECV/MWCNT/poli-CAP com sucessivas adições de DA (pH 7,0). O melhor potencial a ser aplicado foi +0,2 V. A plataforma ECV/MWCNT/poli-CAP responde rapidamente às variações nas concentrações de DA. A relação entre a concentração de DA e o sinal de corrente para ECV/MWCNT/poli-CAP está ilustrada na Figura 51B. A corrente aumentou linearmente na faixa de 5 a 115 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($R^2 = 0,997$, $n = 24$) para detecção de DA com uma sensibilidade de 12,00 nA L μmol^{-1} , limites de detecção e quantificação de 1,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, determinados de acordo com as recomendações da IUPAC (1987). Além disso, o sensor proposto pode ser expresso de acordo com a seguinte equação:

$$\Delta I(\mu\text{A}) = -0,0027 + 0,012[\text{DA}]/\mu\text{mol L}^{-1}$$

Figura 51. (A) Medidas cronoamperométricas para a eletrooxidação de DA no ECV/MWCNT/poli-CAP obtidas em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ em pH 7,0, E_{aplicado}= +0,200 V vs. Ag/AgCl.; (B) Curva analítica para a eletrooxidação de DA no ECV/MWCNT/poli-AF, em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ em pH 7,0

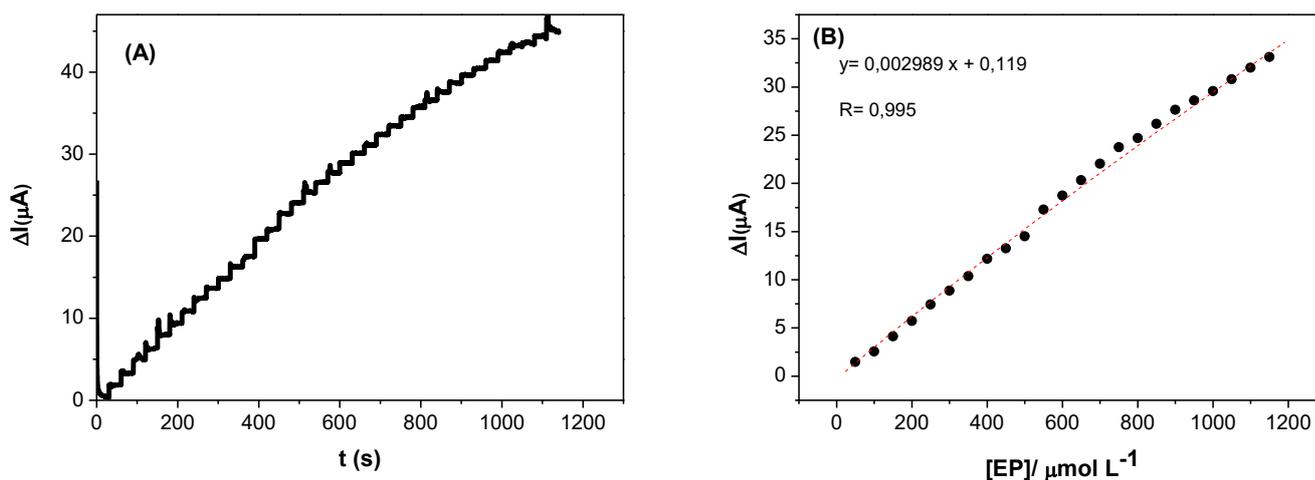


Fonte: Autor desta tese, 2017.

Para EP a corrente aumentou linearmente em uma faixa linear de 50 a 1150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($R^2 = 0,995$, $n = 23$) (Figura 52) para detecção de DA com uma sensibilidade de $2,98 \text{ nA L } \mu\text{mol}^{-1}$, limites de detecção e quantificação de $7,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $23,9 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, determinados de acordo com as recomendações da IUPAC (1987). Além disso, o sensor proposto pode ser expresso de acordo com a seguinte equação:

$$\Delta I(\mu\text{A}) = 0,119 + 0,003[\text{DA}]/\mu\text{mol L}^{-1}$$

Figura 52.(A) Medidas cronoamperométricas para a eletrooxidação de DA no ECV/MWCNT/poli-CAP obtidas em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,0, $E_{\text{aplicado}} = +0,200 \text{ V vs. Ag/AgCl.}$; (B) Curva analítica para a eletrooxidação de DA no ECV/MWCNT/poli-AF, em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,0



Fonte: Autor desta tese, 2017.

Podemos destacar que os sensores apresentados nesta tese apresentam uma ampla faixa linear e limites de detecção intermediários quando comparados com alguns trabalhos presentes na literatura (Tabelas 6 e 7), entretanto devemos destacar que o sensor proposto é de fácil preparação e os materiais utilizados são baratos quando comparados a uma série de materiais presentes na modificação dos eletrodos a seguir, além da técnica amperométrica utilizada, que tem uma alta sensibilidade e um curto tempo de análise quando comparado com técnicas voltamétricas.

Tabela 6. Comparação da plataforma ECV/MWCNT/poli-CAP para detecção eletroquímica de EP com outros eletrodos modificados.

Eletrodo de Trabalho	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Referências
CNTSSEs ^a	2,00-100,0	2,000	VALENTINI et al., 2007
Au-Cys-SWCNT-CoTAPc ^b	12,2-130,0	6,000	OZOEMENA; NKOSI; PILLAY, 2008
ECV-MWCNTCoTSPc ^c	2,44-3,00	0,450	AGBOOLA; VILAKAZI; OZOEMENA, 2009
DMSA/AuE ^d	10,00-100,0	3,500	KANG; NIU; MA, 2009
ECV/PXS ^e	2,00-390,0	0,100	ENSAFI; TAEI; KHAYAMIAN, 2010
ECV/OMC ^f	0,50-200,0	0,200	LUO et al., 2012
MCPE-MWCNT _{s_{ox}} -BTB ^g	0,80-100,0	0,800	PRADHAN et al., 2014
ECV/BR9f-MWCNTs ^h	19,60-82,5	9,000	LI et al., 2014
ECV/grafeno/SnO ₂ ⁱ	0,50-200,0	0,017	LAVANYA et al., 2015
Filme Au NP Au ^j	20,00-190,0	2,430	WIERZBICKA; SULKA, 2016
ECV/MWCNT/poli-AF	73,00-1406,0	22,20	SILVA et al., 2017
ECV/MWCNT/poli-CAP	50,0-1150	7,20	Este trabalho

a Microeletrodo modificado com nanotubos de carbono de paredes simples e aço inoxidável (AISI-316L);

b Filmes de nanotubos de carbono de paredes simples integrado ao cobalto (II) tetraaminofalocianina;

c Eletrodo de carbono vítreo modificado com cobalto (II) tetrasulfoftalocianina e nanotubos de carbono de paredes múltiplas;

d Eletrodo de ouro modificado com ácido 2,3-dimercaptosuccínico;

e Eletrodo de carbono vítreo modificado com poli(*p*-xilenolsulfonaftaleína);

f Eletrodo de carbono vítreo modificado com carbono mesoporoso ordenado;

g Eletrodo de pasta de carbono modificado com azul (BTB) poli(bromotimol) e nanotubos de carbono de paredes múltiplas;

h Nanotubos de carbono de paredes múltiplas funcionalizado com poli(basic red 9);

i Eletrodo de carbono vítreo modificado com o nanocompósito SnO₂/grafeno;

j Filmes de ouro nanoporoso altamente ordenado.

Fonte: Autor desta tese, 2017.

Tabela 7. Comparação das plataformas ECV/MWCNT/poli-AF e ECV/MWCNT/poli-CAP para detecção eletroquímica de DA com outros eletrodos modificados.

Eletrodo de Trabalho	Faixa Linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Referência
ECV/ H-GO ^a	0,5-40,0	0,17	ZOU et al., 2015
ECV/ p-TAOX/ CuNPs ^b	0,6-21,6	0,03	WANG et al., 2011
ECV/PCA ^c	1,0-40,0	0,40	LI; REN; LUO, 2007
ECV/ Fe ₃ O ₄ @CNT-N ^d	2,5-65,0	0,05	FERNANDES et al., 2014
ECV ^e	3,0-30,0	2,67	TEMOÇIN, 2013
ECV/ MWCNT/ POA ^f	9,0-48,0	0,21	ZHANG; SHI; LANG, 2011
ECV/ DNA/ PL-LEU ^g	0,1-100,0	0,04	ZHENG et al., 2015
Grafeno/SnO ₂ nanocomposito ^h	1,0-20,0	1,00	XIE et al., 2015
ECV/ MWCNT/ Poly-tir ⁱ	0,1-30,0	0,02	WANG; BI, 2013b
ECV/ MWCNT/ PVA ^j	2,0-70,0	1,40	LI; LIN, 2006
ECV/MWCNT/poli-AF	5,0-120,0	2,21	SILVA et al., 2017
ECV/MWCNT/poli-CAP	5,0-115,0	1,80	Este Trabalho

a Eletrodo de carbono vítreo/ hemina funcionalizada em óxido de grafeno;

b Nanopartículas de cobre oxidadas em filme de poli(3-amino-5-mercaptop-1,2,4-triazol) em eletrodo de carbono vítreo modificado;

c Eletrodo de carbono vítreo/poli-ácido caféico;

d Eletrodo de carbono vítreo/ nanotubos de carbono dopados com nanopartículas de Fe₃O₄;

e Modificação de eletrodo de carbono vítreo em meio básico por tratamento eletroquímico;

f Filme compósito de poli(ácido ortanílico e nanotubos de carbono de paredes múltiplas em eletrodo de carbono vítreo;

g Eletrodo de carbono vítreo/filme de DNA/poli(L-leucina)

h Nanocompósito de grafeno/SnO₂;

i Eletrodo de carbono vítreo/nanotubos de carbono de paredes múltiplas/poli-tirosina;

j Eletrodo de carbono vítreo/ poli-vinil-álcool.

Fonte: Autor desta tese, 2017.

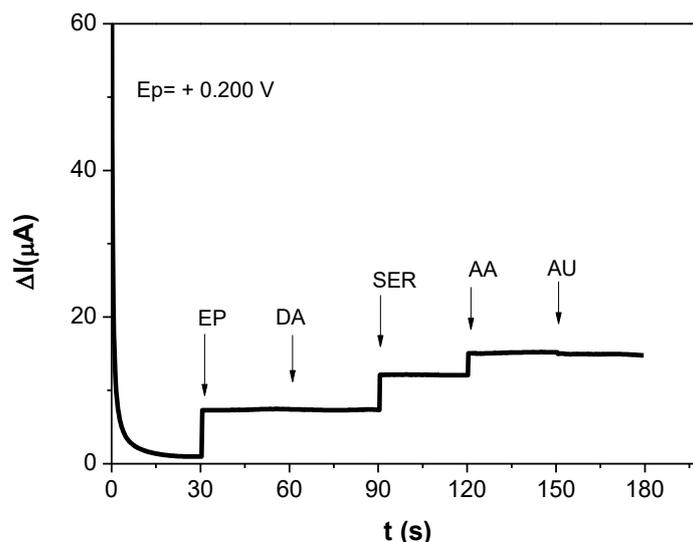
7.9 Estudo de interferentes

A seletividade do sensor foi avaliada na presença de SER, AA e AU. A Figura 53 apresenta a resposta amperométrica do eletrodo modificado quando aplicado +0,2 V com adições sucessivas de EP, DA, SER, AA e AU.

De acordo com os resultados apresentados no cronoamperograma, SER e AA interferiram nos resultados, uma vez que é possível oxidá-los, com o mesmo potencial de EP e DA. Entretanto, AU não interferiu na resposta do eletrodo. A interferência de AA pode ser minimizada, com a utilização de ascorbato oxidase e incorporação Nafion, ressaltando que a plataforma proposta uma maior sensibilidade para detecção

de DA quando comparada com EP e em algumas matrizes como amostras de urina a concentração de EP é cerca de três vezes menor do que DA (CINCOTTO; CANEVARI; CAMPOS, 2014)

Figura 53. Resposta Amperométrica de ECV/MWCNT/poli-CAP em adições de EP, DA, SER, AA e AU na mesma concentração ($200 \mu\text{mol L}^{-1}$), em tampão fosfato pH 7,0, potencial aplicado de +0,2 V.



Fonte: Autor desta tese, 2017.

7.10 Análises de amostras reais e testes de recuperação

O método proposto foi aplicado para a determinação de DA e EP em amostras farmacêuticas utilizando o método de adição padrão. As amostras de DA e EP foram diluídas em tampão fosfato pH 7,0. Essa diluição ajuda a reduzir os efeitos de matriz em amostras reais. Para confirmar os resultados, as amostras farmacêuticas foram fortificadas com soluções padrões de DA e EP depois as quantidades totais foram detectadas.

Os valores de recuperação das amostras fortificadas foram de 101% e 98% para DA e EP respectivamente, utilizando detecção amperométrica (Tabela 8). Os testes de recuperação foram realizados utilizando amostras reais, com DA ($c = 2,64 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) e EP ($c = 5,46 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). Em seguida alíquotas de 19,01 μL e 91,60

μL de DA e EP, respectivamente, foram colocadas na célula eletroquímica (5 mL) e quantificadas por amperometria.

Tabela 8. Determinação de DA em amostras farmacêuticas

	DA	EP
Detectado ($\mu\text{mol L}^{-1}$) ^a	100	100
Adicionado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	100	100
Após Adição ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	202,4	198
Recuperação (%)	101,2	98
D.P. R. (%) ^b	1.82	1,05

^a Número de amostras analisadas, 3.

^b Desvio padrão relativo

Fonte: Autor desta tese, 2017.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na primeira parte do trabalho, trabalhamos com 3-NT em meio prático para avaliar a eletroquímica orgânica desta substância, sendo até o presente momento, o primeiro grupo a avaliar os mecanismos deste biomarcador do estresse oxidativo. Também foi desenvolvido um sensor para detectar 3-NT baseado em nanotubos de carbono, o qual apresentou limites de detecção de $0,42 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $1,83 \mu\text{mol L}^{-1}$, relacionados às análises na redução e oxidação respectivamente. O sensor eletroquímico mostrou-se promissor para 3-NT. Vale a pena destacar também que na literatura estão presentes poucos trabalhos que realizam este tipo de trabalho com detecção eletroquímica. O presente método é de fácil manuseio e baixo custo quando comparado aos métodos cromatográficos tradicionais para detecção de 3-NT.

Na segunda parte, prosseguimos com estudos com uma plataforma baseada em nanotubos de carbono e ácido ferúlico desenvolvida em nosso grupo. A plataforma apresentou boa sensibilidade, ampla faixa linear ($5\text{-}120 \mu\text{mol L}^{-1}$) e limite de detecção de $2,21 \mu\text{mol L}^{-1}$ para detecção de DA e ótimos valores de recuperação para este analito em amostras farmacêuticas.

Na terceira parte foi desenvolvido um sensor baseado em nanotubos de carbono e polímero eletrogerado a partir da oxidação de capsaicina para detecção de EP e DA. Para DA, o limite de detecção obtido foi de $1,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ e faixa linear de $5\text{-}115 \mu\text{mol L}^{-1}$. Os parâmetros analíticos obtidos para detecção de EP foram os seguintes: faixa linear: $50\text{-}1150 \mu\text{mol L}^{-1}$ e limite de detecção de $7,2 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Este trabalho demonstrou que as plataformas nanoestruturadas desenvolvidas são capazes de realizar a detecção de 3-NT, DA e EP com boas estabilidade e sensibilidade, abrindo a possibilidade de outras aplicações importantes e para estudos em fluidos biológicos e desenvolvimento de novas plataformas baseadas em materiais de carbono, poli-AF e poli-CAP.

Diante do apresentado, a adaptação da interface eletroquímica com montagens moleculares redox é uma das fascinantes abordagens no desenvolvimento de plataformas versáteis para aplicações catalíticas e sensoriais. Moléculas redox

adsorvidas em plataformas eletródicas apresentam um papel importante no controle da reação de transferência de elétrons na interface eletrodo/solução.

Vale salientar que a escolha do melhor mediador redox e a melhor forma de incorporá-lo na configuração dos eletrodos para cada aplicação é fundamental para o comportamento eletroquímico do sensor resultante.

A busca e a demanda do mediador perfeito são relevantes como apresentado nos inúmeros trabalhos citados nesta tese, e a escolha racional do mediador ainda é um desafio, uma vez que o mesmo deve ser pensado de forma a buscar uma melhor interação entre o analito alvo e a plataforma eletródica, capaz de minimizar interferentes e proporcionar baixos potenciais para os processos redox, como exemplificado em trabalhos de Francke e Little (2014), no qual descrevem o planejamento racional de mediadores redox, da classe dos fenantroimidazóis nitro-substituídos, via métodos computacionais (FRANCKE; LITTLE, 2014).

Verifica-se que o campo da transferência de elétrons indireta (mediada) constitui campo promissor para pesquisas. Com o aumento da nossa capacidade em manipular de forma precisa e imaginativa a natureza química da interface eletrodo/solução, pode-se esperar que as aplicações se expandam e aplicações completamente novas sejam desenvolvidas.

A dificuldade em elucidar mecanismos e estruturas dos compostos eletrogerados, *in situ*, na superfície do eletrodo, é outro ponto que requer grande atenção afim de estabelecer planejamento racional na escolha do mediador ao invés do desperdício de tempo em tentativas e erros. Acreditamos que a incorporação de métodos espectroscópicos hifenados, diretamente na superfície do eletrodo (em conjunto com FTIR, Raman, RMN, EM e outros) nesses trabalhos vem permitindo a obtenção de dados úteis para estabelecer mecanismos comprovados. Limitações ainda são verificadas em termos estruturais, uma vez que a maioria dos resultados ainda é obtida com moléculas de baixo peso molecular.

9 CONCLUSÓES

Este trabalho relata a construção de diferentes plataformas nanoestruturadas baseados em nanotubos de carbono de paredes múltiplas e/ou funcionalizados com polímeros eletrogerados de ácido ferúlico e capsaicina ativados *in situ*. Estes processos de modificação com nanotubos e/ou ativação promoveram a formação de pares redox que possibilitam o desenvolvimento com sucesso de sensores eletroquímicos, sendo uma alternativa viável para a determinação de 3-NT, dopamina e epinefrina.

A maioria dos objetivos foi alcançada neste trabalho, sendo ainda necessário a caracterização estrutural das plataformas baseadas em ácido ferúlico e capsaicina, estes sensores mostraram-se úteis para determinação de dopamina e epinefrina, em formulações farmacêuticas, com alta sensibilidade para dopamina.

A plataforma baseada em nanotubos de carbono para determinação de 3-NT apresentou limitações em termos de sensibilidade, mas, vale ressaltar que a literatura apresenta poucos estudos eletroquímicos com 3-NT, sendo de extrema relevância estabelecer o comportamento redox em meio prático deste importante biomarcador do estresse oxidativo.

Os sensores propostos são de fácil preparação quando comparado a vários materiais envolvidos na modificação de eletrodos presentes na literatura.

Nosso levantamento bibliográfico sobre sensores baseados em compostos fenólicos nos levou a concluir que ainda há muito a ser feito nesta área, principalmente pela necessidade de padronização em metodologias e técnicas para estabelecer uma melhor comparação entre os diferentes mediadores afim de verificar aquele que apresenta melhores parâmetros cinéticos e analíticos para um dado analito.

Enfim, acreditamos que esta tese apresenta inúmeras contribuições que permitem o desenvolvimento de novos dispositivos baseados nos materiais presentes neste trabalho, além do levantamento bibliográfico que possibilita verificar limitações e propor avanços na área de sensores eletroquímicos.

PERSPECTIVAS

- Construção de novos sensores eletroquímicos com a utilização de diferentes modificadores como nanopartículas de ouro, grafeno, líquidos iônicos, entre outros, visando aumentar sensibilidade e seletividade para aplicações em matrizes biológicas e/ou de alimentos.
- Estudo de interferentes eletroativos para detecção de 3-NT;
- Desenvolvimento de novos eletrodos modificados para detecção de 3-NT;
- Detecção dos analitos presentes neste trabalho em fluidos biológicos, utilizando os diferentes sensores desenvolvidos nesta tese;
- Elucidação dos polímeros eletrogerados a partir de ácido ferúlico e capsaïcina em nanotubos de carbono, empregando métodos de análise in situ, hifenados.
- Utilização das plataformas para construção de biossensores enzimáticos.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-HAMID, R.; NEWAIR, E. F. Voltammetric determination of polyphenolic content in pomegranate juice using a poly(gallic acid)/multiwalled carbon nanotube modified electrode. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 7, n. 1, p. 1104–1112, 2016.
- 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 & bioelectronics**, v. 17, n. 11–12, p. 913–9, dez. 2002.
- AGBOOLA, B. O.; VILAKAZI, S. L.; OZOEMENA, K. I. Electrochemistry at cobalt(II)tetrakisulfophthalocyanine-multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode: A sensing platform for efficient suppression of ascorbic acid in the presence of epinephrine. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 13, n. 9, p. 1367–1379, 2009.
- AHSAN, H. **3-Nitrotyrosine: A biomarker of nitrogen free radical species modified proteins in systemic autoimmunogenic conditions** **Human Immunology**, 2013.
- AJAYAN, P. M. Nanotubes from Carbon. **Chemical reviews**, v. 99, n. 7, p. 1787–1800, 1999.
- AJAYAN, P. M.; TOUR, J. M. Materials Science: Nanotube composites. **Nature**, v. 447, n. June, p. 1066, 2007.
- ANDRES, T.; ECKMANN, 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**, v. 92, p. 257–268, 2013.
- BARATHI, P.; KUMAR, A. S. Quercetin tethered pristine-multiwalled carbon nanotube modified glassy carbon electrode as an efficient electrochemical detector for flow injection analysis of hydrazine in cigarette tobacco samples. **Electrochimica Acta**, v. 135, p. 1–10, 2014.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutricao**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.
- BARD, A.; FAULKNER, L. Allen J. Bard and Larry R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, New York: Wiley, 2001. **Russian Journal of Electrochemistry**, v. 38, n. 12, p. 1505–1506, 2002.
- BARRETO, W. .; PONZONI, S.; SASSI, P. A Raman and UV-Vis study of catecholamines oxidized with Mn(III). **Spectrochimica Acta Part A**, v. 55, p. 65–72, 1998.
- 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**, v. 881, p. 1–23, 2015.
- BARTESAGHI, S. et al. **Protein tyrosine nitration in hydrophilic and hydrophobic environments** **Amino Acids**, 2007.
- CALAS-BLANCHARD, C.; CATANANTE, G.; NOGUER, T. Electrochemical Sensor

and Biosensor Strategies for ROS/RNS Detection in Biological Systems. **Electroanalysis**, v. 26, n. 6, p. 1277–1286, 2014.

CARRERA, V. et al. A simple and rapid HPLC-MS method for the simultaneous determination of epinephrine, norepinephrine, dopamine and 5-hydroxytryptamine: Application to the secretion of bovine chromaffin cell cultures. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 847, n. 2, p. 88–94, 2007.

CASERO, E. et al. Electrochemically Triggered Reaction of a Surface-Confined Reagent: Mechanistic and EQCM Characterization of Redox-Active Self-Assembling Monolayers Derived from 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) and Related Materials. **Langmuir**, v. 15, n. c, p. 127–134, 1999.

CASTRO, V. G. et al. Tailored degree of functionalization and length preservation of multiwalled carbon nanotubes by an Optimized Acid Treatment Process. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 7, p. 1158–1166, 2017.

CHAMBERS, J. Q. Electrochemistry of quinones. In: **The Quinonoid Compounds (1988)**. [s.l: s.n.]. p. 719–757.

CINCOTTO, F. H.; CANEVARI, T. C.; CAMPOS, A. M. Simultaneous determination of epinephrine and dopamine by electrochemical reduction on the hybrid material SiO₂ / graphene oxide decorated with Ag nanoparticles. **Analyst**, p. 4634–4640, 2014.

CIOBANU, M. et al. 1 - Fundamentals. **Handbook of Electrochemistry**, p. 3–11, 2007.

CIUCU, A. A. Chemically Modified Electrodes in Biosensing. **Journal of Biosens Bioelectron**, v. 5, n. 3, p. 1–10, 2014a.

CIUCU, A. A. Chemically Modified Electrodes in Biosensing. **Journal of Biosens Bioelectron**, v. 5, n. 3, p. 1–10, 2014b.

CLARKSON, P. M.; THOMPSON, H. S. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? **The American journal of clinical nutrition**, v. 72, n. 2 Suppl, p. 637S–46S, 2000.

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: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 860, n. 1, p. 78–85, 2007.

COSTA, E. **DESENVOLVIMENTO DE SENSOR NANOESTRUTURADO E BIOSSENSOR DE dsDNA PARA DETERMINAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS DE INTERESSE BIOLÓGICO: NITROTIROSINA, ÁCIDO ASCÓRBICO E ÁCIDO ÚRICO**. [s.l: s.n.].

D'ORAZIO, P. **Biosensors in clinical chemistry - 2011 update** *Clinica Chimica Acta*, 2011.

DALLE-DONNE, I. et al. **Biomarkers of oxidative damage in human disease** *Clinical Chemistry*, 2006.

DAVISON, A. **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects**.

Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry, v. 52, n. 8, p. 1021, 1989.

DEY, R. S. et al. Electrochemically derived redox molecular architecture: A novel electrochemical interface for voltammetric sensing. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 2, n. 5, p. 1355–1360, 2010.

DICU, D. et al. Indophenol and O-quinone derivatives immobilized on zirconium phosphate for NADH electro-oxidation. **Analytical Letters**, v. 36, n. 9, p. 1755–1779, 2003.

DU, J.; SHEN, L.; LU, J. Flow injection chemiluminescence determination of epinephrine using epinephrine-imprinted polymer as recognition material. **Analytica Chimica Acta**, v. 489, n. 2, p. 183–189, 2003.

DUMITRESCU, I.; UNWIN, P. R.; MACPHERSON, J. V. Electrochemistry at carbon nanotubes: perspective and issues. **Chemical Communications**, v. 7345, n. (45), p. 6886–6901, 2009.

DUNCAN, M. W. A review of approaches to the analysis of 3-nitrotyrosine. **Amino Acids**, v. 25, n. 3–4, p. 351–361, 2003.

EDWARDS, G. A.; BERGREN, A. J.; PORTER, M. D. Chemically modified electrodes. In: **Handbook of Electrochemistry**. [s.l: s.n.]. p. 295–327.

EGUÍLAZ, M. et al. Covalent functionalization of single-walled carbon nanotubes with polytyrosine: Characterization and analytical applications for the sensitive quantification of polyphenols. **Analytica Chimica Acta**, v. 909, p. 51–59, 2016.

ENACHE, T. A.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Phenol and para-substituted phenols electrochemical oxidation pathways. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 655, n. 1, p. 9–16, maio 2011.

ENSAFI, A. A.; TAEI, M.; KHAYAMIAN, T. Simultaneous determination of ascorbic acid, epinephrine, and uric acid by differential pulse voltammetry using poly(p-xylenolsulfonephthalein) modified glassy carbon electrode. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 79, n. 2, p. 480–487, 2010.

EŽERSKIS, Z.; JUSYS, Z. Electropolymerization of chlorinated phenols on a Pt electrode in alkaline solution part I: A cyclic voltammetry study. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 31, n. 10, p. 1117–1124, 2001.

FERAPONTOVA, E. E. Electrochemical Analysis of Dopamine: Perspectives of Specific In Vivo Detection. **Electrochimica Acta**, v. 245, p. 664–671, 2017.

FERNANDES, D. M. et al. Novel electrochemical sensor based on N-doped carbon nanotubes and Fe₃O₄ nanoparticles: Simultaneous voltammetric determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 432, p. 207–213, 2014.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L. S. Defesa E Estresse Oxidativo. **Medicina**, v. 43, n. 1, p. 61–68, 1997.

FERREIRA, D. C. et al. Molecular modeling study on the possible polymers formed during the electropolymerization of 3-hydroxyphenylacetic acid. **Journal of molecular graphics & modelling**, v. 34, p. 18–27, abr. 2012.

FERREIRA, L. F. et al. Formation of novel polymeric films derived from 4-

hydroxybenzoic acid. **Materials Chemistry and Physics**, v. 129, n. 1–2, p. 46–52, 2011.

FERREIRA, M. et al. Electrode passivation caused by polymerization of different phenolic compounds. **Electrochimica Acta**, v. 52, n. 2, p. 434–442, out. 2006.

FOTOPOULOU, M. A.; IOANNOU, P. C. Post-column terbium complexation and sensitized fluorescence detection for the determination of norepinephrine, epinephrine and dopamine using high-performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 462, n. 2, p. 179–185, 2002.

FRANCKE, R.; LITTLE, R. D. Optimizing electron transfer mediators based on arylimidazoles by ring fusion: Synthesis, electrochemistry, and computational analysis of 2-aryl-1-methylphenanthro[9,10-d]imidazoles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 136, n. 1, p. 427–435, 2014.

FREITAS, M.; LIMA, J. L. F. C.; FERNANDES, E. Optical probes for detection and quantification of neutrophils' oxidative burst. A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 649, n. 1, p. 8–23, 2009.

GALUS, Z. **Fundamentals of Electrochemical Analysis**. New York: Ellis Horwood Press, 1976.

GORTON, L.; DOMÍNGUEZ, E. Electrocatalytic oxidation of NAD(P)H at mediator-modified electrodes. **Reviews in Molecular Biotechnology**, v. 82, n. 4, p. 371–392, 2002.

GOVINDHAN, M.; ADHIKARI, B.-R.; CHEN, A. Nanomaterials-based electrochemical detection of chemical contaminants. **RSC Adv.**, v. 4, n. 109, p. 63741–63760, 2014.

GREEN, K.; BRAND, M. D.; MURPHY, M. P. Prevention of Mitochondrial Oxidative Damage As A Therapeutic Strategy in Diabetes. **Diabetes**, v. 53, n. SUPPL. 1, 2004.

GUSTAFSSON, H. et al. A comparison of two formulations of intradermal capsaicin as models of neuropathic pain in healthy volunteers. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 68, n. 4, p. 511–517, 2009.

HALLIWELL, B. What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxynitrite formation in vivo. **FEBS Letters**, v. 411, n. 2–3, p. 157–160, 1997.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British journal of pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 231–55, 2004.

HAN, H. S. et al. Electrochemical oxidation and determination of dopamine in the presence of AA using ferulic acid functionalized electrochemically reduced graphene. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 204, p. 289–296, 2014.

HE, J.-B. et al. A quercetin-modified biosensor for amperometric determination of uric acid in the presence of ascorbic acid. **Analytica chimica acta**, v. 585, n. 2, p. 337–43, 7 mar. 2007.

HERRERO-LATORRE, C. et al. **Characterization of carbon nanotubes and analytical methods for their determination in environmental and biological samples: A review** *Analytica Chimica Acta*, 2015.

HOOD, L. et al. Systems biology and new technologies enable predictive and

preventative medicine. **Science (New York, N.Y.)**, v. 306, n. 5696, p. 640–643, 2004.

HUANG, D.; BOXIN, O. U.; PRIOR, R. L. **The chemistry behind antioxidant capacity assays** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005.

IJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, v. 354, p. 56–58, 1991.

JACOBS, C. B.; PEAIRS, M. J.; VENTON, B. J. Review: Carbon nanotube based electrochemical sensors for biomolecules. **Analytica Chimica Acta**, v. 662, n. 2, p. 105–127, 2010.

JUSTINO, C. I. L. et al. Review of analytical figures of merit of sensors and biosensors in clinical applications. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 10, p. 1172–1183, 2010.

KACHOOSANGI, R. T.; WILDGOOSE, G. G.; COMPTON, R. G. Carbon nanotube-based electrochemical sensors for quantifying the “heat” of chilli peppers: the adsorptive stripping voltammetric determination of capsaicin. **The Analyst**, v. 133, n. 7, p. 888–895, 2008.

KANG, W. J.; NIU, L. M.; MA, L. 2,3-Dimercaptosuccinic acid self-assembled gold electrode for the simultaneous determination of epinephrine and dopamine. **Chinese Chemical Letters**, v. 20, n. 2, p. 221–224, 2009.

KARTSOVA, L. A et al. Determination of Catecholamines by Capillary Electrophoresis and Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. **Text**, v. 59, n. 8, p. 737–741, 2004.

KIMMEL, D. W. et al. Electrochemical Sensors and Biosensors 2012. **Analytical chemistry**, v. 84, n. 2, p. 685–707, 2012.

KOCHIUS, S. et al. **Immobilized redox mediators for electrochemical NAD(P)⁺ regeneration** *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012.

KOURY, C. J.; DONANGELO, C. M. Zinco , estresse oxidativo e atividade física Zinc , oxidative stress and physical activity. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 4, p. 433–441, 2003.

KVETNANSKY, R.; SABBAN, E. L.; PALKOVITS, M. Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. **Physiological reviews**, v. 89, n. 2, p. 535–606, 2009.

LABIB, M.; SARGENT, E. H.; KELLEY, S. O. Electrochemical Methods for the Analysis of Clinically Relevant Biomolecules. **Chemical reviews**, v. 116, p. 9001–9090, 2016.

LANE, R.; HUBBARD, A. Electrochemistry of chemisorbed molecules. I. Reactants connected to electrodes through olefinic substituents. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 77, n. 11, p. 1401–1410, 1973.

LAVANYA, N. et al. Simultaneous electrochemical determination of epinephrine and uric acid in the presence of ascorbic acid using SnO₂/graphene nanocomposite modified glassy carbon electrode. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 221, p. 1412–1422, 2015.

LEE, P. T. et al. Electrochemical detection of glutathione using a poly(caffeic acid)

nanocarbon composite modified electrode. **Electroanalysis**, v. 26, n. 2, p. 366–373, 2014.

LI, N. B.; REN, W.; LUO, H. Q. Simultaneous voltammetric measurement of ascorbic acid and dopamine on poly(caffeic acid)-modified glassy carbon electrode. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 12, n. 6, p. 693–699, 2007.

LI, N. B.; REN, W.; LUO, H. Q. Simultaneous voltammetric measurement of ascorbic acid and dopamine on poly(caffeic acid)-modified glassy carbon electrode. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 12, n. 6, p. 693–699, 2008.

LI, Y. et al. Poly(basic red 9) doped functionalized multi-walled carbon nanotubes as composite films for neurotransmitters biosensors. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 118, p. 133–139, 2014.

LI, Y.; LIN, X. Simultaneous electroanalysis of dopamine, ascorbic acid and uric acid by poly (vinyl alcohol) covalently modified glassy carbon electrode. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 115, p. 134–139, 2006.

LIMA, P. R. et al. Electrocatalytic activity of 4-nitrophthalonitrile-modified electrode for the l-glutathione detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, n. 4–5, p. 758–764, 2008.

LOPES, C. B. **DESENVOLVIMENTO DE SENSORES EELTROQUÍMICOS COM UTILIZAÇÃO DE NANOTUBOS DE CARBONO E DIFERENTES MEDIADORES NA DETERMINAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E EPINEFRINA**. [s.l: s.n.].

LOPES, C. B. et al. Electrocatalytic activity of activated niclosamide on multi-walled carbon nanotubes glassy carbon electrode toward NADH oxidation. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 19, n. 9, p. 2819–2829, 2015.

LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. Electrochemical sensors: Fundamentals and applications in microenvironments . **Quimica Nova**, v. 29, n. 6, p. 1318–1325, 2006.

LUO, L. et al. Simultaneous determination of epinephrine and uric acid at ordered mesoporous carbon modified glassy carbon electrode. **Analytical Methods**, v. 4, n. 8, p. 2417, 2012.

MANAIA, M. A. N. et al. Guaicollic spices curcumin and capsaicin electrochemical oxidation behaviour at a glassy carbon electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 682, p. 83–89, 2012.

MARC, D. T. et al. **Neurotransmitters excreted in the urine as biomarkers of nervous system activity: Validity and clinical applicability** **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 2011.

MAYNE, S. T. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. **The Journal of nutrition**, v. 133 Suppl, n. 2, p. 933S–940S, 2003.

MEDINA, M. A. et al. Biogenic amines and polyamines: similar biochemistry for different physiological missions and biomedical applications. **Critical reviews in biochemistry and molecular biology**, v. 38, n. 1, p. 23–59, 2003.

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**, v. 40, n. 1, p. 336–341, 2013.

MOGHADDAM, A. B. et al. Electrochemical behavior of caffeic acid at single-walled carbon nanotube:graphite-based electrode. **Biophysical Chemistry**, v. 128, n. 1, p. 30–37, 2007.

MÜLAZIMOĞLU, İ. E. Electrochemical determination of copper(II) ions at naringenin-modified glassy carbon electrode: application in lake water sample. **Desalination and Water Treatment**, v. 44, n. 1–3, p. 161–167, 2012.

NAGARAJA, P.; VASANTHA, R. A.; SUNITHA, K. R. A sensitive and selective spectrophotometric estimation of catechol derivatives in pharmaceutical preparations. **Talanta**, v. 55, n. 6, p. 1039–1046, 2001a.

NAGARAJA, P.; VASANTHA, R. A.; SUNITHA, K. R. A new sensitive and selective spectrophotometric method for the determination of catechol derivatives and its pharmaceutical preparations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 25, n. 3–4, p. 417–424, 2001b.

NAYAK, S. et al. Point-of-Care Diagnostics: Recent Developments in a Connected Age. **Analytical Chemistry**, p. acs.analchem.6b04630, 2016.

NGAMCHUEA, K. et al. Planar diffusion to macro disc electrodes-what electrode size is required for the Cottrell and Randles-Sevcik equations to apply quantitatively? **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 18, n. 12, p. 3251–3257, 2014.

OKUMURA, L. L. et al. Modifying glassy carbon (GC) electrodes to confer selectivity for the voltammetric detection of L-cysteine in the presence of DL-homocysteine and glutathione. **Electroanalysis**, v. 20, n. 8, p. 916–918, 2008.

OLIVEIRA, R. M. L. et al. Electrochemical and morphological studies of an electroactive material derived from 3-hydroxyphenylacetic acid: a new matrix for oligonucleotide hybridization. **Journal of Materials Science**, v. 45, n. 2, p. 475–482, 22 out. 2009.

OZOEMENA, K. I.; NKOSI, D.; PILLAY, J. Influence of solution pH on the electron transport of the self-assembled nanoarrays of single-walled carbon nanotube-cobalt tetra-aminophthalocyanine on gold electrodes: Electrocatalytic detection of epinephrine. **Electrochimica Acta**, v. 53, n. 6, p. 2844–2851, 2008.

OZTEKIN, Y. et al. Square wave voltammetry based on determination of copper (II) ions by polylyuteolin- and polykaempferol-modified electrodes. **Talanta**, v. 85, n. 2, p. 1020–1027, 2011.

PARIENTE, F. et al. Electrodeposition of redox-active films of dihydroxybenzaldehydes and related analogs and their electrocatalytic activity toward NADH oxidation. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 18, p. 3135–3142, 1996.

PEASTON, R. T.; WEINKOVE, C. Measurement of catecholamines and their metabolites. **Annals of clinical biochemistry**, v. 41, n. Pt 1, p. 17–38, 2004.

PODESHVO, I. V et al. Polymeric Materials Derived from Vanillic Acid. v. 75, n. 5, p. 777–780, 2002.

PRADHAN, P. et al. Electropolymerization of bromothymol blue on carbon paste

electrode bulk modified with oxidized multiwall carbon nanotubes and its application in amperometric sensing of epinephrine in pharmaceutical and biological samples. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 732, p. 30–37, 2014.

PRIETO-SIMÓN, B.; FÀBREGAS, E. Comparative study of electron mediators used in the electrochemical oxidation of NADH. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 19, n. 10, p. 1131–1138, 2004.

PURVES, D. et al. **Neuroscience. 2nd edition.**

RADI, R. Protein tyrosine nitration: Biochemical mechanisms and structural basis of functional effects. **Accounts of Chemical Research**, v. 46, n. 2, p. 550–559, 2013.

RAPPOPORT, Z. **The Chemistry of Phenols** John Wiley & Sons, 2003.

RATTANARAT, P. et al. Sodium dodecyl sulfate-modified electrochemical paper-based analytical device for determination of dopamine levels in biological samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 744, p. 1–7, 2012.

RAZZAGHI-ASL, N. et al. Antioxidant properties of hydroxycinnamic acids: a review of structure- activity relationships. **Curr Med Chem**, v. 20, n. 36, p. 4436–4450, 2013.

REN, W.; LUO, H. Q.; LI, N. B. Simultaneous voltammetric measurement of ascorbic acid, epinephrine and uric acid at a glassy carbon electrode modified with caffeic acid. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, n. 7, p. 1086–1092, 2006a.

REN, W.; LUO, H. Q.; LI, N. B. Simultaneous voltammetric measurement of ascorbic acid, epinephrine and uric acid at a glassy carbon electrode modified with caffeic acid. **Biosensors & bioelectronics**, v. 21, n. 7, p. 1086–92, 15 jan. 2006b.

RIBEIRO, D. et al. Modulation of human neutrophils' oxidative burst by flavonoids. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 67, p. 280–292, 2013.

RIBEIRO, J. A. et al. Electrochemical sensors and biosensors for determination of catecholamine neurotransmitters: A review. **Talanta**, v. 160, p. 653–679, 2016.

RODRIGUES, L. P. et al. Electropolymerization mechanisms of hydroxyphenylacetic acid isomers. **Journal of Molecular Structure**, v. 1072, p. 298–306, 2014.

ROSCA, I. D. et al. Oxidation of multiwalled carbon nanotubes by nitric acid. **Carbon**, v. 43, n. 15, p. 3124–3131, 2005.

ROY, E. et al. Developing electrochemical sensor for point-of-care diagnostics of oxidative stress marker using imprinted bimetallic Fe/Pd nanoparticle. **Talanta**, v. 132, p. 406–415, 2015.

SAJID, M. I. et al. **Carbon nanotubes from synthesis to in vivo biomedical applications** International Journal of Pharmaceutics, 2016.

SALIMI, A.; HALLAJ, R.; GHADERMAZI, M. Modification of carbon ceramic electrode prepared with sol-gel technique by a thin film of chlorogenic acid: Application to amperometric detection of NADH. **Talanta**, v. 65, n. 4, p. 888–894, 2005.

SÁNCHEZ-RIVERA, A. E. et al. Spectrophotometric study on the stability of dopamine and the determination of its acidity constants. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 59, n. 13, p. 3193–3203, 2003.

SANTHIAGO, M. et al. In situ activated 3,5-dinitrobenzoic acid covalent attached to nanostructured platform for NADH electrooxidation. **Electrochimica Acta**, v. 54, n. 26, p. 6609–6616, 2009a.

SANTHIAGO, M. et al. In situ activated 3,5-dinitrobenzoic acid covalent attached to nanostructured platform for NADH electrooxidation. **Electrochimica Acta**, v. 54, n. 26, p. 6609–6616, nov. 2009b.

SCHNEIDER, C. D.; DE OLIVEIRA, A. R. **Radicais livres de oxigênio e exercício: Mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico** Revista Brasileira de Medicina do Esporte, 2004.

SECOR, K. E.; GLASS, T. E. Selective amine recognition: Development of a chemosensor for dopamine and norepinephrine. **Organic Letters**, v. 6, n. 21, p. 3727–3730, 2004.

SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D. P. Oxidative Stress. **Annual Review of Biochemistry**, v. 86, n. 1, p. annurev-biochem-061516-045037, 2017.

SILVA, F. et al. Poly-xanthurenic acid as an efficient mediator for the electrocatalytic oxidation of NADH. **Electrochemistry Communications**, v. 12, n. 3, p. 450–454, mar. 2010.

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

SILVA, F. D. A. D. S. et al. A very low potential electrochemical detection of L-cysteine based on a glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes/gold nanorods. **Biosensors & bioelectronics**, v. 50C, p. 202–209, 24 jun. 2013.

SILVA, L. V. et al. Electropolymerization of ferulic acid on multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode as a versatile platform for NADH, dopamine and epinephrine separate detection. **Microchemical Journal**, v. 133, p. 460–467, 2017.

SILVA, T. A. et al. Preparation and electroanalytical applications of vertically aligned carbon nanotubes. In: **Electrochemistry**. [s.l.: s.n.]. v. 13 p. 50–92.

SILVA, L. V. DA et al. 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**, p. 1–5, 2016b.

SILVA, L. V. DA et al. 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**, p. 1–5, 2016c.

SONG, W. et al. A selective voltammetric detection for dopamine using poly (gallic acid) film modified electrode. **Chinese Chemical Letters**, v. 21, n. 3, p. 349–352, 2010a.

SONG, W. et al. A selective voltammetric detection for dopamine using poly (gallic acid) film modified electrode. **Chinese Chemical Letters**, v. 21, n. 3, p. 349–352, mar. 2010b.

- SQUELLA, J. A.; BOLLO, S.; NUNEZ-VERGARA, L. J. Recent Developments in the Electrochemistry of Some Nitro Compounds of Biological Significance. **Current Organic Chemistry**, v. 9, p. 565–581, 2005.
- SUNDARAM, S.; ANNAMALAI, S. K. Selective immobilization of hydroquinone on carbon nanotube modified electrode via phenol electro-oxidation method and its hydrazine electro-catalysis and Escherichia coli antibacterial activity. **Electrochimica Acta**, v. 62, p. 207–217, 2012.
- SUNDARAM, S.; KADIR, M. R. A. A New Highly Conducting Carbon Black (CL-08) Modified Electrode Functionalized with Syringic Acid for Sensitive and Selective L-Cysteine Electrocatalysis at Low Potential. **Electrochimica Acta**, v. 224, p. 475–486, 2017.
- TEIXEIRA, D. et al. **3-Nitrotyrosine quantification methods: Current concepts and future challenges** *Biochimie*, 2016.
- TEIXEIRA, J. et al. Hydroxycinnamic acid antioxidants: An electrochemical overview. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–13, 2013.
- 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: Chemical**, v. 176, p. 796–802, 2013.
- TSIKAS, D. **Analytical methods for 3-nitrotyrosine quantification in biological samples: The unique role of tandem mass spectrometry**. *Amino Acids. Anais...* 2012
- TSIKAS, D.; CAIDAHL, K. Recent methodological advances in the mass spectrometric analysis of free and protein-associated 3-nitrotyrosine in human plasma. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 814, n. 1, p. 1–9, 2005.
- VALENTINI, F. et al. Functionalized single-walled carbon nanotubes modified microsensors for the selective response of epinephrine in presence of ascorbic acid. **Electroanalysis**, v. 19, n. 7–8, p. 859–869, 2007.
- VENTON, B. J.; WIGHTMAN, R. M. Psychoanalytical Electrochemistry: Dopamine and Behavior. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 19, p. 414 A-421 A, 2003.
- VINCENT, H. K.; INNES, K. E.; VINCENT, K. R. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 9, n. 6, p. 813–839, 2007.
- WANG, C. et al. Au-nanoclusters incorporated 3-amino-5-mercapto-1,2,4-triazole film modified electrode for the simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, uric acid and nitrite. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 30, n. 1, p. 315–319, 2011.
- WANG, X.; JIN, B.; LIN, X. In-situ FTIR spectroelectrochemical study of dopamine at a glassy carbon electrode in a neutral solution. **Analytical sciences : the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry**, v. 18, n. 8, p. 931–3, 2002.
- 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**, v. 177,

p. 26–31, 2013a.

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**, v. 177, p. 26–31, jan. 2013b.

WIERZBICKA, E.; SULKA, G. D. Fabrication of highly ordered nanoporous thin Au films and their application for electrochemical determination of epinephrine. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 222, p. 270–279, 2016.

XIE, Y.-L. et al. Facile ultrasonic synthesis of graphene/SnO₂ nanocomposite and its application to the simultaneous electrochemical determination of dopamine, ascorbic acid, and uric acid. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 749, p. 26–30, 2015.

YOSHITAKE, M. et al. Liquid chromatography method for detecting native fluorescent bioamines in urine using post-column derivatization and intramolecular FRET detection. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 858, n. 1–2, p. 307–312, 2007.

YOSHITAKE, T. et al. High-sensitive liquid chromatographic method for determination of neuronal release of serotonin, noradrenaline and dopamine monitored by microdialysis in the rat prefrontal cortex. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 140, n. 1–2 SPEC. ISS., p. 163–168, 2004.

ZANARDI, C. et al. Development of an Electrochemical Sensor for NADH Determination Based on a Caffeic Acid Redox Mediator Supported on Carbon Black. **chemosensors**, v. 3, p. 118–128, 2015.

ZARE, H. R. et al. Electrocatalytic simultaneous determination of ascorbic acid, uric acid and L-Cysteine in real samples using quercetin silver nanoparticles-graphene nanosheets modified glassy carbon electrode. **Applied Surface Science**, v. 375, p. 169–178, 2016a.

ZARE, H. R. et al. Application of L-DOPA modified carbon nanotubes as a bifunctional electrocatalyst for simultaneous determination of ascorbic acid, adrenaline, acetaminophen and tyrosine. **Measurement: Journal of the International Measurement Confederation**, v. 90, p. 510–518, 2016b.

ZARE, H. R.; GOLABI, S. M. Electrocatalytic oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) at a chlorogenic acid modified glassy carbon electrode. **Journal of electroanalytical chemistry**, v. 464, n. 2, p. 14–23, 1999.

ZARE, H. R.; GOLABI, S. M. Caffeic acid modified glassy carbon electrode for electrocatalytic oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH). **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 4, n. 2, p. 87–94, 2000.

ZEN, J. M.; KUMAR, A. S.; TSAI, D. M. **Recent updates of chemically modified electrodes in analytical chemistry** *Electroanalysis*, 2003.

ZHANG, L.; SHI, Z.; LANG, Q. Fabrication of poly(orthanilic acid)-multiwalled carbon nanotubes composite film-modified glassy carbon electrode and its use for the simultaneous determination of uric acid and dopamine in the presence of ascorbic acid. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 15, p. 801–809, 2011.

ZHENG, L.; SONG, J. Curcumin multi-wall carbon nanotubes modified glassy carbon

electrode and its electrocatalytic activity towards oxidation of hydrazine. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 135, p. 650–655, 2009.

ZHENG, X. et al. Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid using poly(L-leucine)/DNA composite film modified electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 213, p. 188–194, 2015.

ZOU, H. L. et al. A novel electrochemical biosensor based on hemin functionalized graphene oxide sheets for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 207, p. 535–541, 2015.

ANEXOS

ANEXO A- Caracterização dos nanotubos de carbono por Raman.

Metodologia

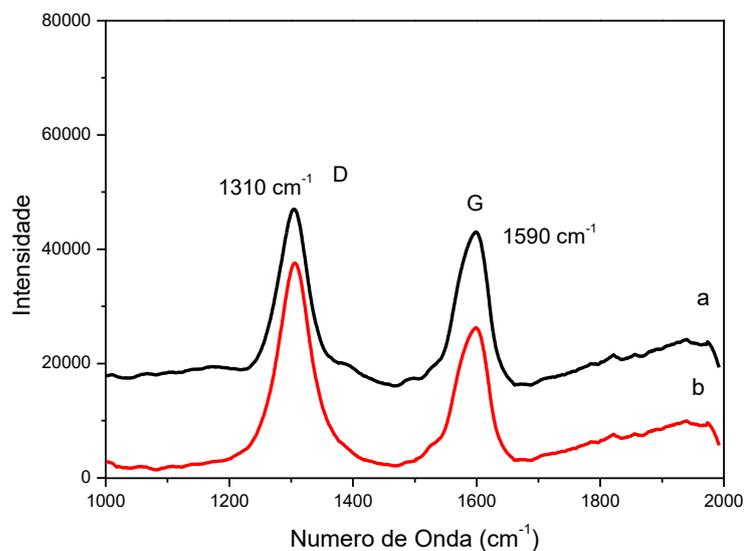
Os experimentos foram realizados no Renishaw in Via Raman Microscope com laser de 785 nm. O modo de operação foi por espectro estático (centro 1500 cm^{-1}), com 1 s de exposição, 10% da potência do laser e 50 acumulações.

Caracterização dos nanotubos funcionalizados

Espectroscopia Raman para MWCNT

Um espectro típico de uma amostra de nanotubos de carbono possui, em geral, duas bandas bem características: a banda G (*graphitic band*), centrada em cerca de 1500-1600 cm^{-1} , associada aos modos de vibração tangencial, e a banda D (defect. or disorder band), centrada em aproximadamente 1300-1350 cm^{-1} , associada a defeitos e/ou desordem. 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 que podem ser relacionados ao grau de pureza e 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). Quanto menor o valor da razão I_D/I_G , maior o grau de grafitização, 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 (HERRERO-LATORRE et al., 2015). Na Figura abaixo são apresentados 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.

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

Fonte: COSTA, 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 HNO₃ promoveu uma maior desordem e modificação química nos NTCs (COSTA, 2016).

ANEXO B: Curriculum Vitae**Leonardo Vieira da Silva**

Dados pessoais

Nome Leonardo Vieira da Silva
Filiação MANOEL VIEIRA DA SILVA e IRACEMA MARIA VIEIRA DA SILVA
Nascimento 26/10/1988 - MACEIÓ/AL - Brasil
Carteira de Identidade 30156670 SSP - AL - 17/11/2006
CPF 068.356.314-90

Formação acadêmica/titulação

- 2013** Doutorado em Química e Biotecnologia.
Universidade Federal de Alagoas, UFAL, Maceio, Brasil
Título: DESENVOLVIMENTO DE SENSORES ELETROQUÍMICOS BASEADOS EM NANOTUBOS DE CARBONO E ELETROOXIDAÇÃO DE FENÓIS PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ALGUMAS ESPÉCIES DE RELEVÂNCIA BIOLÓGICA: 3- NITRO-L-TIROSINA, EPINEFRINA E DOPAMINA
Orientador: Marília Oliveira Fonseca Goulart
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2011 - 2013** Mestrado em Química e Biotecnologia.
Universidade Federal de Alagoas, UFAL, Maceio, Brasil
Título: Sensor Amperométrico a base de nanotubos de carbono e ácido vanílico para determinação simultânea de ácido ascórbico, dopamina e ácido úrico., Ano de obtenção: 2013
Orientador: Marília Oliveira Fonseca Goulart
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2007 - 2011** Graduação em QUÍMICA LICENCIATURA.
Universidade Federal de Alagoas, UFAL, Maceio, Brasil
Título: CONFECÇÃO DE MATERIAIS DIDÁTICOS AUXILIARES A ABORDAGEM DO TEMA "ÁCIDOS E BASES" NO ENSINO DE QUÍMICA DE NÍVEL BÁSICO.
Orientador: TANIA MARIA PIATTI
- 2004 - 2006** Ensino Médio (2o grau) .
ESCOLA DE EDUCAÇÃO BÁSICA E PROFISSIONAL FUNDAÇÃO BRADESCO, F.B., Brasil
-

Formação complementar

- 2014 - 2014** Curso de curta duração em POTENCIOSTATO/GALVANOSTATO PGSTAT128N COM MÓDULO. (Carga horária: 16h).
Universidade Federal de Alagoas, UFAL, Maceio, Brasil
- 2013 - 2013** Curso de curta duração em Especificação Dinâmica de Metais. (Carga horária: 8h).
Universidade Federal de Alagoas, UFAL, Maceio, Brasil
- 2012 - 2012** Eletroforese Capilar. . (Carga horária: 8h).
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil
- 2012 - 2012** Técnicas Espectro(foto)métricas em Bioanálise. . (Carga horária: 28h).
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil
- 2012 - 2012** Preparo de Amostras para Técnicas Cromatográficas. . (Carga horária: 8h).
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil
- 2009 - 2010** Extensão universitária em Curso Básico de Inglês(níveis: Básico I, II e III). (Carga horária: 135h).
Casa de cultura Britanica, CCB, Brasil

Atuação profissional

1. IFAL-Campus Palmeira dos Índios - IFAL- Pln

Vínculo institucional

2014 - Atual Vínculo: Servidor público , Enquadramento funcional: Professor , Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva

2. Universidade Federal de Alagoas - UFAL

Vínculo institucional

2008 - Atual Vínculo: Outro (especifique) , Enquadramento funcional: Bolsista , Carga horária: 12, Regime: Parcial

Prêmios e títulos

- 2013** Poster Prize at São Paulo School of Advanced Sciences on Electrochemistry, Energy Conversion and Storage - SPASECS 2013, FAPESP/USP/Royal society of chemistry/International Society of electrochemistry

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

- SILVA, L. V.**; LOPES, C. B.; SILVA, W. C.; PAIVA, Y. G.; SILVA, F. A. S.; LIMA, P. R.; KUBOTA, L. T.; GOULART, M. O. F. Electropolymerization of ferulic acid on multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode as a versatile platform for NADH, dopamine and epinephrine separate detection. MICROCHEMICAL JOURNAL. , v.133, p.460 - 467, 2017.
- 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.1, p.1 - 5, 2016.
- COSTA, C. O.; COSTA, E. O.; FERREIRA, F. R.; VIANA, L. S.; **SILVA, L. V.**; SILVA, F. A. S.; ABREU, F. C.; FIGUEIREDO, I. M.; PINHO JR, W.; BENTO, E. S.; LEMOS, T. L. G.; PESSOA, O. D. L.; AGUILERA-VENEGAS, B.; NORAMBUENA, E.; OLEAZAR, C.; GOULART, M. 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.

Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

- SILVA, F. A. S.; PINHO JR, W.; COSTA, C. O.; **SILVA, L. V.**; LEMOS, T. L. G.; PESSOA, O. D. L.; FIGUEIREDO, I. M.; GOULART, M. O. F. Estudo eletroquímico e espectroscópico da reação entre oncocalicxona e n-acetilcisteína. In: XVIII SIBEE, 2011, Bento Gonçalves. **Anais do XVIII SIBEE**. Porto Alegre: , 2011. v.1.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

- SILVA, L. V.**; SANTOS, N. D.; COSTA, E. O.; PINHO JR, W.; GOULART, M. O. F. Sensor Amperométrico à base de Nanotubos de Carbono e Capsaicina para Quantificação de Epinefrina In: XXI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2016, Natal -RN. **Anais do XXI Simpósio Brasileiro de**

Eletroquímica e Eletroanalítica. , 2016.

2. **SILVA, L. V.**; PINHO JR, W.; COSTA, E. O.; GOULART, M. O. F. Sensor Amperométrico a base de Nanotubos de Carbono e Capsaicina para Determinação de Dopamina In: XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica., 2015, Uberlândia-MG. **Anais XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica.** , 2015.

3. **SILVA, L. V.**; SILVA, F. A. S.; GOULART, M. O. F.; LIMA, P. R.; KUBOTA, L. T. Sensor Amperométrico a base de nanotubos de carbono e ácido vanílico para determinação de substâncias de relevância biológica In: XXI Congresso da sociedade Iberoamericana de eletroquímica, 2014, La Serena- Chile. **XXI Congresso da Sociedade Iberoamericana de eletroquímica.** , 2014.

4. GOULART, M. O. F.; SILVA, F. A. S.; **SILVA, L. V.**; Y. P. Electroactive Natural Phenols-based Polymers Applied as Redox Mediators for the Analysis of Antioxidants In: 64th Annual Meeting of the international society of electrochemistry, 2013, Queretaro-Mexico. **64th Annual Meeting of the international society of electrochemistry.** , 2013.

5. **SILVA, L. V.**; SILVA, F. A. S.; LOPES, C. B.; KUBOTA, L. T.; LIMA, P. R.; GOULART, M. O. F.

Amperometric sensor based on carbon nanotubes and vanilic acid to the simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid In: International Symposium on Electrocatalysis: New Concepts and Approaches, 2012, Maragogi. **International Symposium on Electrocatalysis: New Concepts and Approaches, 2012.** , 2012.

6. SERRA, J.; SANTOS NETO, J. P.; COSTA, E. O.; **SILVA, L. V.**; GOULART, M. O. F.; LIMA, P. R.

Desenvolvimento de um sensor químico de nanotubos de carbono a base de ácido ferúlico para detecção seletiva de ácido ascórbico e ácido úrico. In: CONNEPI, 2012, Palmas.

CONNEPI. , 2012.

7. SERRA, J.; SANTOS NETO, J. P.; COSTA, E. O.; **SILVA, L. V.**; SOUZA, J. S.; LIMA, P. R. Desenvolvimento de um sensor químico nanoestruturado fundamentado na tecnologia de nanotubos de carbono e p-nitroanilina ativada in situ para detecção de NADH In: XVII CONNEPI, 2012, Palmas.

XVII CONNEPI. , 2012.

8. **SILVA, L. V.**; SILVA, F. A. S.; GOULART, M. O. F. Estudo Voltamétrico da interação entre Juglona e Cisteína In: 35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2012, Águas de Lindóia.

Livro de Resumos da 35ª RASBQ. São Paulo: , 2012. v.1.

Organização de evento

1. **SILVA, L. V.**; SILVA, L. A.

Semana Nacional de Ciência e Tecnologia em Alagoas, 2016. (Outro, Organização de evento)

2. GOULART, M. O. F.; **SILVA, L. V.**

II Escola de Bioanalítica, 2013. (Congresso, Organização de evento)

Bancas

Bancas

Participação em banca de trabalhos de conclusão

Graduação

1. SILVA, L. V.; Rodrigues, R.A.F.; SILVA, M. A. Participação em banca de André Pereira Gonçalves. **A utilização de temas transversais em uma proposta de Plano de Unidade para reações Orgânicas**, 2012 (QUÍMICA LICENCIATURA) Universidade Federal de Alagoas

2. SILVA, L. V.; Rodrigues, R.A.F.; SILVA, M. A. Participação em banca de Márcio Silva dos Santos. **Um luxo e muitos lixos, preço que pagamos pelo conforto: uma proposta inovadora para o ensino de Química**, 2012 (QUÍMICA LICENCIATURA) Universidade Federal de Alagoas