



UFAL

Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Química e Biotecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia



IQB

ÁCIDO XANTURÊNICO

Um novo mediador para eletro-oxidação de NADH

Francisco de Assis dos Santos Silva

Maceió
2009

FRANCISCO DE ASSIS DOS SANTOS SILVA

ÁCIDO XANTURÊNICO
Um novo mediador para eletro-oxidação de NADH

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, para a obtenção do Título de mestre em Química.

Orientadora: Profa.Dra. Marília O. F. Goulart
Co-orientador: Dr. Phabyanno R. Lima

Maceió
2009

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

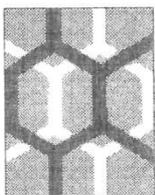
S586e Silva, Francisco de Assis dos Santos.
Ácido xanturênico : um novo medidor para eletro-oxidação de NADH / Francisco de Assis dos Santos Silva, 2009.
64 f. : il. tabs., graf.

Orientadora: Marília Oliveira Fonseca Goulart.
Co-Orientador: Phabyanno Rodrigues Lima.
Dissertação (mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2009.

Bibliografia: f. [60]-64.

1. Ácido xanturênico. 2. NADH. 3. Eletrodo quimicamente modificado.
4. Nanotubos de carbono. I. Título.

CDU: 543.553



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



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1384, Fax.: (82) 3214-1384
Email: cpgqb@qui.ufal.br

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Dissertação de Mestrado de **Francisco de Assis dos Santos Silva**, intitulada: "**Ácido Xanturênico: Um Novo Mediador para a Eletrooxidação de NADH**", apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, em 03 de novembro de 2009, às 14h, na Sala de Aulas do PPGQB/UFAL.

COMISSÃO JULGADORA

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

Dr.^o Phabyanno Rodrigues Lima
Co-orientador - Pesquisador do IQB/UFAL

Prof.^a Dr.^a Rosa Amalia Fireman Dutra
ICB/UPE

Prof.^a Dr.^a Fabiane Caxico de Abreu Galdino
PPGQB/IQB/UFAL

Prof.^a Dr.^a Adriana Santos Ribeiro
PPGQB/IQB/UFAL

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar presente na minha vida, iluminando-a e sempre guiando meus passos.

Aos meus pais, Geraldo e Josefa pelo apoio e presença em todos os momentos difíceis e por sempre buscarem o melhor para todos seus filhos.

A Profa. Marília Goulart, pela confiança, paciência, dedicação e ensinamentos.

Ao Prof. Lauro Kubota pela receptividade, apoio e discussões do trabalho em Campinas.

Ao Phabyanno Lima, pela co-orientação, paciência, longas noites de trabalho na UNICAMP, pela amizade e tantos ensinamentos.

Aos amigos Beatriz, Cleylton, Mikael e Wilson, que apesar de já não estarmos todos juntos como sempre, ainda temos amizade em primeiro lugar sem contar as diferenças.

Aos amigos do Laboratório de Eletroquímica – LEQUI: Cícero, Paulo, Augusto, Antônio, Alane, Allani, Iara, Fabricia, Cecília, Arlan e Richardson, pelo excelente convívio e companheirismo no dia-a-dia.

Aos professores do Instituto de Química e Biotecnologia, pela paciência, ensinamentos, compreensão e contribuição acadêmica e em especial aos profs. da pós-graduação os quais tive a oportunidade de conhecer melhor durante o período de aulas: Adriana Ribeiro, Fabiane Caxico e Lúcia Conserva.

A todos, que de alguma forma, contribuíram para o sucesso deste trabalho.

AO PROCAD/CAPES

Este trabalho foi realizado graças às atividades de cooperação entre a Universidade Federal de Alagoas (UFAL) e a Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e aos incentivos financeiros do Governo Federal através do Programa Nacional de Cooperação Acadêmica da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (PROCAD/CAPES). No qual foi possível um verdadeiro intercâmbio de conhecimento e o estreitamento das relações entre as duas universidades. Durante a realização foi possível fazer novos amigos, e em especial o Phabyanno Lima, a Wilney Santos, o Múriilo Santhiago e o Caio Oliveira. Gostaria agradecer ao Prof. Lauro Kubota e aos demais integrantes do Laboratório de Eletroquímica Eletroanalítica e Desenvolvimentos de Sensores (LEEDS) da UNICAMP: Renata, Rafaela, Luciana, Cecília, Bárbara, Kátia, Danielle, que durante a minha estada em Campinas proporcionaram um ambiente familiar, descontraído e prazeroso.

“A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente, antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos.”

Charles Chaplin

RESUMO

Neste trabalho é descrito pela primeira vez a utilização de ácido xanturênico (AX) como mediador redox através de um simples e eficiente eletrodo de carbono vítreo (ECV) modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas e ativado com AX para eletro-oxidação de NADH. Para este propósito, inicialmente, ácido xanturênico foi ativado in situ, gerando uma espécie eletroativa estável na superfície eletródica (poli-AX), o qual apresentou atividade electrocatalítica frente à oxidação de NADH. As técnicas empregadas para a realização deste trabalho foram a voltametria cíclica e cronoamperometria, as quais foram utilizadas para estudar o comportamento dos eletrodos modificados, para a otimização dos parâmetros experimentais e obtenção dos parâmetros cinéticos. Além disso, os estudos hidrodinâmicos e cronoamperométricos foram realizados com o objetivo de obter maiores informações sobre o processo de oxidação entre o NADH e o eletrodo modificado. Assim, através dos gráficos e equações de Koutech-Levich e Cottrell foi possível obter os valores para o coeficiente de difusão (D) e constante de velocidade da reação (k) para NADH. Os valores do D e de k , determinados para NADH, foram de $2,4 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ e $7,84 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectivamente.

Palavras-chave: Ácido xanturênico, NADH, eletrodo quimicamente modificado, nanotubos de carbonos.

ABSTRACT

The present work describes, for the first time, the preparation and use of a simple and efficient glassy carbon electrode (GCE) modified with multi-wall carbon nanotubes (MWCNT) and an activated-xanthurenic acid (poly-XA) towards electrocatalytic NADH oxidation. For this purpose, initially, xanthurenic acid was activated in situ, generating a stable redox-active specie on the electrodic surface, which presented electrocatalytic activity towards the oxidation of NADH. The techniques used for the accomplishment of this work were the cyclic voltametry and cronoamperometry, which were used to study the behavior of the modified electrodes, for the experimental parameters optimization, for the attainment of the kinetic parameters and analytical characterization of the sensors. Hydrodynamic and cronoamperometric studies were carried out with the aim to get information on the oxidation process of NADH on the modified electrode. Through the Koutech-Levich and Cotrell plots it was possible to obtain the values for the diffusion coefficient (D) and the kinetic constant of the catalytic reaction (k) for the analyte in study. The values of the diffusion coefficient and k , determined for NADH were $2,4 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ and $7,82 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectively.

Keywords: Xanthurenic acid, NADH, Chemically modified electrode, carbon nanotubes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estruturas dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas (A) e simples (B) – MWCNT e SWCNT.....	8
Figura 2	Estruturas do NAD ⁺ e NADP ⁺	10
Figura 3	Reação de redução do NAD ⁺ a NADH	10
Figura 4	Esquema do uso de mediador para a eletrooxidação de NADH.....	13
Figura 5	Biossíntese do ácido xanturênico.....	15
Figura 6	Quelato do ácido xanturênico com o ferro.....	16
Figura 7	Rotas para polimerização de fenóis.....	19
Figura 8	Potenciostato EcoChemie da AUTOLAB.....	23
Figura 9	EDR da AUTOLAB.....	24
Figura 10	Modelo esquemático da célula eletroquímica.....	24
Figura 11	Catálise do NADH em eletrodo de carbono vítreo sem (A) e com a modificação com MWCNT/XA (B), voltamogramas obtidos em tampão fosfato 0,1 mol.L ⁻¹ pH 7,0 e $v = 0,005 \text{ V.s}^{-1}$	29
Figura 12	Ativação do GCE/MWCNT com ácido xanturênico 120 μM em solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH 5,5 e $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$	30
Figura 13	Voltamograma cíclico do ECV/MWCNT/poliXA em tampão fosfato 0,1 mol.L ⁻¹ , pH 7,0, $E_{\text{inicial}} = 0,25 \text{ V}$ $v = 0,005 \text{ V.s}^{-1}$	31
Figura 14	Estruturas do possível produto de oxidação e dímeros do XA.....	33
Figura 15	Eficiência catalítica (EC) para o ECV/MWCNT/poli-XA variando o pH da solução de ativação (A) e a concentração da solução XA na ativação (B).....	33
Figura 16	Voltamogramas cíclicos em GCE/MWCNT/poli-XA em solução de	

	tampão fosfato 0,1 mol.L ⁻¹ pH 7,0 em diferentes velocidades de varredura (20 a 500 mV s ⁻¹).....	34
Figura 17	Gráfico de E_p vs. $\log v$ a partir do voltamogramas cíclicos em varias velocidade de varreduras.....	35
Figura 18	Dependência da corrente de pico anódico (I_{pa}) e catódico (I_{pc}) em função da velocidade de varredura em solução tampão fosfato 0,1 mol.L ⁻¹ pH 7,0.....	35
Figura 19	Dependência da variação de potencial de pico (ΔE_p) como função da velocidade de varredura.....	36
Figura 20	Efeito do pH no comportamento redox do ECV/MWCNT/poli XA, voltamogramas obtidos em tampão fosfato 0,1 mol.L ⁻¹ e $v = 0,05$ V.s ⁻¹	37
Figura 21	Potencial formal (E^0) do GCE/MWCNT em função do pH. Condições empregadas: solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ e $v = 50$ mV s ⁻¹	38
Figura 22	Voltamogramas cíclicos para o GCE/MECNT/XA, na presença (b) e na ausência (a) de NADH 0,4 mmol L ⁻¹ ; Velocidade de varredura (v): 5,0 mV s ⁻¹ . Estudos realizados em solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ em pH 7,0.....	39
Figura 23	Variação da corrente de pico anódica i vs. $v^{1/2}$ no GCE/MWCNT/XA em solução contendo 0,4 mmol L ⁻¹ de NADH. Medidas realizadas em solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,0 e v : 0,005 a 0,013 V s ⁻¹	40

Figura 24	Varição da corrente de pico anódica normalizada $i/v^{1/2}$ vs. $v^{1/2}$ no GCE/MWCNT/XA em solução contendo $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ de NADH. Medidas realizadas em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0 e v : 0,005 a $0,013 \text{ V s}^{-1}$	41
Figura 25	Cronoamperogramas obtidos no GCE/MWCNT/XA em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7 na ausência (Branco) e presença de NADH, $E_{\text{inicial}} = 0,10$ e $E_{\text{final}} = 0,10$ vs. Ag/AgCl, respectivamente.....	42
Figura 26	Integração dos cronoamperogramas	42
Figura 27	gráfico de I vs. $t^{1/2}$ obtidos a partir dos cronoamperogramas.....	43
Figura 28	gráfico de I vs. $t^{1/2}$ versus a concentração de NADH.....	44
Figura 29	Dependência de I_{cat}/I_L vs. $t^{1/2}$ derivado dos dados dos cronoamperogramas.....	45
Figura 30	gráfico da inclinação de I_{cat}/I_L vs. a concentração de NADH.....	45
Figura 31	Curvas de polarização obtidas para oxidação eletrocatalítica de NADH: (1) 100; (2) 200; (3) 300; (4) 500; (5) 700 e (6) $900 \mu\text{mol.L}^{-1}$ no GCE/MWCNT/poli-XA. Velocidade de rotação, $\omega = 10.47 \text{ rad s}^{-1}$. $v = 5,0 \text{ mVs}^{-1}$	46
Figura 32	Gráfico de Levich para a resposta eletrocatalítica de estado estacionário para um EDR de ECV/MWCNT/poli XA em diferentes [NADH]. Estudos realizados em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,0 e $\Gamma = 7.11 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$	48
Figura 33	Gráficos de Koutecky-Levich dos dados experimentais mostrados	

	na figura 32. Estudos realizados em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ em pH 7,0 e $\Gamma = 7.11 \times 10^{-11}$ mol cm ⁻²	49
Figura 34	(a) Variação de κ_{obs} vs. [NADH] obtidos para o ECV/MWCNT/poli-XA e (b) Variação de $1/\kappa_{obs}$ vs. [NADH]. Estudos realizados em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ em pH 7,0 e $\Gamma = 7.11 \times 10^{-11}$ mol cm ⁻²	51
Figura 35	Medidas amperométricas para a eletrooxidação de NADH no ECV/MWCNT/poli-XA obtidas em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ em pH 7,0 e [NADH]: (1) 0,8 - (9)17,0 mmol L ⁻¹	53
Figura 36	Curva analítica para a eletrooxidação de NADH no ECV/MWCNT/poli-XA em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ em pH 7,0 E _{ap} = 100 mV vs. Ag/AgCl.....	54
Figura 37	Voltamogramas cíclicos para o GCE/MECNT/XA, na ausencia (a) na presença de NADH 0,4 mmol L ⁻¹ (b) e na presença de ácido úrico 100 μ mol L ⁻¹ (c); (A) Voltamogramas cíclicos para o GCE/MECNT/XA, na ausencia (a) na presença de NADH 0,4 mmol L ⁻¹ (b) e na presença de ácido ascórbico 100 μ mol L ⁻¹ (c) Velocidade de varredura (ν): 5,0 mV s ⁻¹ . Estudos realizados em solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ em pH 7,0.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Métodos de modificação de superfície de eletrodos.....	5
-------------------	--	---

Tabela 2 – Processos de imobilização de filmes poliméricos	7
Tabela 3 – Comparação do desempenho de alguns eletrodos modificados usados na eletrocatalise de NADH.....	14
Tabela 4 – Parâmetros eletroquímicos e cinéticos de alguns eletrodos modificados para eletrooxidação de NADH	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A	Área
C_o	Concentração no seio da solução
D	Coeficiente de difusão
DMF	Dimetilformamida
e^-	Elétron
$E^{0'}$	Potencial formal
EC	Eficiência Catalítica
EC_{cat}	Processo eletroquímico – químico catalítico
ECV	Eletrodo de carbono vitreo
E_{final}	Potencial final
$E_{inicial}$	Potencial inicial
E_{pa}	Potencial de pico anódico
E_{pc}	Potencial de pico catódico
EQM	Eletrodos quimicamente modificados
E_λ	Potencial de inversão
F	Constante de Faraday
H	Hidreto
I	Corrente
I_{cat}	Corrente catalítica
$I_{d(L)}$	Corrente difusional
I_{kin}	Corrente cinética
I_L	Corrente Limite
I_{pa}	Corrente de pico anódico
I_{pc}	Corrente de pico catódico
k	Constante de velocidade da reação
k_{cat}	Constante da reação catalítica
K_M	Constante de Michaelis-Menten
MWCNT	<i>Multi-Walled carbon nanotube</i>
n	Número de mol
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido

NADP⁺	Fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NTC	Nanotubo de carbono
<i>rad</i>	Radianos
EDR	Eletrodo de disco rotatório
RF	Radiofrequência
SWCNT	<i>Single wall carbon nanotube</i>
AX	Ácido Xanturênico
ΔE_p	Diferença entre potencias de pico
Γ	Cobertura total
γ	Viscosidade
ν	Velocidade de varredura
ω	Velocidade de rotação
vs.	Versus

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ii
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	vii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO	
1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	2
1.2. ELETRODOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS	2
1.3. EQM COM FILMES POLÍMERICOS.....	6
1.4. EQM COM NANOTUBOS DE CARBONO (NTC).....	8
1.5. A IMPORTÂNCIA DO ESTUDO ELETROQUÍMICO DE COENZIMAS.....	9
1.6. DETERMINAÇÃO ANALÍTICA DE NADH.....	11
1.7. ELETRODOS MODIFICADOS PARA A ELETROANÁLISE DE NADH	11
1.8. ÁCIDO XANTURÊNICO: BIOSSÍNTESE E IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA.....	15
1.9. ELETRO-OXIDAÇÃO DE FENÓIS.....	17
2. OBJETIVOS	
2.1. GERAL.....	21
2.2. ESPECÍFICOS.....	21
3. METODOLOGIA	
3.1. REAGENTES.....	23
3.2. EQUIPAMENTOS E MATERIAIS.....	23
3.3. MÉTODOS	
3.3.1. Preparação de solução de ácido xanturênico.....	25
3.3.2. Limpeza do eletrodo de carbono vítreo	25
3.3.3. Modificação do eletrodo de carbono vítreo com MWCNT.....	25

3.3.4. Ativação do GCE/MWCNT com ácido xanturênico.....	25
3.3.5. Catalise com NADH.....	26
3.3.6. Estudo cinético do processo electrocatalítico.....	26
3.3.7. Otimização do processo de ativação.....	26
3.3.8. Determinação da área ativa.....	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.1. PREPARAÇÃO DO ELETRODO QUIMICAMENTE MODIFICADO	
4.1.1. Modificação com MWCNT.....	29
4.1.2. Processo de polimerização do Ácido Xanturênico.....	30
4.2. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE ATIVAÇÃO.....	32
4.3. CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DO ELETRODO MODIFICADO.....	34
4.4. O EFEITO DO pH NO COMPORTAMENTO REDOX DO ELETRODO MODIFICADO.....	37
4.5. ESTUDO DA ELETRO-OXIDAÇÃO DE NADH.....	39
4.6. ESTUDOS CRONOAMPEROMÉTRICOS.....	41
4.7. ESTUDOS COM ELETRODO DE DISCO ROTATÓRIO.....	46
4.8. DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA DE NADH.....	53
4.9. ESTUDO DE INTERFERENTES.....	55
5. CONCLUSÃO.....	57
6. PERSPECTIVAS.....	59
7. REFERÊNCIAS.....	61

The image features a minimalist design with three blue circles of varying sizes, each composed of concentric circles in different shades of blue. These circles are arranged along a diagonal line that runs from the top-left towards the bottom-right. The background is white, and the overall aesthetic is clean and modern.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1- CONSIDERAÇÕES GERAIS

A eletroquímica relaciona-se a fenômenos químicos associados à separação de cargas. Muitas vezes, esta separação de cargas leva à transferência de carga, que pode ocorrer homoganeamente em solução, ou heterogeneamente, na superfície do eletrodo (BRETT e BRETT, 1996). Tem natureza universal e interdisciplinar, com diversas aplicações em outros campos tais como: medicina, biologia, física de materiais e outros.

No campo da química analítica, a eletroquímica tem se mostrado uma boa alternativa para muitos processos de análise, entretanto a utilização de eletrodos em sua forma original (não modificado) limita seu uso por motivos de sensibilidade, seletividade e uma série de outros problemas. Tendo em vista solucionar estas limitações surgiram os eletrodos quimicamente modificados (EQM) (DRUST *et al.*, 1997).

Os EQM têm sido amplamente estudados e aplicados no desenvolvimentos de sensores, com o objetivo de realizar detecções rápidas, seletivas, estáveis e de baixo custo, em diferentes tipos de amostras tanto *in situ* quanto *in vivo*, como por exemplo eletrodos modificados com enzimas desidrogenases para detecção de lactato (ZAYATS *et al.*, 2002) e glicose (RAITMAN *et al.*, 2002).

1.2- ELETRODOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS

Os EQM constituem um sistema de eletrodos relativamente moderno que pode ser utilizado em amplos campos da investigação eletroquímica.

A denominação EQM foi inicialmente utilizada em eletroquímica, por Murray e colaboradores, na década de 70, para designar eletrodos com espécies quimicamente ativas convenientemente imobilizadas em sua superfície.

O principal objetivo dessa modificação é pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo – solução, como uma forma de alterar a reatividade e seletividade do sensor base, favorecendo assim, o desenvolvimento de

eletrodos para vários fins e aplicações, desde a catálise de reações orgânicas e inorgânicas, até a transferência de elétrons em moléculas de interesse.

A progressiva expansão de sensores químicos tem causado uma verdadeira revolução no cenário científico, comparável, segundo especialistas, a dos microprocessadores. Os sensores têm demonstrando ser um dos mais atrativos métodos analíticos no ramo da detecção química, bioquímica e imunológica (ZHU *et al.*, 2007; HE *et al.*, 2007).

Em saúde pública, sensores químicos com rápida detecção, alta sensibilidade e especificidade, quando desenvolvido sob a forma de “*point-of-care-testings*” (SOPER *et al.*, 2006), possuem estes requisitos importantes para hospitais ou laboratórios satélites, favorecendo uma maior sobrevivência global dos pacientes através de orientação da conduta terapêutica de modo mais rápido.

Os sensores químicos também encontram vasta aplicação nas indústrias de alimentos e bioprocessos, no qual o monitoramento em tempo real é muito valioso, ou ainda em aplicações ambientais onde, tanto a indústria quanto os órgãos de vigilância ambiental, necessitam de sensores para análise quantitativa ou diferencial de inúmeros rejeitos industriais, como por exemplo, misturas gasosas, óleos, compostos orgânicos voláteis e metais pesados.

Como reportado no trabalho desenvolvido por CHEN e colaboradores (2009) que relata a construção de um sensor para determinação de chumbo em escala nanomolar utilizando um eletrodo de carbono ativado e oxidado com peróxido de hidrogênio. Outro exemplo é o sensor para nitrofenóis desenvolvido por CHEN e KAFI (2009), que utilizaram eletrodos de carbono vítreo modificados com azul de metileno e quitosana com nanopartículas de ouro.

A maior parte das aplicações analíticas dos EQM envolve técnicas voltamétricas ou amperométricas. É possível encontrar na literatura alguns casos de utilização dos EQM como eletrodos íon-seletivos (BARD e FAULKNER, 2001). Em termos analíticos, a sensibilidade ou seletividade de uma determinação deve aumentar com a utilização de um EQM para que seu emprego seja justificado.

Os métodos mais importantes utilizados para introdução de um agente modificador sobre o eletrodo base constituem em adsorção irreversível direta, ligação covalente a sítios específicos da superfície do eletrodo, recobrimento com filmes poliméricos ou ainda a preparação de compósitos com materiais orgânicos e inorgânicos como descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Métodos de modificação de superfície de eletrodos (PEREIRA, SANTOS e KUBOTA, 2002)

MODIFICAÇÕES	CARACTERÍSTICAS
Adsorção	O filme é fortemente adsorvido e, idealmente irreversivelmente, na superfície do eletrodo. Neste tipo de modificação, incluem-se: monocamadas auto organizadas, SAMs (Self-assembled monolayers), na qual moléculas adsorvem espontaneamente em sítios específicos da superfície do eletrodo.
Ligação covalente	Incorporação de um vasto número de substâncias, de maneira estável, por meio de manipulação da reatividade de grupos funcionais existentes na superfície do eletrodo.
Filmes poliméricos	Filmes poliméricos elétron-condutores ou não, são imobilizados na superfície do eletrodo pela combinação com algumas substâncias adsorventes e de baixa solubilidade em solução.
Materiais compósitos	A substância modificadora é simplesmente misturada com um material-matriz, como no caso de um mediador de transferência de elétrons, combinado com partículas de carbono de uma pasta de carbono.

1.3- EQM COM FILMES POLIMÉRICOS

Os filmes poliméricos também são uma boa alternativa para EQM (LANGE *et al.*, 2008), como por exemplo, um EQM contendo dois polímeros diferentes, no qual o segundo polímero recobre a primeira camada para formar um polímero de múltiplas camadas.

Este método pode ser utilizado para imobilização não só de diferentes polímeros, mas sim de outras substâncias, tais como enzimas, antígeno/anticorpo etc., com o objetivo de adquirir uma maior estabilidade desses EQM (KUMAR e CHEN, 2008).

Há muitas razões para utilizar filmes poliméricos para preparar EQM: a técnica de imobilização é mais simples do que trabalhar com monocamadas; os filmes são mais estáveis e, por causa das múltiplas camadas de sítios redox, a resposta eletroquímica é maior (DRUST *et al.*, 1997).

A Tabela 2 descreve de forma geral os principais processos de imobilização dos filmes poliméricos sobre a superfície de eletrodos

Tabela 2 - Processos de imobilização de filmes poliméricos (DRUST *et al.*, 1997).

PROCESSO	CARACTERÍSTICAS
Dip-Coating	Este procedimento consiste na imersão do eletrodo em uma solução do polímero por um período suficiente para adsorção do mesmo.
Evaporação do solvente	Uma pequena quantidade de solução do polímero é aplicada sobre a superfície do eletrodo e o solvente é evaporado.
Spin coating	Uma pequena quantidade de uma solução diluída do polímero é aplicada sobre a superfície de um eletrodo rotatório. O excesso da solução é expulso, levando à formação de uma camada do polímero seca e fina.
Deposição eletroquímica	Este procedimento consiste na variação da solubilidade do polímero com o estado de oxidação, assim a formação do filme irá ocorrer. Geralmente a oxidação ou redução de um polímero à sua forma menos solúvel é irreversível.
Polimerização eletroquímica	Uma solução do monômero é oxidada ou reduzida a uma forma ativa do polímero para formar um filme polimérico diretamente na superfície do eletrodo.
Polimerização por radiofrequência	Vapores do monômero são expostos a uma descarga de radiofrequência (RF). A alta energia da descarga de RF resulta em um dano químico nas substâncias, produzindo modificações e funcionalizações ainda desconhecidas.
Ligação cruzada	É um método para acoplar componentes químicos de um filme à superfície do eletrodo. Ligações cruzadas são geralmente formadas por copolimerização de monômeros bi e polifuncionalizados. Este tipo de imobilização pode ser ativado quimica, eletroquímica ou fotoquimicamente, com RF ou termicamente.

1.4- EQM COM NANOTUBOS DE CARBONO (NTC)

Desde que Lijima descobriu os nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT – Multi-Walled Carbon Nanotubes) e os nanotubos de carbono de parede simples (SWCNT – Single Wall Carbon Nanotubes) (Figura 1), em 1991 e 1993 respectivamente, os nanotubos de carbono têm se tornado líder em pesquisas na nanociência e nanotecnologia, devido às suas notáveis propriedades eletrônicas, térmicas e mecânicas (FUJIHIRA, RUSLING e RUBINSTEIN, 2007).

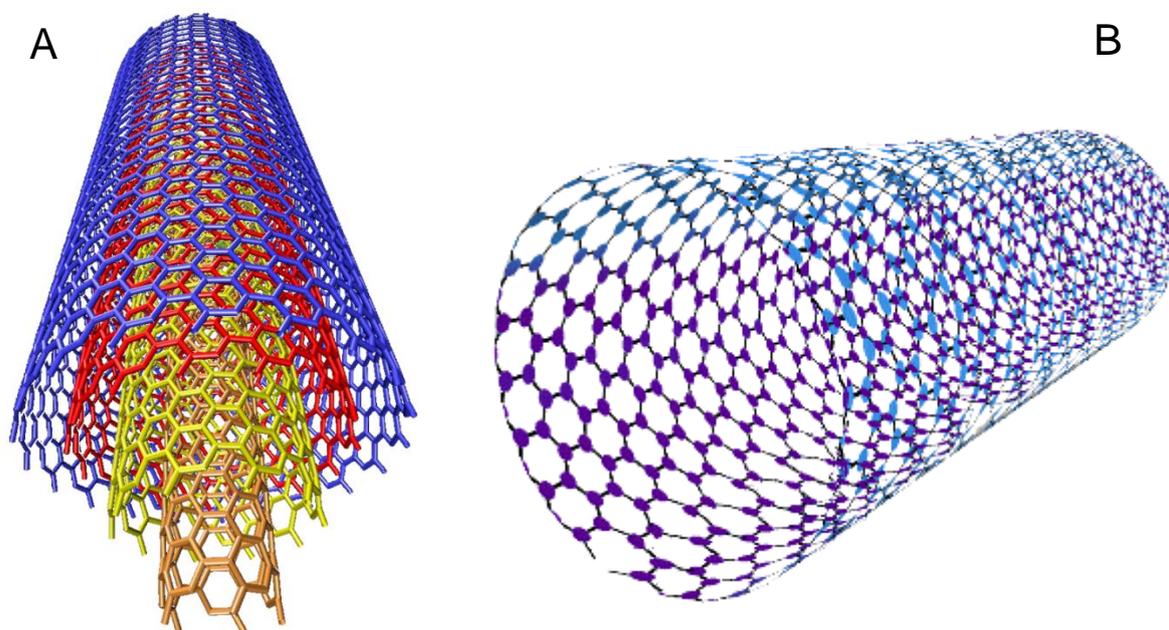


Figura 1 - Estruturas dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas (A) e simples (B) – MWCNT e SWCNT.

Os NTCs apresentam composição química bastante simplificada, agregada a uma configuração estável e ótima relação área/volume e ainda revelam uma extrema riqueza funcional entre os nanomateriais disponíveis, permitindo serem modificados para facilitar a sua ligação a biomoléculas. Além disso, os NTCs podem acentuar a reatividade eletroquímica de importantes espécies eletroativas, e por meio disso, facilitam as reações de transferência de elétrons envolvendo proteínas e superfícies previamente funcionalizadas (WANG *et al.*, 2005).

A preparação de folhas de NTC, também chamada de papéis de NTC e filmes de NTC por adsorção física já é conhecida. Entretanto, alguns trabalhos recentes descrevem a preparação de filmes finos, com alta homogeneidade a partir de NTC purificados dissolvidos ou dispersos em solução. Estes filmes finos de NTC têm sido amplamente utilizados para modificações de eletrodos pela formação de monocamadas com SWCNT ou MWCNT, alguns exemplos deste tipo de modificação serão apresentados neste trabalho (FUJIHIRA, RUSLING e RUBINSTEIN, 2007).

1.5- A IMPORTÂNCIA DO ESTUDO ELETROQUÍMICO DE COENZIMAS

Há um grande interesse em se estudar a eletroquímica das coenzimas. Essas participam da transferência de elétrons da enzima e, em muitos casos, fazem parte do sítio ativo enzimático, o qual é a região onde ocorre a reação redox. Sem a presença das coenzimas, a enzima não consegue catalisar a reação.

As coenzimas nicotinamida adenina dinucleotídeo e fosfato nicotinamida adenina dinucleotídeo, na sua forma oxidada (NAD^+ , NADP^+ respectivamente) (Figura 2), ou reduzida (NADH ou NADPH) são de extrema importância nas células, nas reações bioquímicas, funcionando como um carregador de elétrons e como participante em reações redox metabólicas (KUMAR e CHEN, 2008). Como o anel nicotinamida se assemelha à piridina, estes compostos são algumas vezes chamados nucleotídeos piridínicos. A vitamina niacina é a fonte da fração nicotinamida nos nucleotídeos de nicotinamida (NELSON e COX, 2004).

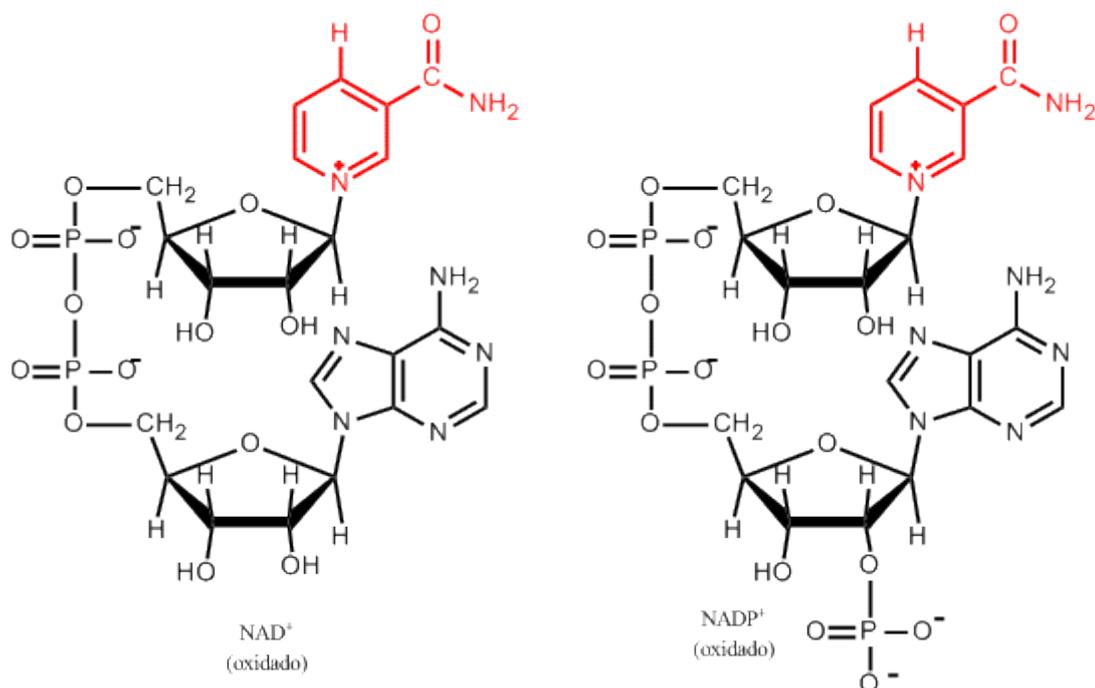


Figura 2 - Estruturas do NAD⁺ e NADP⁺.

Ambas as coenzimas sofrem redução reversível do anel nicotinamida (Figura 3). Como a molécula substrato sofre oxidação (desidrogenação), dando dois átomos de hidrogênio, a forma oxidada do nucleotídeo (NAD⁺ ou NADP⁺) aceita um íon hidreto e transforma-se na forma reduzida (NADH ou NADPH). O segundo próton removido da molécula substrato é removido pelo solvente.

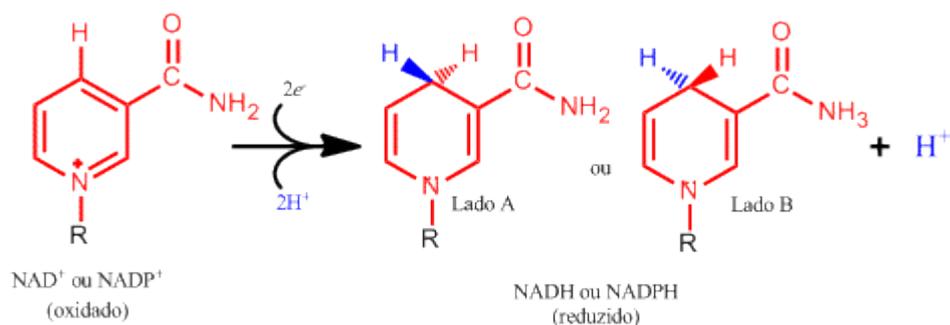


Figura 3 - Reação de redução do NAD⁺ a NADH (NELSON e COX, 2004).

1.6- DETERMINAÇÃO ANALÍTICA DE NADH

A análise de NADH é um dos mais importantes ensaios em enzimas, tendo em vista que mais de 500 desidrogenases necessitam da forma oxidada desta coenzima para poder participar do metabolismo do organismo (KUMAR e CHEN, 2008). A detecção em fluidos biológicos é particularmente importante porque permite a determinação indireta de várias substâncias não eletroativas presentes no nosso organismo. Em virtude disso, um grande número de pesquisas visando o desenvolvimento de procedimentos analíticos para a determinação de NADH tem sido realizado. Dentre os vários métodos existe um interesse particular para aqueles envolvendo a oxidação eletroquímica (BARTHUS, MAZO e POPPI, 2005).

A oxidação direta de NADH em eletrodos não modificados (Ex.: ouro, carbono vítreo etc.) ocorre só em alto sobrepotencial ($E_p > 1$ V vs. Ag/AgCl). A maioria das biomoléculas eletroativas, tais como: catecolamina, ácido ascórbico e ácido úrico, é oxidada próximo ao potencial de NADH. De forma geral, a oxidação direta de NADH em eletrodos não modificados, resulta na contaminação da superfície do eletrodo por adsorção dos produtos da oxidação do NADH, o que resulta em baixa sensibilidade (KUMAR e CHEN, 2008).

1.7- ELETRODOS MODIFICADOS PARA A ELETROANÁLISE DE NADH

Apesar do potencial aplicado nos eletrodos modificados ser relativamente menor que aqueles aplicados nos eletrodos não modificados, os primeiros apresentam baixa estabilidade, a qual pode ser resultado do bloqueio e/ou passivação da superfície do eletrodo, devido aos produtos gerados durante a oxidação de NADH.

Entretanto é possível contornar tais problemas, efetuando adequadamente os processos de pré-tratamento e condicionamento do eletrodo, os quais apresentaram resultados reprodutíveis (MOIROUX & ELVING, 1979; JAEGFELDT, 1980; JAEGFELDT *et al.*, 1978), entretanto, este tipo de procedimento não torna o eletrodo seletivo para a oxidação de NADH.

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

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

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

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

Do ponto de vista analítico, a vantagem da imobilização de mediadores é a possibilidade de sua reutilização com diminuição do custo por análise, maior estabilidade, maior sensibilidade e menor interferência de compostos indesejáveis como registrado anteriormente na literatura científica (GUILBAULT, 1976).

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

Um mediador de elétrons para atuar de forma eficiente deve satisfazer algumas exigências: além de possuir um potencial formal, E^0 , baixo ou compatível ao potencial ótimo na detecção de NADH, o mediador deve exibir elevada velocidade de reação, tanto como eletrodo quanto com o NADH, e também ser quimicamente estável em qualquer estado de oxidação (CHAUBEY e MALHOTRA, 2002).

Além disso, a reação do mediador deve envolver, preferencialmente 2 elétrons e 1 próton, possibilitando uma rápida transferência de elétrons na forma similar de hidreto numa reação homogênea com o NADH (Figura 4) (GORTON e DOMINGUEZ, 2002).

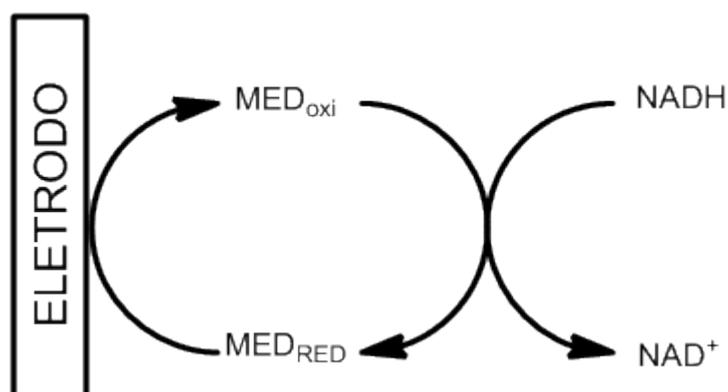


Figura 4 - Esquema do uso de mediador para a eletro-oxidação de NADH

Estudos com ênfase na oxidação eletrocatalítica de NADH têm atraído considerável atenção nos últimos anos. Neste contexto, há uma ampla variedade de mediadores redox como transportadores de elétrons de NADH para o eletrodo, causando, portanto, uma diminuição do sobrepotencial. Estes mediadores incluem catecol (JAEGFEDT *et al.*, 1981), quinonas (TSE e KUWANA, 1978; YAMASHITA *et al.*, 2003), ferrocenos (MATSUE *et al.*, 1987; RAMÍREZ-MOLINA *et al.*, 2003), fenilendiamina (RAVICHANDRAM e BALDWIN, 1983; PEREIRA *et al.*, 2003), fenoxazina (ZAITSEVA *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2002; KUBOTA e GORTON, 1999), fenotiazina (PERSSON, 1990; KUBOTA e GORTON, 1999), flavina (KUBOTA *et al.*, 1998; KUBOTA e GORTON, 1999) e complexos metálicos (RIVERA *et al.*, 1994) nitrocompostos (LIMA *et al.*, 2008).

Como podemos observar na Tabela 3, existe na literatura uma ampla variedade de mediadores que, com o desenvolvimento de novos métodos de imobilização, tem possibilitado a construção de novos tipos de configurações de eletrodos modificados para NADH.

Tabela 3 - Comparação do desempenho de alguns eletrodos modificados usados na eletrocatalise de NADH.

Referência	Mediador	pH	E_{aplicado} (mV)	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Sensibilidade ($\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$)	LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
(PEREIRA <i>et al.</i> , 2003)	Fenilenodiamia	7,0	-50 vs. SCE	40-800	0,02	7,10
(NASSEF <i>et al.</i> , 2006)	Ferrocenos	7,0	+150 vs. Ag/AgCl	1-10	0,01	0,15
(SANTOS <i>et al.</i> , 2002)	Flavina	7,0	-200 vs. SCE	10-520	0,05	—
(VASANTHA e CHEN, 2006)	Quinona	7,0	+350 vs. Ag/AgCl	10-100	0,05	0,50
(SANTOS <i>et al.</i> , 2002)	Fenoxazina	7,0	0 vs. SCE	10-750	0,05	—
(KUMAR e CHEN, 2007)	Complexos metálicos	6,4	+200 vs. Ag/AgCl	10-300	—	1,00
(LIU <i>et al.</i> , 2005)	Quinona	7,2	+200 vs. Ag/AgCl	5-1000	—	1,00
(LIMA <i>et al.</i> , 2008)	Nitrocompostos	7,0	+100 vs. Ag/AgCl	0,8-8,5	0,50	0,25
(GLIGOR <i>et al.</i> , 2009)	Fenotiazina	7,0	+ 200 vs. Ag/AgCl	2-100	—	2,00
(DAI <i>et al.</i> , 2009)	Quinona	7,0	+ 200 vs. Ag/AgCl	4-560	—	3,5

1.8- ÁCIDO XANTURÊNICO: BIOSÍNTESE E IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA

O ácido xanturênico (AX) é um metabólito da rota de oxidação do triptofano e sua formação a partir do triptofano é um processo complicado com um bom número de enzimas envolvidas na rota bioquímica. O processo completo para a formação do ácido xanturênico, de modo geral, consiste na oxidação do triptofano à formilquinurenina, hidrólise da formilquinurenina à quinurenina, hidroxilação da quinurenina à 3-hidroxiquinurenina, transaminação da 3-hidroxiquinurenina a um intermediário ceto-ácido na cadeia lateral e ciclização do intermediário, levando à formação do ácido xanturênico (Figura 5) (HAN *et al.*, 2007; GOBAILLE *et al.*, 2008).

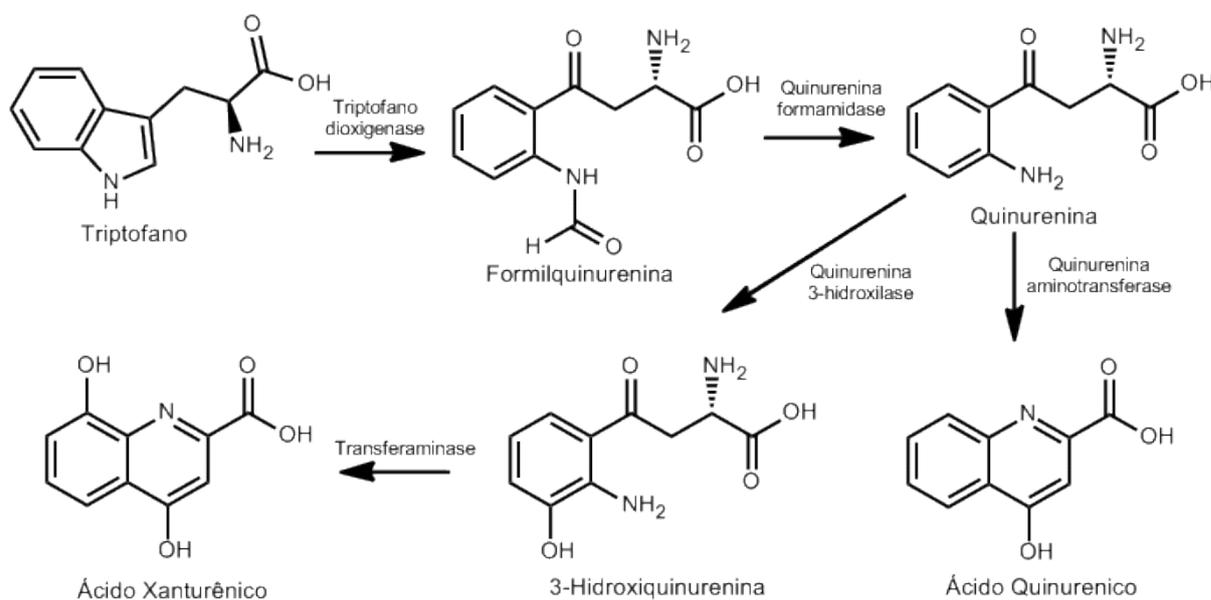


Figura 5 - Biossíntese do ácido xanturênico (GOBAILLE *et al.*, 2008).

A síntese e atividade do ácido xanturênico tem sido amplamente estudadas no mosquito transmissor da febre amarela (*Aedes aegypti*) e em mosquitos anofelinos transmissores da malária. Na malária, o AX tem se mostrado importante na fertilidade e maturação do gamatócito do plasmódio (BILLKER *et al.*, 2004).

A rota do AX em mamíferos não está bem definida. O AX tem sido reportado como um cromóforo capaz de provocar fotossensibilidade e foto-oxidação das proteínas das lentes dos olhos (MALINA *et al.*, 2001; ROBERTS *et al.*, 2001). O AX participa em eventos apoptóticos com modificações no transporte de Ca^{2+}

mitocondrial e consumo de oxigênio. Administração de altas doses de AX em ratos por via intraperitoneal parece induzir alguma sedação e analgesia (HEYLIGER *et al.*, 1998).

Altas concentrações de triptofano e deficiência de vitamina B₆ estimulam a formação de AX e outros metabólitos de triptofano, na rota da quinurenina (FLORREST *et al.*, 2004), o aumento do nível do ácido xanturênico é um indicador da deficiência de vitamina B₆ (ADAMS *et al.*, 1976).

Um grande número de trabalhos tem mostrado que a concentração de triptofano pode estar associada com o estresse oxidativo e o AX com os estágios patogênicos da diabetes (ROGER e MOHAN, 1994) e de catarata em idosos (MALINA, 1999). O AX possui conhecidas propriedades antioxidantes, formando quelatos com vários metais, especialmente com ferro (Figura 6) (MURAKAMI, HANEDA e YOSHINO, 2006)

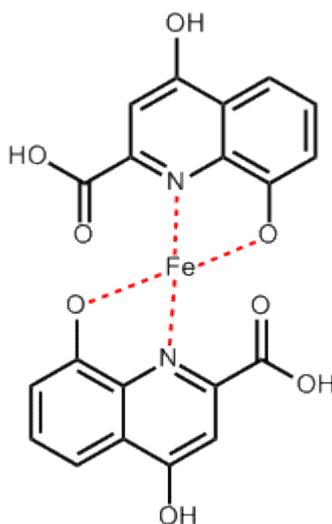


Figura 6 - Quelato do ácido xanturênico com o ferro.

Alguns complexos metálicos são capazes de produzir espécies reativas de oxigênio (WELCH *et al.*, 2002). No trabalho realizado por MURAKAMI e colaboradores (2006) foi comprovado que o AX pode atuar como um prooxidante pela formação de um complexo quelato redox-ativo.

Além disso, uma das razões para selecionar o ácido xanturênico diz respeito aos grupos fenólicos presente em sua estrutura, os quais são passíveis de sofrerem oxidação e subsequentemente reações de polimerizações gerando assim, dímeros e filmes poliméricos altamente estáveis e com propriedades eletroativas, imprescindíveis para sua utilização como mediador redox.

1.9- ELETRO-OXIDAÇÃO DE FENÓIS

Na eletro-oxidação de fenóis tem-se como primeiro passo a formação do radical fenoxila, o qual pode ser oxidado ou acoplar-se entre si, formando éteres e compostos poliméricos ou oligoméricos do tipo quinonóide. Os possíveis caminhos para a eletro-oxidação dos fenóis são mostrados na Figura 7 (GATTRELL e KIRK, 1993).

Espécies insolúveis de alto peso molecular bloqueiam a superfície do eletrodo e impedem uma eletro-oxidação efetiva dos fenóis. A eletropolimerização de fenóis pode ocorrer em diferentes eletrodos, por exemplo: Fe, C, Cu, Ni, Cr, Ti, Zn, Au, Pt e Ag. A velocidade de desativação do eletrodo depende de uma grande variedade de parâmetros, tais como concentração do composto fenólico, a adsorção do mesmo no eletrodo, a natureza do eletrodo, o pH da solução, solvente, aditivos, potencial e densidade de corrente. Um aumento na concentração do composto fenólico propicia a formação de uma grande quantidade de radicais fenoxila, os quais estão envolvidos no processo de eletropolimerização, causando uma rápida desativação do eletrodo. Oxidação de dimetilfenol foi demonstrada ser mais rápida em metais nobres, tais como platina e ouro. A desativação do eletrodo é mais comum em meio alcalino (EZERSKIS e JUSYS, 2001).

Estudos do mecanismo de eletro-oxidação de vários derivados fenólicos mostraram que a polimerização de compostos fenólicos ocorre, principalmente, nas posições *orto* e *para*. A explicação para este fato é que o radical formado é estabilizado por ressonância nestas posições, como esperado por cálculos teóricos. No caso da polimerização, a rota mais favorecida energeticamente para

acoplamento é uma estrutura do tipo *sandwich*, ligando-se pelos carbonos nas posições *para-para* e *orto-orto* (GATTRELL e KIRK, 1992).

Os compostos poliméricos gerados, de forma geral, possuem uma baixa permeabilidade e uma forte aderência ao eletrodo. Estes fatores bem como a formação de éteres e quinonas menos reativas são postulados como as principais razões da desativação do eletrodo, durante a oxidação (LAPUENTE *et al*, 1998).

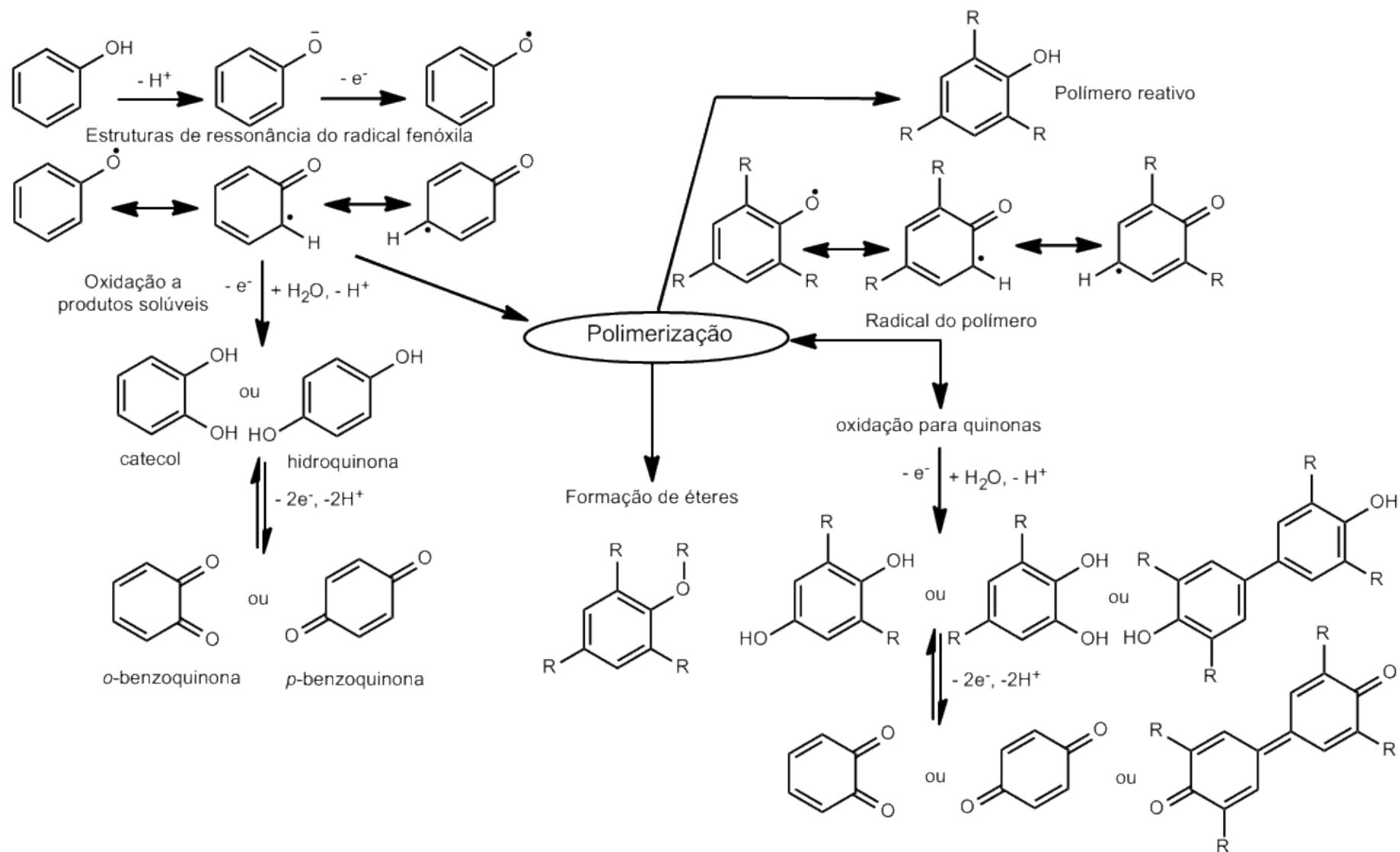


Figura 7 - Rotas para polimerização de fenóis (EZERSKIS e JUSYS, 2

The image features a minimalist design with three blue circles of varying sizes. Each circle is composed of three concentric layers: a dark blue center, a medium blue ring, and a light blue outer ring. Two thin, light blue lines intersect at the top left, forming a large 'V' shape that frames the circles. The word 'OBJETIVOS' is centered in a bold, dark blue, sans-serif font.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1- - Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi de desenvolver e caracterizar um sensor eletroquímico para NADH modificando eletrodos de carbono vítreo utilizando nanotubos de carbonos e ácido xanturênico como mediador. Além deste aspecto, a tentativa de elucidar o mecanismo de formação das espécies eletroativas, poli-ácido xanturênico, gerada *in situ* e adsorvida nos nanotubos de carbono, também foi foco deste trabalho.

2.2- Objetivos específicos

O trabalho teve os seguintes objetivos específicos:

- 1- Promover a modificação de eletrodos de carbono vítreo com nanotubos de carbono e investigar a possível atuação de ácido xanturênico na superfície destes eletrodos, como mediador de oxidação de substâncias biologicamente importantes;
- 2- Avaliar os efeitos da acidez e área superficial das matrizes empregadas sobre o comportamento eletroquímico do sistema;
- 3- Avaliar a cinética de transferência de elétrons entre as espécies imobilizadas e o eletrodo;
- 4- Estudar a oxidação eletrocatalítica do NADH, usando os eletrodos modificados;
- 5- Estudar os parâmetros cinéticos da oxidação eletrocatalítica do NADH frente ao sistema desenvolvido, empregando eletrodo de disco rotatório;
- 6- Caracterizar os eletrodos quimicamente modificados.

The image features a minimalist design with three blue circles of varying sizes. Each circle is composed of three concentric layers: a dark blue center, a medium blue ring, and a light blue outer ring. Two thin, light blue lines intersect at the top left, forming a large 'V' shape that frames the circles. The circles are positioned at the top right, middle right, and bottom right of the page. The word 'METODOLOGIA' is centered in the lower half of the page in a bold, dark blue, sans-serif font.

METODOLOGIA

3. METODOLOGIA

2.2- REAGENTES

Os seguintes reagentes foram obtidos dos seus respectivos fornecedores e utilizados sem nenhum tratamento prévio: ácido xanturênico e β -nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) na forma reduzida foram obtidos da Sigma-Aldrich (**St. Louis**, MO, USA), fosfato de sódio monobásico monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), fosfato de sódio dibásico dihidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), hidróxido de sódio (NaOH), ácido clorídrico (HCl) e N,N-dimetilformamida (DMF) foram obtidos da Vetec, nanotubos de carbono de múltiplas paredes (*multi-walled carbon nanotube*), MWCNT, foram obtidos da Sigma.

2.3- EQUIPAMENTOS E MATERIAIS

Um potenciostato modelo PGSTAT30 Eco Chemie da AUTOLAB (Utrecht, The Netherlands) interfaceado a um microcomputador (software: GPES 4.9), foi empregado para as medidas eletroquímicas (Figura 8) e um *RDE Controller* (controlador de eletrodo de disco rotatório) da AUTOLAB para os experimentos com eletrodo de disco rotatório (EDR) (Figura 9).



Figura 8 - Potenciostato EcoChemie da AUTOLAB



Figura 9 - EDR da AUTOLAB.

Uma célula eletroquímica com três eletrodos foi usada, sendo o eletrodo de referência um Ag/AgCl (KCl saturado), um fio de platina como eletrodo auxiliar e um eletrodo de carbono vítreo tanto na ausência quanto na presença de modificação como eletrodo de trabalho e foram usados para todas as medidas (Figura 10).

As medidas foram realizadas usando 5,0 mL de solução tampão. A eliminação de oxigênio dissolvido foi feita pelo borbulhamento de um fluxo de nitrogênio ($N_{2(g)}$) nas soluções durante 10 minutos antes das análises.

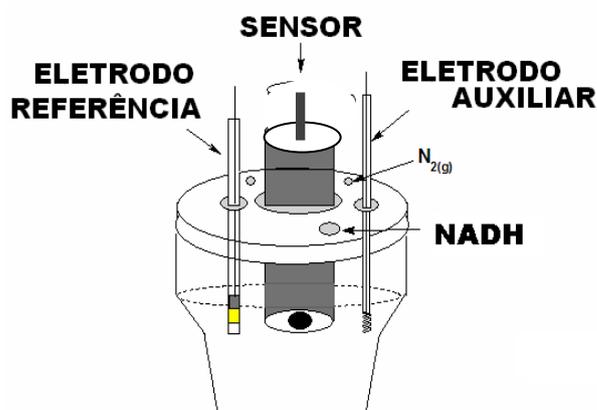


Figura 10 - Modelo esquemático da célula eletroquímica.

2.4- MÉTODOS

2.4-1. Preparação de solução de ácido xanturênico

Em um eppendorf, foi pesado 6,1 mg de ácido xanturênico, adicionado 440 μL de NaOH 0,1 mol L^{-1} e 460 μL de água destilada, agitado até a completa dissolução do ácido xanturênico e adicionado 100 μL de água destilada para completar o volume de 1 mL. Esta solução estoque foi sempre preparada minutos antes de sua utilização.

2.4-2. Limpeza do eletrodo de carbono vítreo (ECV)

O ECV foi polido com alumina ($\varnothing=0,3 \mu\text{m}$), lavado com água milli-Q, levado ao ultrassom por 2-3min em etanol e lavado novamente com água destilada. A limpeza do eletrodo foi verificada utilizando ferrocianeto de potássio, após verificação da limpeza do eletrodo, o mesmo foi lavado com água milli-Q e seco a temperatura ambiente.

2.4-3. Modificação do eletrodo de carbono vítreo com MWCNT

Em um eppendorf, foi pesado 2 mg de MWCNT, adicionado 1 mL de DMF, agitado e deixado por 2 horas no ultrassom para completa dispersão, 2 μL da solução de MWCNT em DMF, então foi depositada sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo em alíquotas de 1 μL , sempre esperando secar a 80 °C para adição da alíquota seguinte.

3. Ativação do ECV/MWCNT com ácido xanturênico

Após preparação do GCE/MWCNT, o mesmo foi lavado com água milli-Q e colocado em uma solução 120 μM de XA em tampão fosfato pH 5,5 e ativado utilizando voltametria cíclica na faixa de potencial entre -0,5 a 1,0 V vs. Ag/AgCl, 10 ciclos, após procedimento o eletrodo foi removido desta solução, lavado com água milli-Q e colocado em uma nova solução tampão fosfato pH 7,0 na ausência de XA.

4. Catálise com NADH

O eletrodo modificado ECV/MWCNT ativado com XA foi colocado em uma solução de tampão fosfato pH 7,0, então foi adicionado alíquotas de NADH e varrido a uma velocidade 5 mV s^{-1} .

3.3.6. Estudo cinético do processo eletrocatalítico

As medidas para o estudo da cinética do processo eletrocatalítico do NADH, envolvendo variação de rotação do eletrodo, foram realizadas utilizando um eletrodo de disco rotatório da Metrohm controlado pelo software GPES.

Após a modificação e ativação eletrodo, foi preparado uma solução estoque de NADH na concentração de $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e adicionado alíquotas de $50 \mu\text{L}$ desta na cela eletroquímica contendo 5 mL de solução tampão fosfato pH 7,0. A partir deste ponto, a velocidade de rotação foi variada de 40 a 700 rpm e com os dados obtidos foi construído uma curva do inverso da corrente eletrocatalítica em função do inverso da raiz quadrada da velocidade de rotação, com o objetivo de determinar o k_{obs} (constante global da reação) para a primeira concentração de NADH neste valor de pH.

Posteriormente, adicionado novamente, $50 \mu\text{L}$ de NADH e repetido o processo descrito acima para mais 5 concentrações de NADH.

3.3.7. Otimização do processo de ativação

As condições de modificação do eletrodo foram otimizadas afim de se obter a melhor resposta catalítica com NADH. Os seguintes parâmetros foram otimizados:

- O pH, durante a ativação do ácido xanturênico;
- A quantidade de nanotubos sob a superfície do eletrodo;
- A concentração do ácido xanturênico em solução durante a ativação.

O cálculo de eficiência catalítica (EC) foi estimado de acordo com a equação 1 (GLIGOR *et al*, 2009).

$$EC = \frac{(I_p)_{NADH = 0,4 \text{ mM}} - (I_p)_{NADH = 0}}{(I_p)_{NADH = 0}} \quad (\text{Equação 1})$$

Na qual, $(I_p)_{NADH=0,4mM}$ é a corrente de pico na presença de NADH a concentração de 0,4 mM e $(I_p)_{NADH=0}$ é a corrente de pico na ausência NADH, com a velocidade de varredura de 5 mV s^{-1} em tampão fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$. Os dados utilizados foram os da segunda varredura, pois a partir da segunda varredura a corrente estabiliza-se.

3.3.8. Determinação da área ativa

A área ativa do ECV/MWCNT/poli-XA (A) foi calculada utilizando ferricianeto de potássio como sonda e a equação de Randles-Sevcik (Equação 2):

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

Sendo D e C_o são o coeficiente de difusão e concentração no seio da solução, respectivamente. Experimentos de voltametria cíclica em diferentes velocidades de varredura foram realizados no ECV/MWCNT/poli-XA em uma solução 1 mmol.L^{-1} $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ em $\text{KCl } 0,05 \text{ mol.L}^{-1}$. 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 (SISWANA, OZOEMENA e NYOKONG, 2006).

The background features a white page with abstract blue geometric elements. Three circles of varying sizes are arranged vertically, each composed of concentric circles in different shades of blue. Two thin blue lines intersect at the top left, forming a large 'V' shape that frames the central text and circles. The text is centered in the lower half of the page.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.1- – PREPARAÇÃO DO ELETRODO QUIMICAMENTE MODIFICADO

1.1-1. Modificação com MWCNT

Inicialmente, o eletrodo de carbono vítreo foi modificado por um simples processo de recobrimento da área ativa do eletrodo por nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT). 2 μL de uma dispersão de MWCNT em DMF foram colocados diretamente na superfície do eletrodo de carbono vítreo e deixados secar a 80 °C. Após este processo foi possível observar uma fina e homogênea camada sobre a superfície do eletrodo. É importante ressaltar que se o processo de modificação e todos os demais critérios para modificação do eletrodo não fossem seguidos, a camada de nanotubos era visivelmente irregular.

O processo de modificação do eletrodo pela adição de nanotubos é muito importante para a atividade eletrocatalítica, o que nos leva a concluir que os nanotubos exercem um papel importante no eletrodo, não só aumentando a área ativa do eletrodo, mas de alguma maneira, interagindo na formação e estabilidade do polímero gerado após a ativação com ácido xanturênico.

Podemos observar este fato nos voltamogramas a seguir, em que temos o par redox da espécie eletroativa gerada a partir do ácido xanturênico em eletrodo de carbono vítreo sem (Figura 11A) e com (Figura 11B) a modificação com MWCNT.

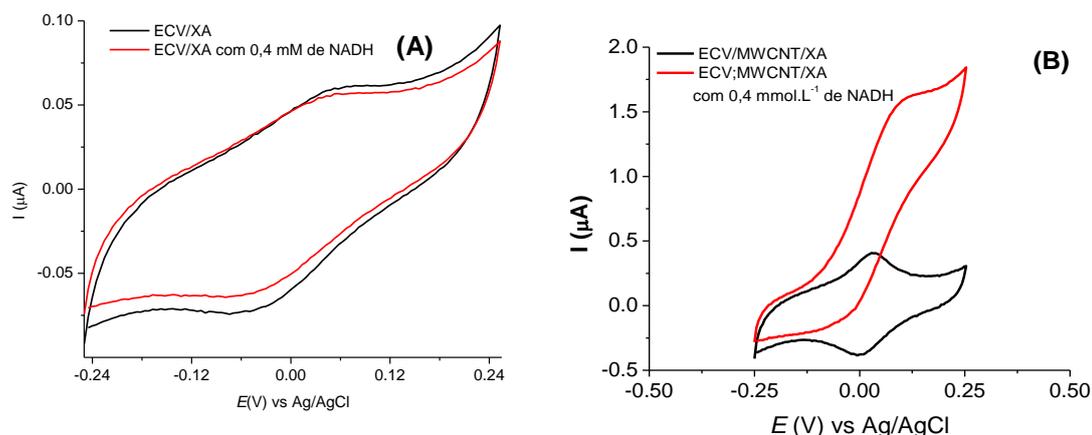


Figura 11 - Catálise do NADH em eletrodo de carbono vítreo sem (A) e com a modificação com MWCNT/XA (B), voltamogramas obtidos em tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹ pH 7,0 e $v = 0,005 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$

1.1-2. – Processo de polimerização do Ácido Xanturênico

Após a modificação com nanotubos, as espécies eletroativas, o grupo redox quinona (GRQ), foi eletroquimicamente gerado *in situ* a partir do XA (processo de eletropolimerização) no ECV/MWCNT, após a ciclagem de potencial na faixa de -0.5 a +1,0 V versus Ag/AgCl em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 5,5, com uma velocidade de varredura de 0,005 V.s⁻¹ (Figura 12). O processo de eletropolimerização foi otimizado observando-se as seguintes condições experimentais: o número de ciclos (10 varreduras) aplicado durante a formação do filme polimérico; a concentração de XA (120 μmol L⁻¹) e o pH da solução (pH 5,5). As melhores condições para eletropolimerização foram consideradas aquelas que proporcionaram a maior resposta electrocatalítica do ECV/MWCNT/poli-XA para a oxidação de NADH (resultados do processo de otimização serão discutidos no item seguinte).

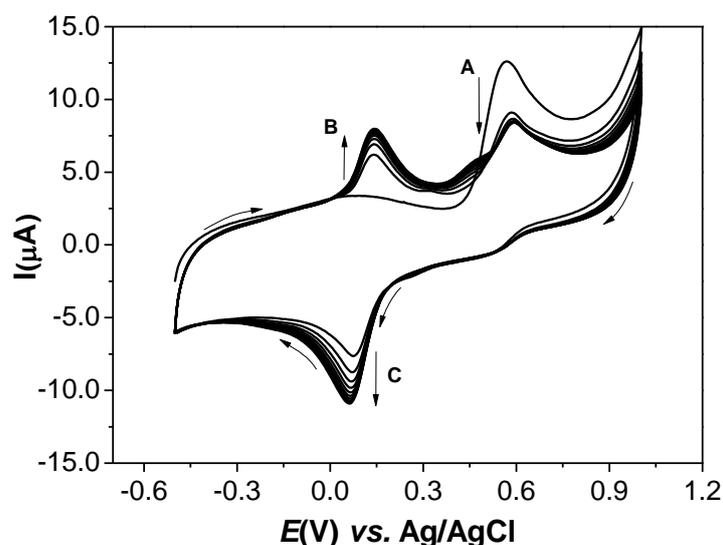


Figura 12 - Ativação do GCE/MWCNT com ácido xanturênico 120 μM em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 5,5 e $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$.

Um processo de eletropolimerização similar foi anteriormente descrito para polímeros eletroativos bifuncionais, poli(5-hidroxi-1,4-naftoquinona (juglona)-co-5-hidroxi-3-ácido tioacético-1,4-naftoquinona (Piro *et al.*, 2005), o qual foi utilizado para

a eletrodeteção direta da hibridização do DNA e também no desenvolvimento de um biossensor para lactato (Haccoun *et al.*, 2006).

Inicialmente, os voltamogramas obtidos com o ECV/MWCNT na solução de XA mostram uma onda de oxidação irreversível em 0,6 V versus Ag/AgCl (Figura 12), correspondente ao início do processo de eletropolimerização. Assim, como pode ser observado na Figura 12, a corrente do pico “A” diminui enquanto um novo par redox “B/C” cresce com sucessivas varreduras, indicando que a superfície do eletrodo de trabalho está sendo gradualmente recoberta por um filme eletroativo (GLIGLOR *et al.*, 2009). O par redox A/B (Figura 13) corresponde a um processo de transferência de elétrons quase reversível.

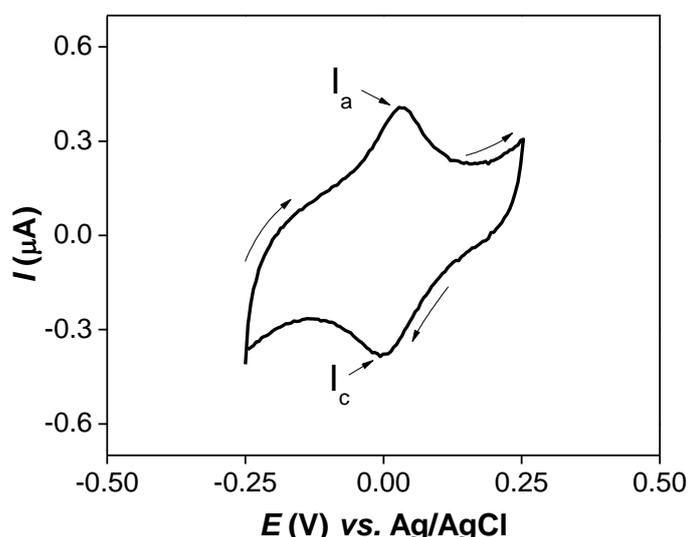


Figura 13 - Voltamograma cíclico do ECV/MWCNT/poli-XA em tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹, pH 7,0, $E_{\text{inicial}} = -0,25 \text{ V}$ $v = 0.005 \text{ V.s}^{-1}$.

Com base na literatura podemos ter uma ideia das estruturas do produto de oxidação e dimerização do XA (Figura 14). O dímero apresenta um sistema quinona/hidroquinona, o qual é pode ser o nosso grupo mediador ECV/MWCNT/poli-XA (Haccoun *et al.*, 2006; Piro *et al.*, 2005).

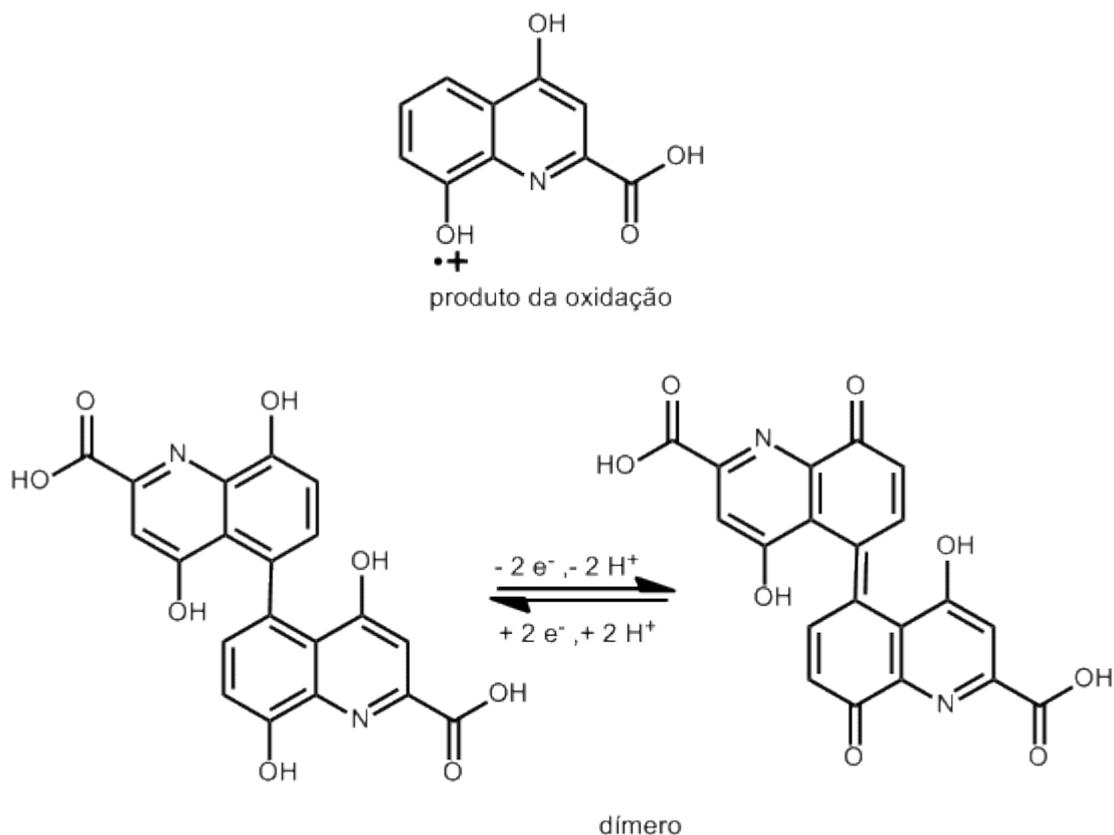


Figura 14 - Estruturas do possível produto de oxidação e dímeros do XA.

1.2- - OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE ATIVAÇÃO

Com o intuito de otimizar a resposta eletrocatalítica do ECV/MWCNT/poli-XA para a oxidação de NADH, o efeito do pH da solução de ativação, a concentração do ácido xanturênico e a quantidade de nanotubos na superfície do eletrodo foram otimizados.

O pH 7,0 foi previamente escolhido para o estudo eletrocatalítico devido a estabilidade do NADH neste pH e ao interesse de aplicar, futuramente, este sensor na construção de um biossensor enzimático NADH dependente. Como podemos observar nos gráficos a seguir, o pH 5.5 foi o que apresentou a maior eficiência catalítica e a concentração inicial do ácido xanturênico foi de $120 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

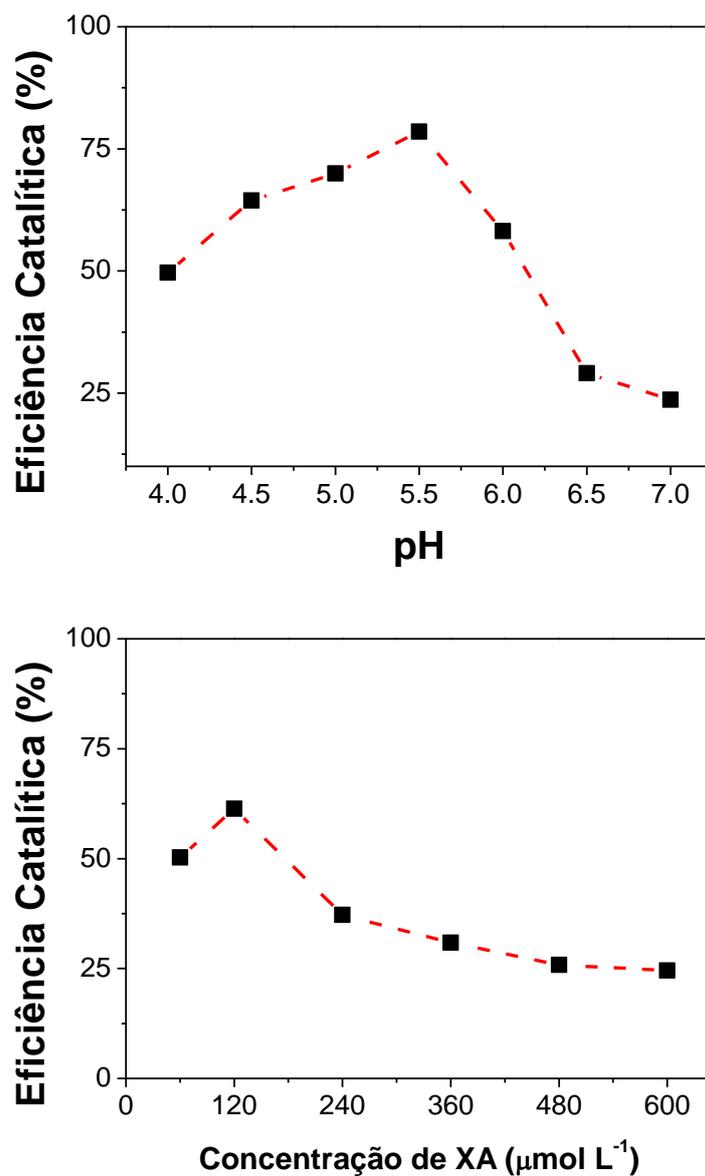


Figura 15 - Eficiência catalítica (EC) para o ECV/MWCNT/poli-XA variando o pH da solução de ativação (A) e a concentração da solução XA na ativação (B).

1.3- - CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DO ELETRODO MODIFICADO

Estudos para caracterizar a cinética do processo redox do eletrodo foram realizados. Voltamogramas cíclicos representativos obtidos para o eletrodo de carbono vítreo modificado são mostrados na Figura 16 para várias velocidades de varredura de potencial (20-500 mV s^{-1}). A observação de picos voltamétricos persistentes e bem definidos indica que o processo redox da espécie ativa do XA exibe características de espécies confinadas na superfície do eletrodo.

Os voltamogramas, na Figura 16 indicam reversibilidade no processo redox do sistema ECV/MWCNT/poli-XA, apesar de não total simetria de picos anódico e catódico.

O potencial formal [$E^0=(E_{pa} + E_{pc})/2$] é praticamente independente do logaritmo da velocidade de varredura de potencial, sugerindo uma transferência de carga rápida na faixa de velocidade de varredura estudada (Figura 17) (ARDAKANI *et al.*, 2006).

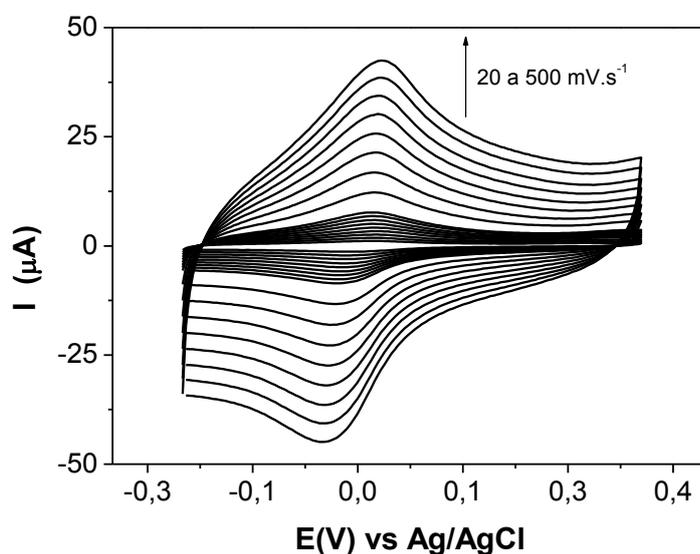


Figura 16 - Voltamogramas cíclicos em ECV/MWCNT/poli-XA em solução de tampão fosfato 0,1 mol.L^{-1} pH 7,0 em diferentes velocidades de varredura (20-500 mV s^{-1}).

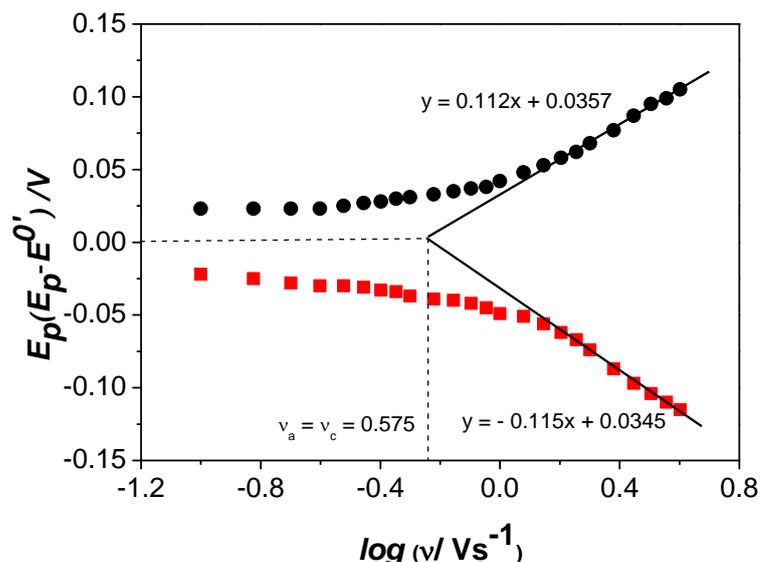


Figura 17 - Gráfico de E_p vs. $\log \nu$ a partir do voltamogramas ciclicos em varias velocidade de varreduras.

Outro aspecto que deve ser observado é a correlação entre a intensidade de corrente de pico e a velocidade de varredura. No caso do sistema ECV/MWCNT/poli-XA (Figura 18) uma correlação linear entre I_p vs ν foi observada, confirmando que a espécie eletroativa gerada a partir do ácido xanturênico está adsorvida sobre a superfície do eletrodo modificado com MWCNT.

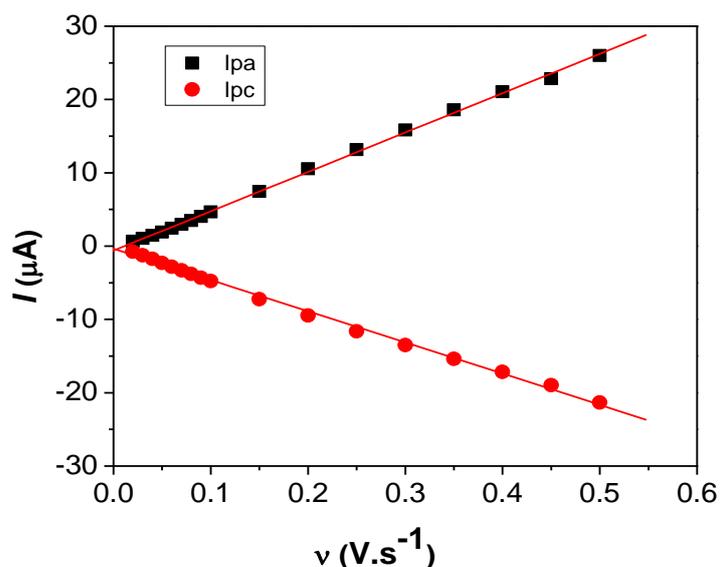


Figura 18 - Dependência da corrente de pico anódico (I_{pa}) e catódico (I_{pc}) em função da velocidade de varredura em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 7,0.

Para complementação dos estudos de caracterização do sistema, a Figura 19 apresenta o efeito da velocidade de varredura (ν) sobre a separação dos potenciais de pico (ΔE_p), onde é possível observar que ocorre um aumento de ΔE_p com o aumento da velocidade de varredura, o qual é mais evidente em velocidades maiores. Este comportamento indica que a cinética de transferência de elétrons está sendo afetada pela resistência do próprio material do eletrodo.

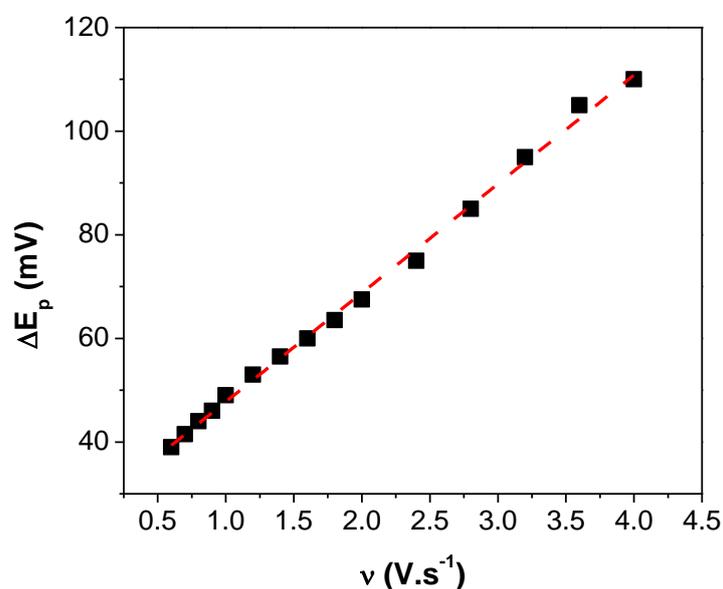


Figura 19 - Dependência da variação de potencial de pico (ΔE_p) como função da velocidade de varredura.

1.4- - O EFEITO DO pH NO COMPORTAMENTO REDOX DO ELETRODO MODIFICADO

O comportamento redox da espécie eletrogerada a partir da oxidação do XA que esta adsorvida no eletrodo depende do pH do meio. Na figura 20 são mostrados os voltamogramas cíclicos do eletrodo modificado em várias soluções de tampão fosfato de pH conhecidos. Os valores de pH da solução foram: 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0. Como podemos observar, a posição do potencial de pico depende do pH. Todas as mudanças voltamétricas de potencial e corrente de pico com o pH foram reproduzíveis, ou seja, o mesmo voltamograma pode ser obtido se o eletrodo é transferido de uma solução para outra com diferente pH; ao retornar para a solução inicial, o valor é restabelecido.

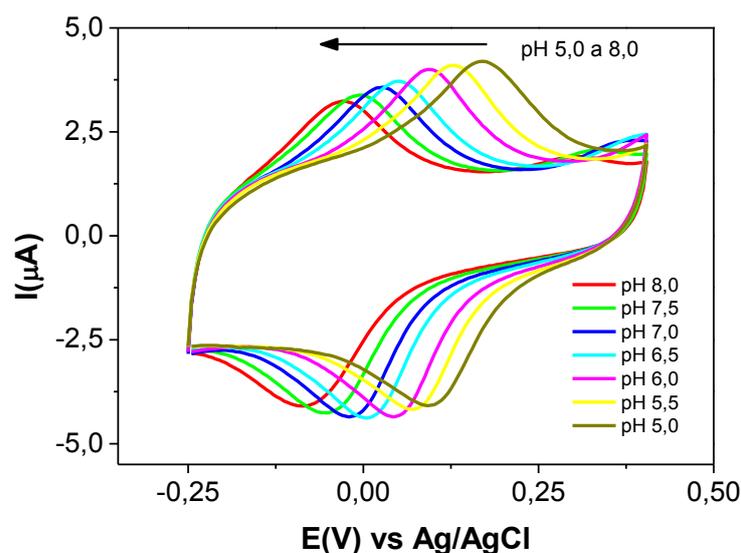


Figura 20 - Efeito do pH no comportamento redox do ECV/MWCNT/poli-XA, voltamogramas obtidos em tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹ e $v = 0,05 \text{ V.s}^{-1}$

Na faixa de pH estudada, houve variação do potencial de pico de redução, para potenciais mais negativos, com o aumento do valor de pH com inclinação de 63 mV por unidade de pH (Figura 21). Este resultado está de acordo com o valor teórico de 59mV por unidade de pH, para um sistema reversível com igual número entre H^+ e e^- (KUMAR e CHEN, 2007).

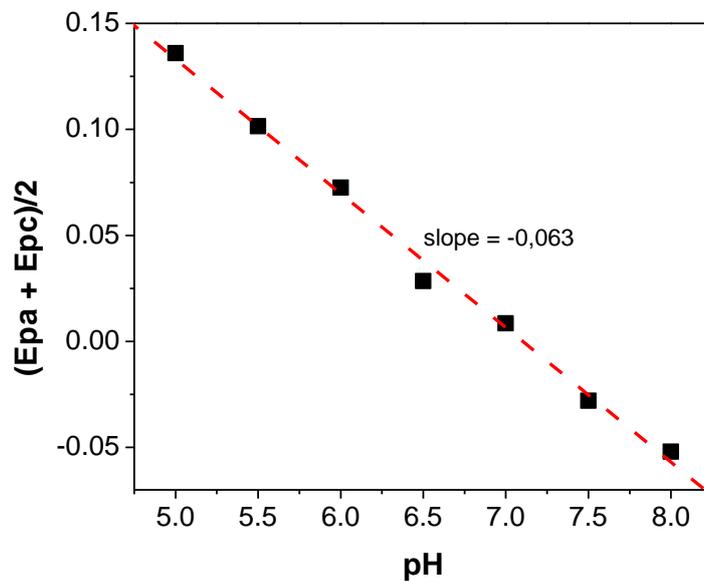


Figura 21 - Potencial formal (E^0) do ECV/MWCNT/poli-XA em função do pH. Condições empregadas: solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

1.5- - ESTUDO DA ELETROOXIDAÇÃO DE NADH

Após o procedimento de ativação *in situ* na superfície do eletrodo modificado como previamente descrito, o eletrodo modificado foi aplicado com intuito de testar a atividade electrocatalítica para oxidação de NADH. Inicialmente, as respostas voltamétricas foram obtidas em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ e pH 7 na ausência e presença de NADH 0,4 mmol L⁻¹ com $E_{\text{inicial}} = -0,25$ V e $E_{\lambda} = 0,25$ V, Figura 22. Na ausência de NADH, um par redox de picos bem definidos pode ser observado. Após adição de NADH 0,4 mmol L⁻¹, houve um aumento drástico da corrente de pico anódica, ao passo que nenhuma corrente catódica foi observada na varredura reversa. Este comportamento é consistente com um forte efeito electrocatalítico. Além disso, sob as mesmas condições experimentais, a oxidação direta de NADH no eletrodo de carbono vítreo não modificado foi observada apenas em potenciais mais positivos. O potencial de pico catalítico é observado em 50 mV *versus* Ag/AgCl.

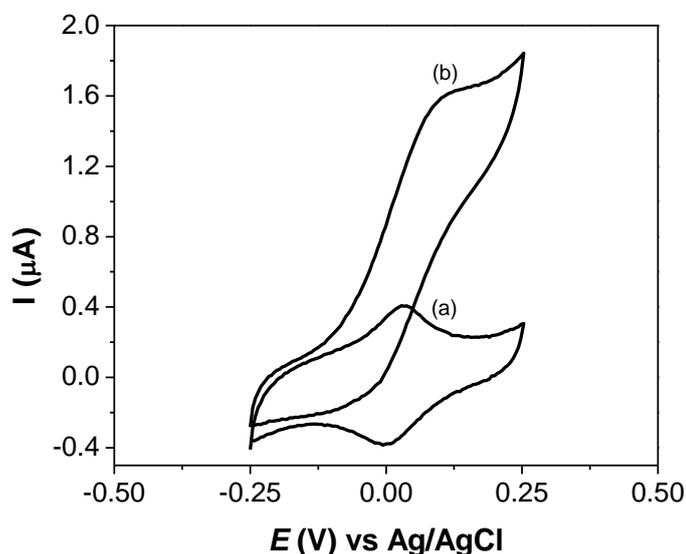


Figura 22 – Voltamogramas cíclicos para o GCE/MECNT/XA, na presença (b) e na ausência (a) de NADH 0,4 mmol L⁻¹; Velocidade de varredura (v): 5,0 mV s⁻¹. Estudos realizados em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ em pH 7,0.

Como esperado, o pico de oxidação catalítico desloca gradualmente para potenciais mais positivos com o aumento da velocidade de varredura, sugerindo uma limitação cinética na reação entre os grupos eletroativos e o NADH. Por outro lado, um gráfico da corrente catalítica i_p versus a raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial ($v^{1/2}$) na faixa de velocidade de 5 a 13 mV s^{-1} foi construído e resultou numa dependência linear (Figura 23), expressa pela Equação 3 seguinte:

$$I(\mu\text{A}) = 2,6799 + 3,3942 v^{1/2} (\text{V s}^{-1})^{1/2} \quad (\text{Equação 3})$$

Assim, esta dependência linear com $v^{1/2}$ sugere que o processo seja controlado por difusão na faixa de velocidade de varredura de potencial estudada. Para ratificar que o processo de oxidação eletrocatalítica entre o NADH e o ECV/MWCNT/poli-XA de fato apresenta uma etapa química acoplada, foram realizados alguns ensaios neste sentido, o qual através do gráfico da densidade de corrente de pico normalizada com a raiz quadrada da velocidade de varredura ($I/v^{1/2}$) versus a velocidade de varredura de potencial (Figura 24) é possível observar um perfil característico de um típico processo eletroquímico-químico catalítico (EC_{cat}) (Bard e Faulkner, 2001).

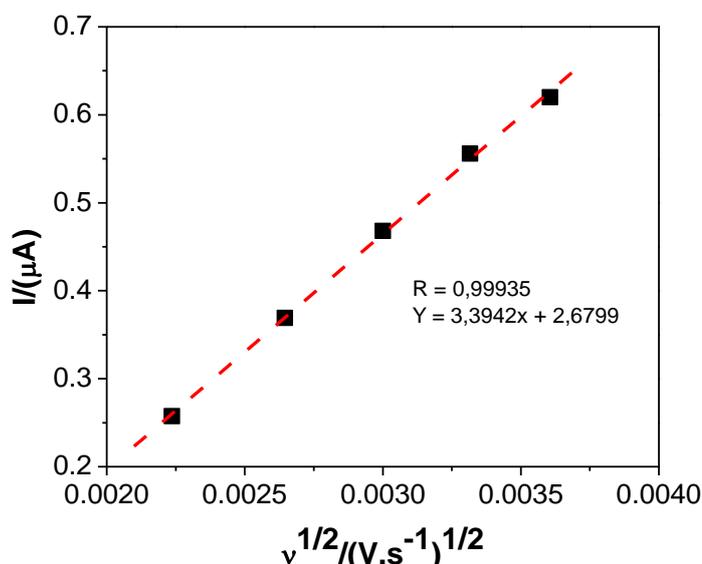


Figura 23 - Variação da corrente de pico anódica i vs. $v^{1/2}$ no GCE/MWCNT/XA em solução contendo $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ de NADH. Medidas realizadas em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0 e v : $0,005$ - $0,013 \text{ V s}^{-1}$

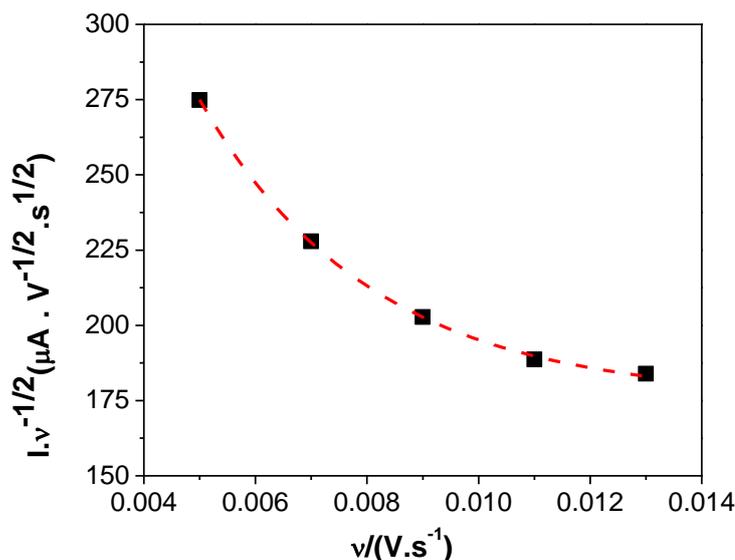


Figura 24 - Variação da corrente de pico anódica normalizada $i_p v^{-1/2}$ vs. $v^{1/2}$ no GCE/MWCNT/XA em solução contendo $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ de NADH. Medidas realizadas em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0 e v : $0,005\text{-}0,013 \text{ V s}^{-1}$.

1.6- ESTUDOS CRONOAMPEROMÉTRICOS

A cronoamperometria de duplo salto de potencial e outros métodos eletroquímicos foram empregados para a obtenção de parâmetros eletroquímicos. A Figura 25 mostra as curvas de corrente *versus* tempo, obtidos com ECV/MWCNT/poli-XA, $E_{\text{inicial}} = 100 \text{ mV}$ e $E_{\text{final}} = -100 \text{ mV}$ *versus* Ag/AgCl para várias concentrações de NADH. Como pode ser verificado, não há corrente catódica líquida correspondente à redução do mediador na presença de NADH.

Além disso, os cronoamperogramas de duplo salto de potencial direto e reverso para o mediador na ausência de NADH mostraram-se simétricos com um consumo de carga igual para redução e oxidação do sistema redox eletrogerado na superfície do eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNT. Por outro lado, na presença de diferentes concentrações de NADH, os valores de corrente anódica associada com os amperogramas diretos são significativamente maiores do que aqueles observados para o processo reverso (Figura 25).

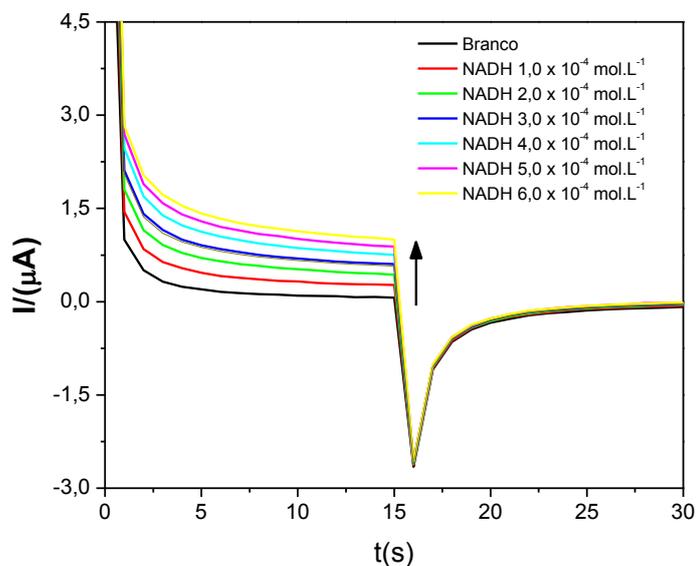


Figura 25 - Cronoamperogramas obtidos no GCE/MWCNT/XA em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7 na ausência (Branco) e presença de NADH, $E_{\text{inicial}} = 0,10$ e $E_{\text{final}} = -0,10$ vs. Ag/AgCl, respectivamente.

A partir da integração dos cronoamperogramas é possível visualizar melhor o aumento da carga para os processos catódico e anódico, onde temos o aumento da carga para o processo anódico e diminuição no processo catódico (Figura 26).

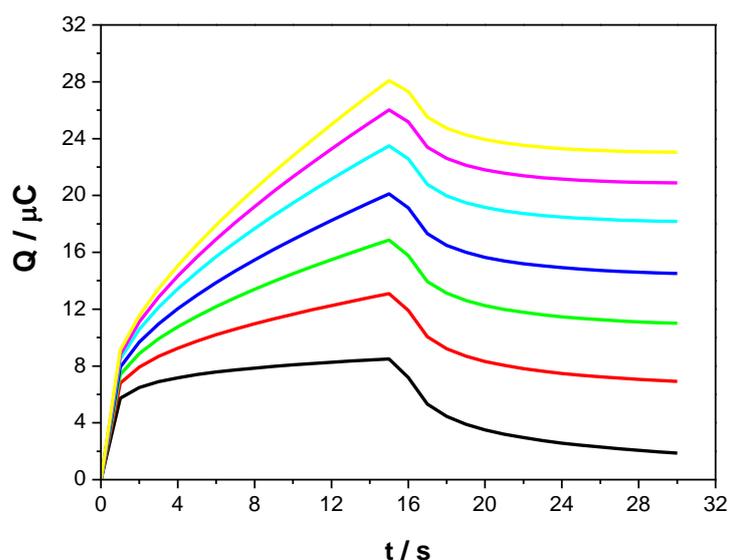


Figura 26 – Integração dos cronoamperogramas.

A cronoamperometria foi usada para estimar o coeficiente de difusão do NADH em solução. Para um material eletroativo com coeficiente de difusão, D , a corrente correspondente a reação química (sob controle difusional) é descrito pela equação de Cottrell (BARD e FAULKNER, 2001):

$$I = nFD^{1/2}C_0\pi^{-1/2}t^{-1/2} \quad (\text{Equação 4})$$

sendo D e C_s o coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$) e a concentração no seio da solução de NADH (mol cm^{-3}), respectivamente. A Figura 27 mostra os gráficos de I versus $t^{1/2}$ com o melhor ajuste linear para diferentes concentrações de NADH, o qual indica que a corrente observada deve ser controlada pela difusão de NADH em solução.

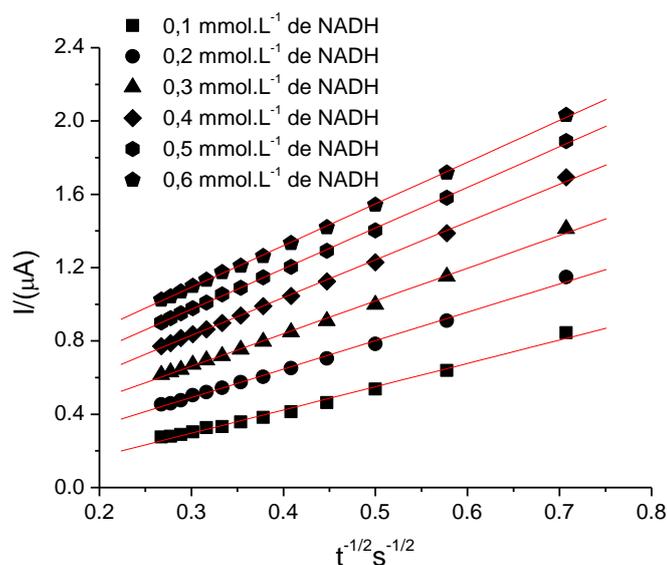


Figura 27 - gráfico de I vs. $t^{-1/2}$ obtidos a partir dos cronoamperogramas.

Um gráfico a partir dos declives obtidos das linhas retas *versus* a concentração de NADH foi construído (Figura 28). A partir do declive da Figura 28 e usando a equação de Cottrell (Equação 4), um coeficiente de difusão de $2,4 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ foi obtido para a faixa de concentração de NADH estudada. Este valor está próximo aos valores reportados na literatura (WU *et al.*, 1999).

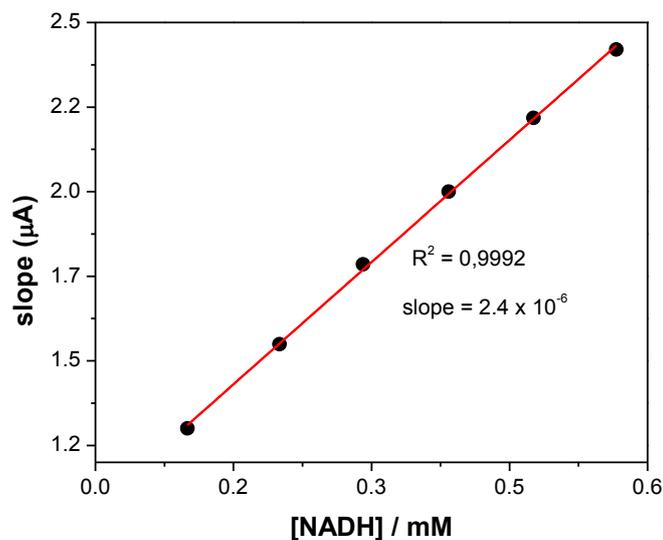


Figura 28 - gráfico de I vs. $t^{-1/2}$ versus a concentração de NADH

Além disso, a constante de velocidade, κ , para a reação química entre o NADH e os sítios redox confinados na superfície do eletrodo modificado pode ser avaliado pela cronoamperometria com base no método descrito na literatura (GALUS, 1976):

$$I_{cat}/I_L = \gamma^{1/2} \pi^{1/2} = \pi^{1/2} (\kappa C_s t)^{1/2} \quad (\text{Equação 5})$$

A partir do declive do gráfico I_{cat}/I_L versus $t^{-1/2}$ (Figura 29) podemos calcular de forma simples o valor de k para uma dada concentração do NADH. O valor calculado para k na nesta concentração foi obtido e apresentou um valor de $6,65 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Figura 30).

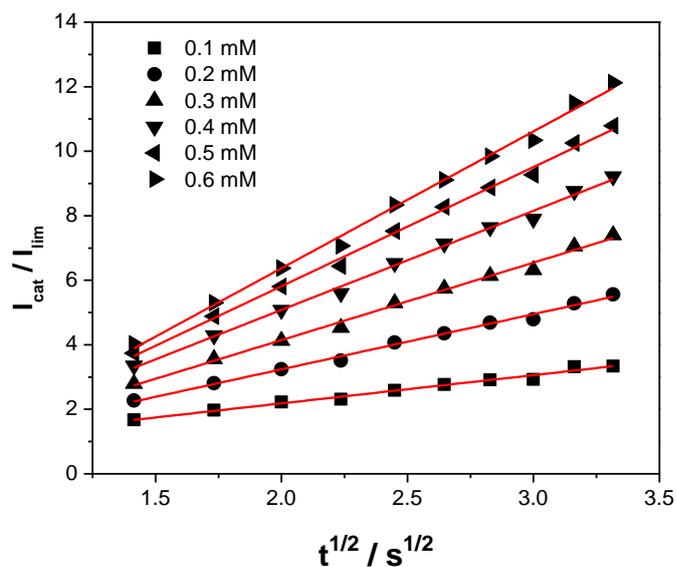


Figura 29 - Dependência de I_{cat}/I_L vs. $t^{1/2}$ derivado dos dados dos cronoamperogramas

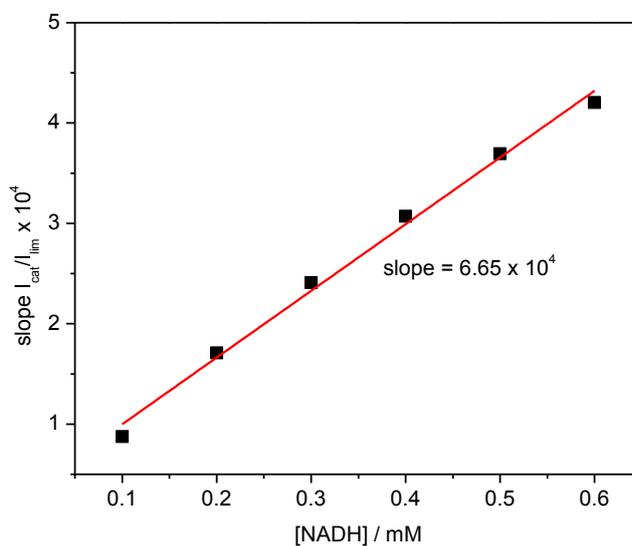


Figura 30 - Gráfico da inclinação de I_{cat}/I_L vs. a concentração de NADH.

1.7- ESTUDOS COM ELETRODO DE DISCO ROTATÓRIO

Para uma melhor avaliação quantitativa do comportamento eletrocatalítico da oxidação de NADH no ECV/MWCNT/poli-XA medidas cinéticas foram realizadas em diferentes concentrações de NADH em diferentes velocidades de rotação ω (rad s^{-1}) em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) e uma velocidade de varredura fixa de 5 mV s^{-1} (Figura 31).

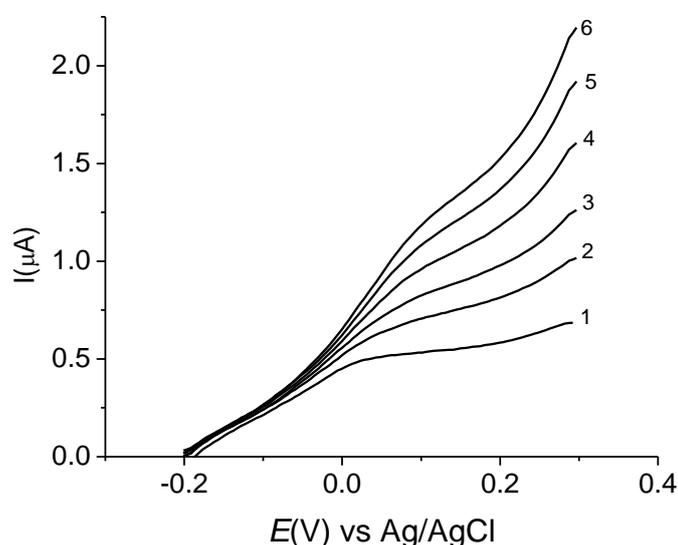


Figura 31 - Curvas de polarização obtidas para oxidação eletrocatalítica de NADH: (1) 100; (2) 200; (3) 300; (4) 500; (5) 700 e (6) 900 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ no GCE/MWCNT/poli-XA. Velocidade de rotação, $\omega = 10,47 \text{ rad s}^{-1}$. $v = 5,0 \text{ mVs}^{-1}$.

A catálise é resultado da difusão do NADH para a superfície eletródica onde ocorre redução do mediador oxidado para formar NAD^+ e a forma reduzida do mediador.

Neste contexto, experimentos foram realizados com o objetivo de estudar o mecanismo da reação, bem como avaliar as constantes de velocidade do referido processo eletrocatalítico. A escolha do pH 7 foi também racionalizada uma vez que há uma grande quantidade de enzimas desidrogenases que dependem do processo redox de NADH e que são dependentes do pH, apresentando um ótimo de pH em 7

(BARTLETT *et al.*, 1997). Além disso, é também neste pH onde ambos NADH e NAD⁺ mostram maiores estabilidades quando dissolvidos em solução aquosa (CHENAULT e WHITESIDES, 1987) e onde a maioria dos valores prévios de κ_{cat} foram reportados na literatura para o pH 7 (GORTON e DOMÍNGUEZ, 2002).

Para muitos eletrodos quimicamente modificados usados para oxidação eletrocatalítica de NADH, têm sido postulado que um complexo de transferência de carga é formado na reação entre NADH e o mediador, por causa do valor de κ_{cat} diminuir com o aumento na concentração de NADH (SANTOS *et al.*, 2002). Além disso, acredita-se que um complexo de transferência de carga, inicialmente formado entre os reagentes, comporta-se análogo a cinética de Michaelis-Menten de reações enzimáticas (GORTON e DOMÍNGUEZ, 2002).

A Figura 32 mostra os gráficos de Levich obtidos para o ECV/MWCNT/poli-XA para cinco diferentes concentrações de NADH, 100, 200, 300, 500 e 700 $\mu\text{mol L}^{-1}$, tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹, pH 7,0). A corrente de oxidação para o NADH no eletrodo modificado pode ser limitada pelo transporte de massa do NADH para a superfície do eletrodo e/ou pela cinética da reação. A partir da Figura 32, fica evidente que há limitação cinética na reação global. Para o eletrodo de disco rotatório, a corrente limitada pelo transporte de massa ($I_{d(L)}$) depende da velocidade de rotação, ω , e da concentração de NADH no seio da solução [NADH], de acordo com a equação de Levich (BARD e FAULKNER, 2001) (Equação 6):

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

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

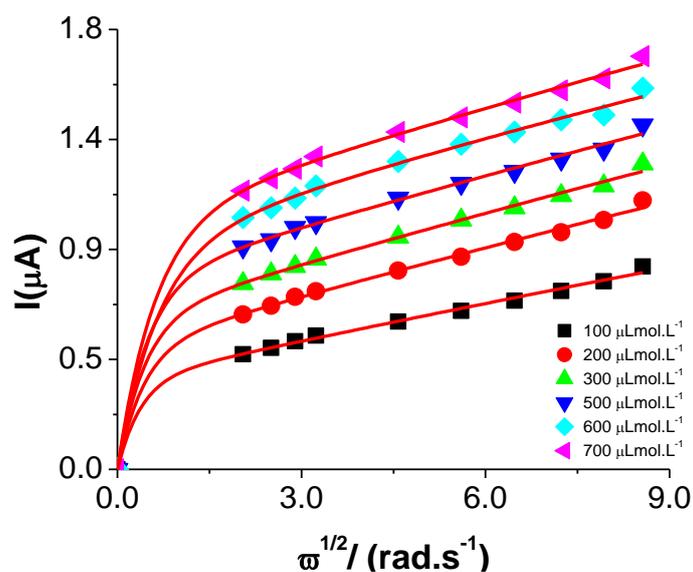


Figura 32 - Gráfico de Levich para a resposta eletrocatalítica de estado-estacionário para um EDR de ECV/MWCNT/poli-XA em diferentes [NADH]. Estudos realizados em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ em pH 7,0 e $\Gamma = 7.11 \times 10^{-11}$ mol cm⁻².

Para uma reação catalisada, a corrente limitada cineticamente (I_{kin}) é dada geralmente pela seguinte expressão (Equação 7):

$$I_{kin} = nFA\kappa_{cat} \Gamma [NADH] \quad (\text{Equação 7})$$

sendo Γ a cobertura total do poli-XA. Uma dependência linear da corrente catalítica na $\omega^{1/2}$ é esperada a partir da equação de Levich (Equação 5). O desvio observado a partir da equação de Levich pode ser o resultado da etapa limitada quimicamente. Assim, a expressão geral para a corrente global, I , é dada por (Equação 8):

$$I^{-1} = I_{d(L)}^{-1} + I_{Kin}^{-1} \quad (\text{Equação 8})$$

Fazendo a inversão das equações 5 e 6, tem-se a conhecida Equação 8 de Koutecky-Levich, muito utilizada em reações catalíticas empregando eletrodos contendo mediadores para transferência de elétrons (MURRAY, 1984, 1992). Esta equação foi empregada na obtenção da Figura 33, variando a concentração de [NADH] (Equação 9):

$$\frac{1}{I} = \frac{1}{nFA\kappa_{\text{cat}}\Gamma[\text{NADH}]} + \frac{1}{0,620nFA\nu^{-1/6}D^{2/3}[\text{NADH}]\omega^{1/2}} \quad (\text{Equação 9})$$

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

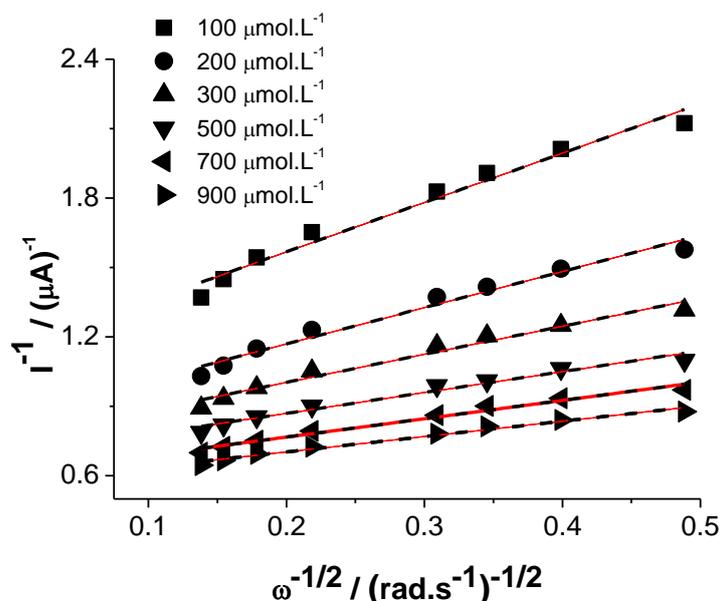


Figura 33 - Gráficos de Koutecky-Levich dos dados experimentais mostrados na Figura 32. Estudos realizados em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ em pH 7,0 e $\Gamma = 7.11 \times 10^{-11}$ mol cm⁻².

O valor da constante κ_{cat} (constante da reação catalítica) apresentou-se altamente dependente da [NADH] como observado na Figura 34(a). Este comportamento tem sido observado para outros eletrodos modificados com mediadores usados na oxidação electrocatalítica de NADH (SANTOS *et al.*, 2002; KUBOTA e GORTON, 1999), sendo esta alta dependência explicada pela formação

de um complexo de transferência de carga (CT-complexo) entre o NADH e o mediador antes da formação do produto da reação.

Este tipo de mecanismo de reação é bastante empregado para estudo de cinética de Michaelis-Menten e obtenção da constante que leva o mesmo nome (K_M), que pode ser definida conforme a Equação 10 (GORTON, 1986):

$$K_M = \frac{\kappa_{-1} + \kappa_{+2}}{\kappa_{+1}} \quad (\text{Equação 10})$$

A constante de velocidade reação catalítica, κ_{cat} , para qualquer concentração de NADH pode ser expressa como proposto abaixo (GORTON, 1986):

$$\kappa_{\text{cat}} = \frac{\kappa_{+2}}{K_M + [\text{NADH}]} \quad (\text{Equação 11})$$

Invertendo a Equação 11 obtém-se a expressão

$$\frac{1}{\kappa_{\text{cat}}} = \frac{K_M}{\kappa_{+2}} + \frac{[\text{NADH}]}{\kappa_{+2}} \quad (\text{Equação 12})$$

A construção do gráfico $1/\kappa_{\text{obs}}$ vs. $[\text{NADH}]$ como observado na Figura 34(b) fornece uma relação linear, compatível com a equação $\kappa_{\text{cat}}^{-1} = 0,068[\text{NADH}] + 1,295 \times 10^{-5}$, com coeficiente de correlação de 0,9984 para $n = 7$, sendo o κ_{cat}^{-1} em $\text{mol L}^{-1}\text{s}$ e $[\text{NADH}]$ em mmol L^{-1} sendo indicativo que um complexo de transferência de carga deve se formar entre o poli-XA e o NADH. Do coeficiente angular da curva, é possível calcular o valor de κ_{+2} e, do coeficiente linear, o valor de K_M pode ser avaliado. Como verificado na Tabela 4, o κ_{cat} , κ_{+2} e K_M foram calculados e apresentaram os valores de $7,72 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$, $14,7 \text{ s}^{-1}$ e $8,77 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente.

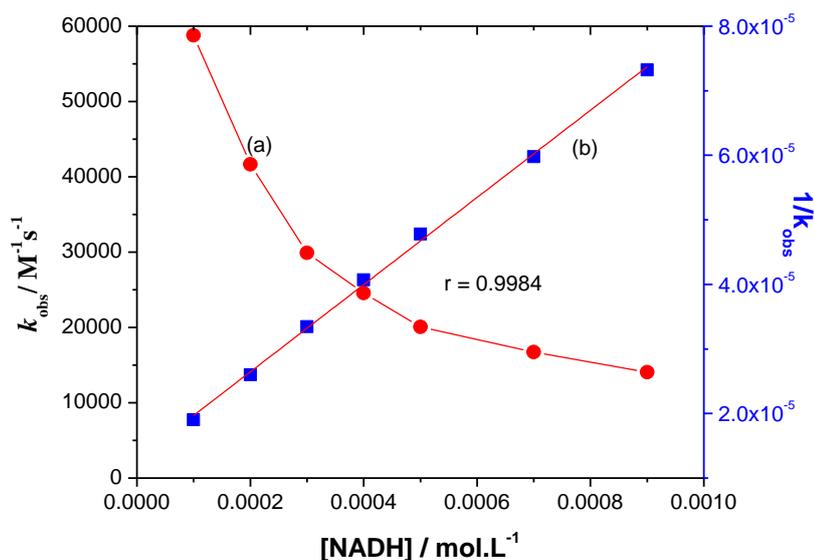


Figura 34 - (a) Variação de κ_{cat} vs. [NADH] obtidos para o ECV/MWCNT/poli-XA e (b) Variação de $1/\kappa_{cat}$ vs. [NADH]. Estudos realizados em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ em pH 7,0 e $\Gamma = 7.11 \times 10^{-11}$ mol cm⁻².

A Tabela 4 lista alguns trabalhos registrados na literatura envolvendo eletrodos modificados com vários mediadores, bem como seus respectivos parâmetros cinéticos referentes ao processo de oxidação eletrocatalítica de NADH, permitindo, portando, comparar os resultados apresentados com o presente sensor desenvolvido e discutido ao longo deste tópico.

Assim, de acordo com a Tabela 4, observa-se que o valor de κ_{cat} é maior quando comparado aos valores publicados previamente para os sistemas eletrodo-mediador, exceto para os trabalhos de NASSEF e colaboradores (2006). Por outro lado, mediadores que têm apresentado altos valores de κ_{cat} , têm também requerido altos sobrepotenciais para a oxidação eletrocatalítica de NADH como verificado no trabalho desenvolvido por NASSEF e colaboradores (2006), dificultando, assim, sua aplicação no desenvolvimento de biossensores.

Tabela 4 - Parâmetros eletroquímicos e cinéticos de alguns eletrodos modificados para eletro-oxidação de NADH.

Ref.	E^0 (mV)	pH	Γ (molcm ⁻²)	k_{cat} (mol ⁻¹ L s ⁻¹)	K_M (molL ⁻¹)
(PEREIRA <i>et al.</i> , 2003)	-140 vs. SCE	7,0	$5,7 \times 10^{-9}$	$5,5 \times 10^3$	$1,0 \times 10^{-4}$
(NASSEF <i>et al.</i> , 2006)	+200 vs. Ag/AgCl	7,0	$4,2 \times 10^{-10}$	$1,1 \times 10^5$	$2,2 \times 10^{-5}$
(SANTOS <i>et al.</i> , 2002)	-230 vs. SCE	7,0	$5,2 \times 10^{-9}$	$1,4 \times 10^3$	$2,1 \times 10^{-4}$
(KUBOTA e GORTON, 1999)	-220 vs. SCE	7,0	$6,8 \times 10^{-10}$	$8,2 \times 10^2$	$1,8 \times 10^{-3}$
(SANTOS <i>et al.</i> , 2002)	-60 vs. SCE	7,0	$4,4 \times 10^{-9}$	$1,8 \times 10^3$	$2,7 \times 10^{-4}$
(MUNTEANU <i>et al.</i> , 2003)	+156 vs. Ag/AgCl	6,0	$2,7 \times 10^{-10}$	$3,0 \times 10^3$	$3,1 \times 10^{-4}$
(ANTIOCHIA <i>et al.</i> , 2005)	—	7,0	$9,7 \times 10^{-11}$	$2,0 \times 10^3$	—
(VASANTHA e CHEN, 2006)	+200 vs. Ag/AgCl	7,0	$2,6 \times 10^{-10}$	$9,8 \times 10^3$	—
(LIMA <i>et al.</i> , 2009)	+100 vs. Ag/AgCl	7,0	$6,5 \times 10^{-10}$	$1,0 \times 10^4$	$2,7 \times 10^{-5}$
Este Trabalho	+100 vs. Ag/AgCl	7,0	$7,11 \times 10^{-11}$	$7,72 \times 10^4$	$8,87 \times 10^{-7}$

1.8- - DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA DE NADH

Para obter uma curva analítica para o sensor desenvolvido, amperogramas para a oxidação de NADH foram realizados em diferentes concentrações em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 7,0$) e potencial aplicado de $+100 \text{ mV vs. Ag/AgCl}$ (Figura 35).

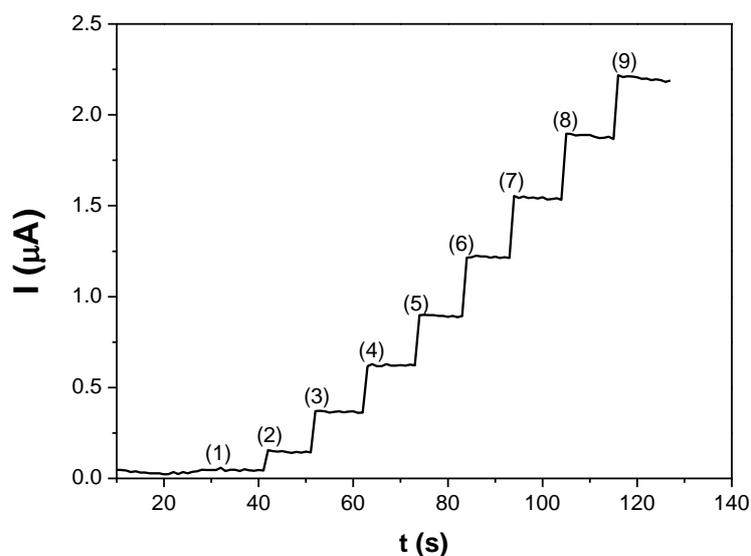


Figura 35 - Medidas amperométricas para a eletrooxidação de NADH no ECV/MWCNT/poli-XA obtidas em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em $\text{pH} 7,0$ e $[\text{NADH}]$: (1) $0,8$ - (9) $17,0 \text{ mmol L}^{-1}$,

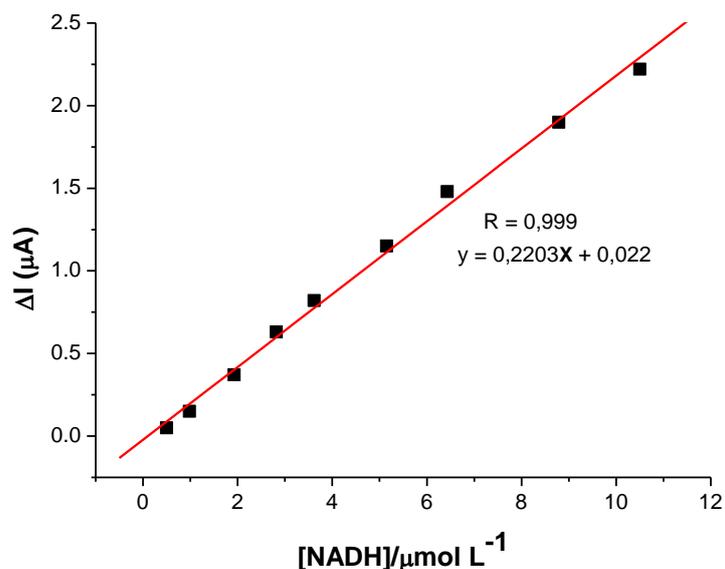


Figura 36 - Curva analítica para a eletrooxidação de NADH no ECV/MWCNT/poli-XA em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,0 $E_{ap} = 100 \text{ mV vs. Ag/AgCl}$.

O sensor proposto mostrou uma faixa linear de resposta de $0,5$ a $8,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 36), que pode ser expressa de acordo com equação seguinte: $\Delta I / (\mu\text{A}) = 0,022 + 0,22 [\text{NADH}] / (\mu\text{mol L}^{-1})$ com um coeficiente de correlação de 0,999 para $n = 9$.

Um limite de detecção de $0,01 \mu\text{mol L}^{-1}$ foi determinado usando uma razão $3\sigma/b$ e limite de quantificação de $0,04 \mu\text{mol L}^{-1}$ usando $10\sigma/b$, sendo σ o desvio padrão do valor médio para dez amperogramas do branco e b o coeficiente angular da curva analítica, determinado de acordo com as recomendações da IUPAC (Analytical Methods Committee, 1987).

1.9- ESTUDO DE INTERFERENTES

O estudo de interferentes foi realizado com as duas principais biomoléculas interferentes na eletroanálise de NADH: ácido ascórbico e ácido úrico. Para o ácido úrico não foi observada nenhuma interferência, pois o mesmo possui potencial de oxidação igual a 0,32 V vs. Ag/AgCl (FIGURA 37A). Já o ácido ascórbico mostrou-se passível de sofrer eletro-oxidação no mesmo potencial da NADH no sensor desenvolvido (FIGURA 37B), sendo assim, um interferente na eletroanálise de NADH, mas este interferente pode ser facilmente eliminado da amostra com a enzima que oxida o ácido ascórbico (ascorbato oxidase).

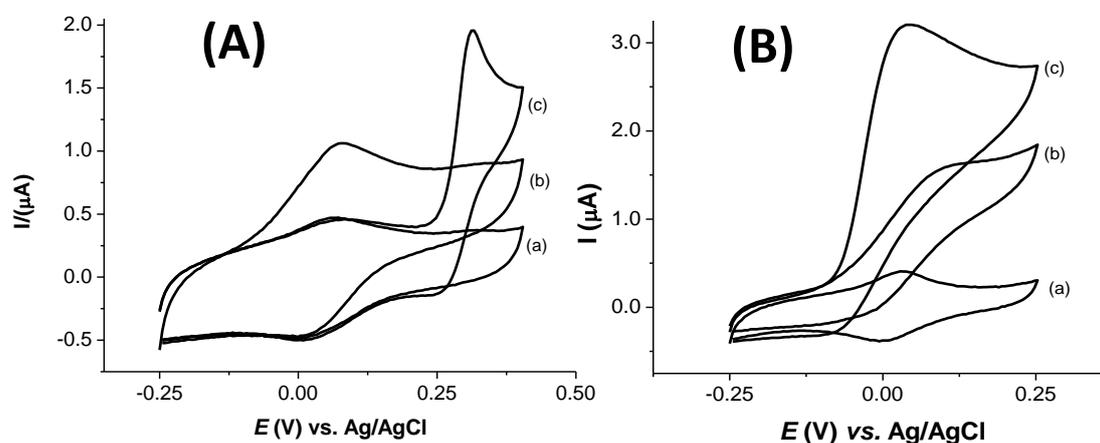
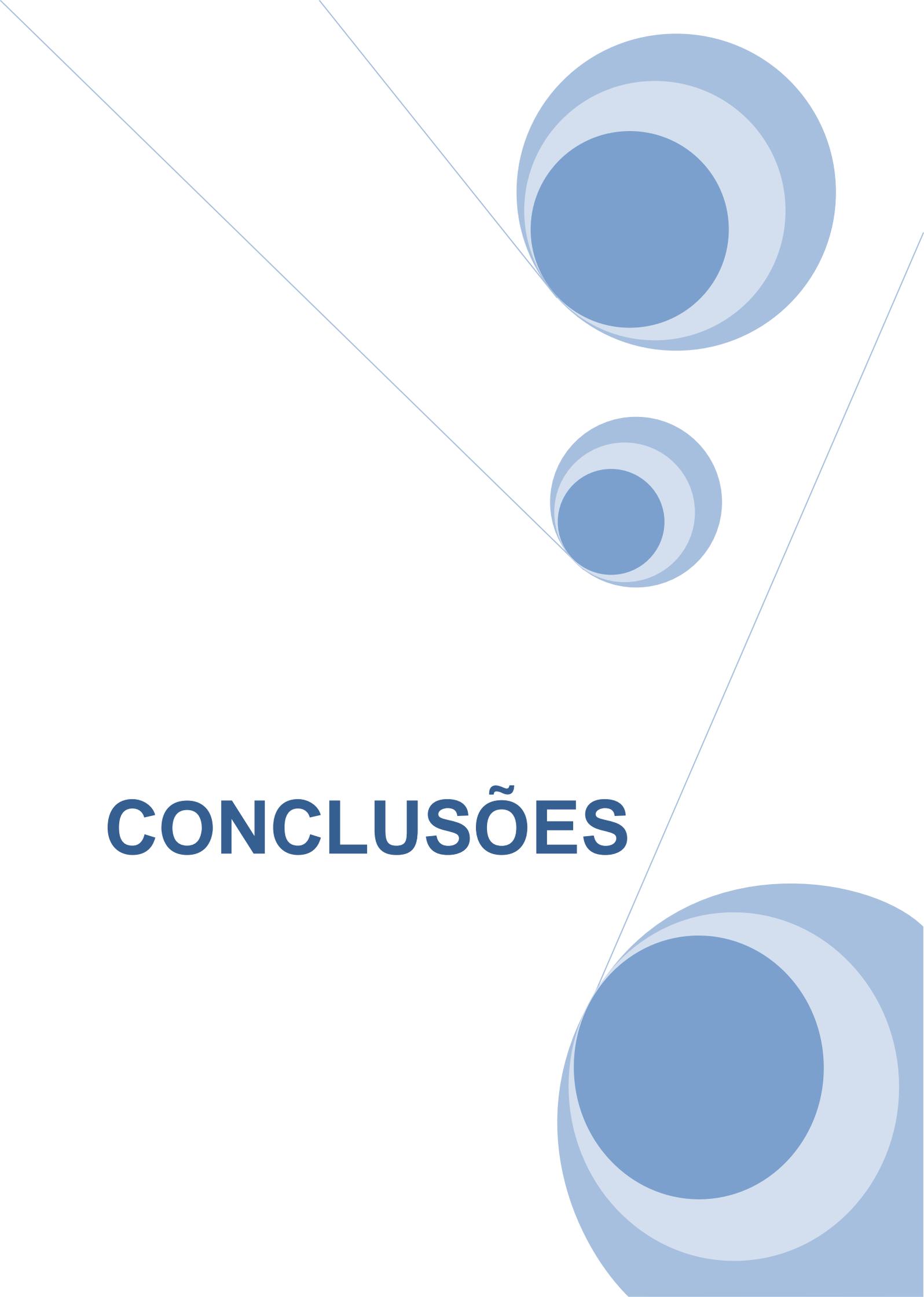


FIGURA 37 – (A) Voltamogramas cíclicos para o GCE/MECNT/XA, na ausência (a) na presença de NADH $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ (b) e na presença de ácido úrico $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ (c); **(B)** Voltamogramas cíclicos para o GCE/MECNT/XA, na ausência (a) na presença de NADH $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ (b) e na presença de ácido ascórbico $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ (c) Velocidade de varredura (v): $5,0 \text{ mV s}^{-1}$. Estudos realizados em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,0.

The page features a decorative graphic consisting of three blue circles of varying sizes, each with a gradient from dark blue to light blue. These circles are arranged along a diagonal line that runs from the top-left towards the bottom-right. The circles are positioned in the upper right, middle, and lower right areas of the page. The word "CONCLUSÕES" is centered on the page in a bold, dark blue font.

CONCLUSÕES

1. CONCLUSÕES

Este trabalho relata a construção de forma simples e a aplicação do eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono e ácido xanturênico, que submetido a um processo de ativação *in situ* (eletropolimerização), promove a formação do par redox na superfície do eletrodo, sendo uma alternativa viável para a determinação eletroanalítica de NADH.

Os estudos eletrocatalíticos e cinéticos do NADH empregando o eletrodo modificado comprovaram a grande eficiência do mediador, o ácido xanturênico ativado, em mediar a transferência de elétrons envolvendo a molécula de NADH. Além disso, os nanotubos de carbono constituem um excelente ambiente para a adsorção do mediador, capazes de promover a detecção de NADH, com ótima sensibilidade e estabilidade, mesmo quando empregados sistemas mais "agressivos" (dinâmicos) como o eletrodo de disco rotatório, usado nos estudos cinéticos.

A partir do eletrodo modificado desenvolvido, foi possível operar a célula eletroquímica durante a eletrooxidação do NADH, aplicando potencial de 0,1 V vs. Ag/AgCl, o que amplia bastante a possibilidade de uso destes eletrodos em amostras complexas: pois, neste potencial, o sensor torna-se mais seletivo e muito menos sensível a possíveis interferentes.

Além disso, o eletrodo modificado desenvolvido apresenta-se como uma alternativa para o desenvolvimento de biossensores enzimáticos NADH dependentes.

The image features a minimalist design with three blue circles of varying sizes, each composed of concentric layers of different shades of blue. These circles are arranged in a vertical line, with the largest at the top and bottom, and a smaller one in the middle. Two thin, light blue lines intersect at the top left, forming a triangular shape that frames the circles. The word "PERSPECTIVAS" is written in a bold, dark blue, sans-serif font, positioned horizontally across the middle of the page, overlapping the lower part of the circles.

PERSPECTIVAS

1. PERSPECTIVAS

Caracterização espectroscópica e morfológica do ECV/MWCNT/poli-XA, utilizando infravermelho *in situ*, microscopia eletrônica de transmissão e varredura e microscopia de força atômica.

Pretende-se dar continuidade aos estudos ora reportados e com novos compostos similares ao ácido xanturênico e assim, verificar a atividade eletrocatalítica frente a outros analitos de interesse biológico, ambiental e outros, mostrando-se desta forma a potencialidade do sensor modificado.

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

Desenvolver sensores enzimáticos, utilizando desidrogenases, a partir dos EQM eletrocatalíticos frente a NADH.

The page features a decorative graphic consisting of three blue circles of varying sizes, each with a lighter blue ring around its center. These circles are arranged in a vertical line, with the largest at the top and bottom, and a smaller one in the middle. Two thin blue lines intersect at the top left, forming a large 'V' shape that frames the circles. The word 'REFERÊNCIAS' is centered in a bold, dark blue font.

REFERÊNCIAS

5. REFERÊNCIAS

- ADAMS, P. W.; VYNN, V.; FOLKARD, J.; SEED, M. *Lancet*, 10 (1976), 759.
- BARD, A.J.; FAULKNER, L.; *Electrochemical Methods-Fundamental and Applications*, 2nd ed. Wiley, New York, 2001.
- BLAEDEL, W. J.; JENKINS, R. A.; *Analytical Chemistry*, 47 (1975), 1337.
- BRETT, A. M. O., BRETT, C. M. A., *Electroquímica – Princípios, Métodos, e Aplicações*, Almeida, Coimbra, 1996
- DRUST, R.A.; BAUMNER, A.J.; MURRAY, R.W.; BUCK, R.P.; ANDRIEUX; C.P. *Pure & Applied Chemistry*, 68 (1997), 1317.
- FUJIHIRA, M.; RUBINSTEIN, I.; RUSLING, J.F. *Encyclopedia of electrochemistry – Modified electrodes*. V. 10, ed. Viley-VCH, Weinheim, p. 208-209, 2007.
- GATTRELL, M; KIRK, DW, A fourier-transform infrared-spectroscopy study of the passive film produced during aqueous acidic phenol electrooxidation, ***Journal of the Electrochemical Society*, 139 (1992), 2736.**
- GATTRELL, M; KIRK, DW, A study of electrode passivation during aqueous phenol electrolysis, ***Journal of the Electrochemical Society*, 140 (1993), 903.**
- GORTON, L.; DOMÍNGUEZ, E. *Reviews in Molecular Biotechnology*, 82 (2002), 371.
- GUILBAULT, G. G.; *Handbook of enzymatic methods of analysis*, Marcel Dekker, New York, (1976).
- HAN, Q.; BEERNTSEN, B. T.; LI, *Journal of Insect Physiology*, 53 (2007), 254.

- HE, J. B.; JIN, G. P.; CHEN, Q. Z.; WANG, Y. A quercetin-modified biosensor for amperometric determination of uric acid in the presence of ascorbic acid. *Analytica Chimica Acta*, 585 (2007), 337.
- JAEGFELDT, H.; *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 110 (1980), 295.
- JAEGFELDT, H.; TORSTENSSON, A.; JOHANSSON, G.; *Analytica Chimica Acta*, 97 (1978), 221.
- KUBOTA, L.T.; GORTON, L.; *Electroanalysis*, 11 (1999), 719.
- KUBOTA, L.T.; GORTON, L.; RODDICK-LANZILOTTA, A.; MCQUILLAN, A.J.; *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 47 (1998), 39.
- KUMAR, S.A.; CHEN, S.M. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 278 (2007), 244.
- KUMAR, S.A.; CHEN, S.M. *Sensors*, 8 (2008), 739.
- LANGE, U., MIRSKY, V. M., ROZNYATOVSKAYa, N. V., *Conducting polymers in chemical sensors and arrays*, 1, *Analytica Chimica Acta*, 614 (2008), 1.
- LAPUENTE, R., CASES, F., GARCES, P., ET AL., A voltammetric and FTIR-ATR study of the electropolymerization of phenol on platinum electrodes in carbonate medium - Influence of sulfide ***Journal of the Electrochemical Society*, 451 (1998), 163.**
- Lima, P.R.; Santos, W.J.R.; Oliveira, A.B.; Goulart, M.O.F.; Kubota, L.T.; *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 479 (2008), 758.
- LIMA, P.R.; SANTOS, W.J.R.; OLIVEIRA, A.B.; GOULART, M.O.F.; KUBOTA, L.T.; *Biosensors and Bioelectronics*, 24 (2008), 448.
- LIMA, P.R.; SANTOS, W.J.R.; LUZ, R. de C.S.; DAMOS, F.S.; OLIVEIRA, A.B.; GOULART, M.O.F.; KUBOTA, L.T.; *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 612 (2008), 87.
- LIU, J.Y.; TIAN, S.J.; KNOLL, W.; *Langmuir*, 21(2005), 5596.

- LOBO, M.J.; MIRANDA, A.J; TUNON, P.; *Electroanalysis*, 8 (1996), 591.
- MALINA, H. Z.. *Biochem. Biophys. Res. Communication*, 265 (1999), 600.
- MATSUE, T.; SUDA, M.; UCHIDA, I.; KATO, T.; OSA, T.; *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 234(1987), 163.
- MOIROUX, J.; ELVING, P.; *Journal Analytical Chemistry*, 51 (1979), 346
- MURAKAMI, K.; HANEDA, M.; YOSHINO, M. *BioMetas*, 19 (2006), 429.
- NASSEF, H. M.; RADI, A.E.; O'SULLIVAN, C. K.; *Electrochemistry Communications*, 8 (2006), 1719.
- NELSON, D. L.; COX, M. M., *Lehninger Principles of Biochemistry*, ed. W. H. Freeman, 4.ed., 2004.
- PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. S.; KUBOTA, L. T. *Química Nova*, 25 (2002), 1012.
- PEREIRA, A.U.; SANTOS, A.D.; KUBOTA, L.T.; *Electrochimica Acta*, 48 (2003), 3541.
- PERSSON, B.; *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 287 (1990), 61.
- RAITMAN, O. A., KATZ, A. F., CKMANN, B., WILLNER, I., *Journal American Chemical Society*, 124 (2002), 6487.
- RAMÍREZ-MOLINA, C.; BOUJTITA, M.; MURR, N. E.; *Electroanalysis*, 15 (2003), 1095.
- RAVICHANDRAM, K.; BALDWIN, R.P.; *Analytical Chemistry*, 55 (1983),1586.
- RIVERA, N.; COLON, Y.; GUADALUPE, A.R.; *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 34 (1994), 169.
- ROGERS, K. S.; MOHAN, *Biochem. Med. Met. Bio.*, 52 (1994), 10.
- SANTOS, A.D., GORTON, L., KUBOTA, L.T., *Electrochim. Acta*, 47 (2002), 3351.

- SISWANA, M. P., OZOEMENA, K. I., NYOKONG, T., *Electrochimica Acta*, 52 (2006), 114.
- SOPER, S. A.; BROWN, K.; ELLINGTON, A.; FRAZIER, B.; GARCIA-MANERO G.; GAU, V.; GUTMAN, S. I.; HAYES, D. F.; KORTE, B.; LANDERS, J. L.; LARSON, D.; LIGLER, F.; MAJUMDAR, A.; MASCINI, M; NOLTE D.; ROSENZWEIG, Z.; WANG, J.; WILSON, D. Point-of-care biosensor systems for cancer diagnostics/prognostics. *Biosensors and Bioelectronics*, 10 (2006), 1932.
- TSE, D.C.-S.; KUWANA, T.; *Analytical Chemistry*, 50 (1978), 1315.
- VASANTHA, V.S.; CHEN, S. M.; *Electrochimica Acta*, 52 (2006), 665.
- WANG, J. Carbon-Nanotube Based Electrochemical Biosensors: A Review. *Electroanalysis*, 17, 2005.
- WU, Z., W. JING, WANG E., *Electrochemistry Communications*, 1 (1999), 545.
- YAMASHITA, M.; PESSOA, C.A.; KUBOTA, L.T.; *Journal of Colloid and Interface Science*, 263 (2003), 99.
- ZAITSEVA, G.; GUSHIKEM, Y.; RIBEIRO, S.; ROSATTO, S.S.; *Electrochimica Acta*, 47 (2002), 1469.
- ZAYATS, M., KATZ, E., WILLNER, I., *Journal American Chemical Society*, 124 (2002), 14724.
- ZHU, X.; YURI, I.; GAN, X.; SUZUKI, I.; LI, G. **Electrochemical study of the effect of nano-zinc oxide on microperoxidase and its application to more sensitive hydrogen peroxide biosensor preparation**, *Biosensors and Bioelectronics*, 22 (2007), 1600.