



UFAL

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

**SENSOR AMPEROMÉTRICO A BASE DE NANOTUBOS DE
CARBONO E ÁCIDO VANÍLICO PARA DETERMINAÇÃO
SIMULTÂNEA DE ÁCIDO ASCÓRBICO, DOPAMINA E ÁCIDO
ÚRICO.**

LEONARDO VIEIRA DA SILVA

Universidade Federal de Alagoas

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

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

LEONARDO VIEIRA DA SILVA

**SENSOR AMPEROMÉTRICO A BASE DE NANOTUBOS DE CARBONO E
ÁCIDO VANÍLICO PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE ÁCIDO
ASCÓRBICO, DOPAMINA E ÁCIDO ÚRICO.**

Maceió – AL

2013

LEONARDO VIEIRA DA SILVA

**SENSOR AMPEROMÉTRICO A BASE DE NANOTUBOS DE CARBONO E
ÁCIDO VANÍLICO PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE ÁCIDO
ASCÓRBICO, DOPAMINA E ÁCIDO ÚRICO.**

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

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

**Maceió – AL
2013**

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Fabiana Camargo dos Santos

S586s Silva, Leonardo Vieira da.
Sensor amperométrico a base de nanotubos de carbono e ácido vanílico para determinação simultânea de ácido ascórbico, dopamina e ácido úrico / Leonardo Vieira da Silva. – 2013.
105 f. : il.

Orientadora: Marília Oliveira Fonseca Goulart.
Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2013.

Bibliografia: f. 92-105.

1. Ácido vanílico – Sensor químico. 2. Eletroanalítica. 3. Ácido ascórbico. 4. Dopamina. 5. Ácido úrico. 6. Eletrodos quimicamente modificados. I. Título.

CDU: 543.55:543.61



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



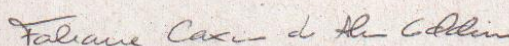
BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone/Fax: (82) 3214-1384
email: ppgqb.ufal@gmail.com

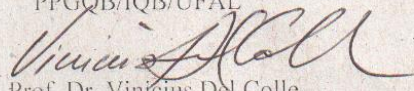
FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de Leonardo Vieira da Silva, intitulada: "Sensor Amperométrico a Base de Nanotubos de Carbono e Ácido Vanílico para Determinação Simultânea de Ácido Ascórbico, Dopamina e Ácido Úrico", apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 21 de fevereiro de 2013, às 09h30min, na Sala de Multi-Meios do Bloco 13 - UFAL.

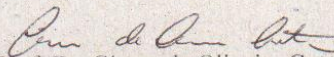
COMISSÃO JULGADORA


Prof.^a Dr.^a Marília O. F. Goulart
Orientadora (PPGQB/IQB/UFAL)


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


Prof. Dr. Vinícius Del Colle
PPGQB/IQB/UFAL


Prof. Dr. José Alberto Fracassi da Silva
UNICAMP


Prof. Dr. Cicero de Oliveira Costa
IFAL

Dedico esta dissertação à minha família e a todos aqueles que sempre acreditaram em mim.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por ter me permitido conhecer pessoas que tanto contribuem para minha formação como profissional e como homem.

Agradecimento especial à minha família, aos meus pais **Iracema** e **Manoel** por terem me ensinado o imenso valor que é ser uma pessoa digna e honesta e pela paciência, aos meus irmãos **Luiz Eduardo**, **Luiz Gustavo** e **Larisse** pela imensa amizade e carinho que temos um pelo outro.

À minha namorada **Rita de Cássia** pelo amor, carinho, paciência e apoio nesse período de finalização do mestrado e por sempre estar me contagiando com sua alegria.

À minha orientadora, **Prof^a. Dra. Marília O. F. Goulart** por acreditar em meu potencial e estar sempre disposta a ajudar, sempre levarei como exemplo a dedicação, responsabilidade e amor à pesquisa.

Aos meus amigos do laboratório, **Waldomiro**, **Adilson**, **Juliana**, **Orlando**, **Andréa**, **Erivaldo**, **Jadriane**, **Estanislam**, **Fred**, **Fabília**, **Francisco**, **Mônika**, **Anny**, **Camila** e **Cleylton** por estarem sempre animando o ambiente de trabalho e por me ensinarem bastante desde a minha chegada no laboratório de eletroquímica.

Meus sinceros agradecimentos a **Aída** pela imensa contribuição nos trabalhos com o spartan e por seu companheirismo quando necessitei de sua ajuda.

Aos meus amigos **André**, **Márcio** e **Luiz Henrique** que sempre torcem pelo meu sucesso e por estarem sempre presentes desde a época da graduação.

Aos **professores do Instituto de Química e Biotecnologia**, em especial à **Prof^a Tania Piatti** e ao **Prof^o Reinaldo Rodrigues**, aos quais sou muito grato por terem me dado oportunidade de iniciar a minha caminhada científica e que além de mestres, são grandes amigos que levarei para o resto da vida.

Aos **professores do Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia**, em especial à **Prof^a Fabiane Caxico** e **Prof^o Phabyanno Lima** que sempre alegam e entusiasma a todos, e como sempre falo para Fabi: “essa professora é uma resenha”, além da enorme contribuição no desenvolvimento profissional, as discussões com **Phabyanno** e alguns trabalhos realizados com este me proporcionaram ter uma maior clareza a cerca do trabalho experimental realizado, só tenho a agradecer.

Ao Prof. **Dr. Lauro Tatsuo Kubota**, pela recepção, orientação e ensinamentos oferecidos em seu laboratório na UNICAMP/SP, que foi uma experiência única.

Ao CNPq, FAPESP e CAPES, pelo apoio financeiro.

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

Valeu galera!!!!

“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar.
É melhor tentar, ainda que em vão que sentar-se, fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias frios em casa me esconder.
Prefiro ser feliz embora louco, que em conformidade viver”.

(Martin Luther King)

RESUMO

Neste trabalho é descrito o desenvolvimento de uma plataforma nanoestruturada simples e eficiente à base de nanotubos de carbono de paredes múltiplas (do inglês Multi-walled carbon nanotubes, MWCNT) funcionalizados com polímero de ácido vanílico (AV), gerado *in situ*, no intuito de desenvolver um sensor analítico para determinar simultaneamente ácido ascórbico (AA), dopamina (DA) e ácido úrico (AU). O poli-AV sobre o MWCNT depositado em carbono vítreo, gera três pares redox baseados no sistema quinona/hidroquinona. As técnicas empregadas para a realização deste trabalho foram voltametria cíclica e cronoamperometria, as quais foram utilizadas para estudar o comportamento eletroquímico dos eletrodos modificados, obtenção dos parâmetros cinéticos e caracterização analítica da plataforma. Os estudos cronoamperométricos foram também realizados com o objetivo de obter maiores informações acerca dos processos redox entre AA e a plataforma funcionalizada, uma vez que este demonstrou ser um processo catalítico. Assim, por meio de gráficos e equações de Cottrell, foi possível obter os valores aparentes para o coeficiente de difusão (D_{AA}) e a constante catalítica (k_{cat}) da reação para AA. Os valores de D_{AA} e k_{cat} , determinados para AA foram de $4 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ e $3,75 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectivamente. O aumento na velocidade de reação entre a plataforma e AA foi atribuído à eficiente transferência de elétrons com o mediador eletrogerado *in situ* por possuir pares redox quinona/hidroquinona. O sensor amperométrico apresentou como figuras de mérito relativas à determinação simultânea de AA, DA e AU, os seguintes valores: em relação ao AA apresentou faixa linear de 150-600 μM e limite de detecção 3,5 μM ; para DA, faixa linear de 150-600 μM e limite de detecção de 4,5 μM e em relação a AU, faixa linear de 50-450 μM e limite de detecção de 1,5 μM . A partir do desempenho obtido, a plataforma nanoestruturada fundamentada em MWCNT e poli-AV justifica a utilização deste como sensor principalmente para a determinação simultânea de AA, DA e AU.

Palavras – chave: Ácido vanílico. Eletroanalítica. Ácido ascórbico. Dopamina. Ácido úrico. Eletrodos quimicamente modificados. Sensor químico.

ABSTRACT

This paper describes the development of a simple and efficient nanostructured platform based on multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) functionalized with an *in situ* generated vanillic acid (VA) polymer in order to develop an analytical sensor for the simultaneous determination of ascorbic acid (AA), dopamine (DA) and uric acid (UA). The poly-AV incorporated on the MWCNT deposited on glassy carbon, produces three redox coupled systems based on quinone / hydroquinone. The techniques used in this work were cyclic voltammetry and chronoamperometry, used to study the electrochemical behavior of the modified electrodes, obtaining the kinetic parameters and the analytical characterization of the platform. The chronoamperometric studies were also performed in order to obtain more information about the redox processes between AA and the functionalized platform, since this proved to be a catalytic process. Thus, by means of graphs and Cottrell equations, it was possible to obtain values for the apparent diffusion coefficient (D_{AA}) and catalytic constant (k_{cat}) in response to AA. The values of k_{cat} and D_{AA} determined for AA were $4 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ and $3.75 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ respectively. The increase in the reaction rate between the platform and AA was attributed to the efficient electron transfer with the *in situ* electrogenerated mediator because the redox couples possess the quinone / hydroquinone system. The amperometric sensor has as figures of merit for the simultaneous determination of AA, DA and UA, the following values: for AA, linear range of 150-600 μM and detection limit of 3.5 μM ; for DA, linear range of 150-600 μM and a detection limit of 4.5 μM and for AU, linear range of 50-450 μM and a detection limit of 1.5 μM . From the obtained performance, the platform based on MWCNT and poly-AV justifies the use of the sensor mainly for the simultaneous determination of AA, DA and UA.

Keywords: Vanillic acid. Electroanalysis. Ascorbic acid. Dopamine, Uric acid. Chemically modified electrodes. Chemical sensor.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 1 | Geração e Reações que envolvem ERO e ERN | 23 |
| Figura 2 | Macromoléculas que são alvos de ataque de Radicais Livres | 24 |
| Figura 3 | Antioxidantes naturais separados em classe (em verde: antioxidantes exógenos, em amarelo: antioxidantes exógenos). | 26 |
| Figura 4 | Estruturas químicas dos principais Ácidos Benzóicos | 28 |
| Figura 5 | Estruturas químicas dos principais Ácidos Cinâmicos | 29 |
| Figura 6 | Estrutura química do Ácido Vanílico (A) e foto da planta <i>Angelica sinensis</i> (B) | 30 |
| Figura 7 | Estrutura Química do L- Ácido Ascórbico | 31 |
| Figura 8 | Ação do L- Ácido Ascórbico como pró-oxidante em fluidos biológicos | 32 |
| Figura 9 | Estrutura Química do Ácido Úrico | 33 |
| Figura 10 | Estrutura Química da Dopamina | 33 |
| Figura 11 | Mecanismos de oxidação da Dopamina | 34 |
| Figura 12 | Representação esquemática: (A) MWCNT e (B) SWCNT | 37 |
| Figura 13 | Rotas para polimerização de fenóis | 39 |

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 14 | Voltamogramas Cíclicos na faixa de -0,5 a 1,0 V vs. Ag/AgCl para a ativação do MWCNT/ECV com ácido vanílico a 0,8 mM, em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 5,5 e $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$ | 48 |
| Figura 15 | Voltamogramas Cíclicos na faixa de -0,5 a 1,0 V vs. Ag/AgCl para a ativação do ECV com ácido vanílico a 0,8 mM, em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 5,5 e $v = 0,05 \text{ V s}^{-1}$ | 49 |
| Figura 16 | Voltamogramas Cíclicos na faixa de 0,17 a 1,0 V vs. Ag/AgCl para a ativação do MWCNT/ECV com ácido vanílico a 0,8 mM, em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 5,5 e $v = 0,05 \text{ V.s}^{-1}$ | 50 |
| Figura 17 | Voltamogramas Cíclicos na faixa de 0,05 a 1,0 V vs. Ag/AgCl para a ativação do MWCNT/ECV com ácido vanílico a 0,8 mM, em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 5,5 e $v = 0,050 \text{ Vs}^{-1}$ | 52 |
| Figura 18 | Estrutura do Ácido Ferúlico | 53 |
| Figura 19 | Provável mecanismo para a formação dos produtos gerados através da oxidação de AV em pH 1,0 | 54 |
| Figura 20 | Ácido Vanílico em diferentes valores de pH (MOURTZINOS et al., 2009) | 55 |
| Figura 21 | Voltamogramas Cíclicos para a ativação do MWCNT/ECV com ácido vanílico a 0,8 mM, em solução tampão fosfato 0,1 M, $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$ em pH (A) 1,0; (B) 7,0; (C) 12,0. | 57 |
| Figura 22 | Voltamogramas Cíclicos de (A) poli-AV/MWCNT/ECV, (B) MWCNT/ECV, (C) ECV e (D) poli-AV/ECV, em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, $v = 0,005 \text{ V s}^{-1}$, na presença de AA, DA e AU. | 60 |
| Figura 23 | Voltamogramas Cíclicos em poli-AV/MWCNT/ECV em solução de tampão fosfato 0,1M, pH 7,0 em diferentes velocidades de varredura ($0,010 - 0,090 \text{ V s}^{-1}$), $E_{\text{inicial}} = -0,25 \text{ V}$ e $E_{\lambda} = 0,5 \text{ V}$, varredura no sentido anódico. | 61 |

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 24 | Dependência da corrente de pico anódico (I_{pa}) e catódico (I_{pc}), em função da velocidade de varredura em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0. | 62 |
| Figura 25 | Voltamogramas Cíclicos de poli-AV/MWCNT/ECV em várias velocidades de varredura em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0 na presença de 0,4 mM AA. | 63 |
| Figura 26 | Varição da corrente de pico anódica I_{pa} vs. $v^{1/2}$ no poli-AV/MWCNT/ECV, em solução de 0,4 mM de AA. Medidas realizadas em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0 e v : 0,003-0,023 $V s^{-1}$. | 64 |
| Figura 27 | Varição da corrente de pico anódica normalizada $I_{pa}/v^{1/2}$ vs. v no poli-AV/MWCNT/ECV em solução de 0,4 mM de AA. Medidas realizadas em solução tampão fosfato 0,1M, pH 7,0 e v : 0,003-0,023 $V s^{-1}$. | 65 |
| Figura 28 | Modelo simplificado do mecanismo proposto para o processo de eletrocatalise do AA sobre a plataforma poli-AV/MWCNT/ECV | 66 |
| Figura 29 | Cronoamperogramas obtidos para o poli-AV/MWCNT/ECV em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, na ausência e presença de AA, $E_{inicial} = +0,050 V$ e $E_{final} = -0,100 V$ vs. Ag/AgCl, respectivamente. | 68 |
| Figura 30 | Integração dos cronoamperogramas obtidos no poli-AV/MWCNT/ECV, em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7, $E_{inicial} = +0,050 V$ e $E_{final} = -0,100 V$ vs. Ag/AgCl, respectivamente. | 69 |
| Figura 31 | Gráfico de I vs. $t^{-1/2}$ obtidos a partir dos cronoamperogramas da Figura 26 em poli-AV/MWCNT/ECV, em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, na ausência e presença de AA, $E_{inicial} = +0,050 V$ e $E_{final} = -0,100 V$ vs. Ag/AgCl, respectivamente. | 70 |
| Figura 32 | Gráfico de inclinação ($I/t^{-1/2}$) vs a concentração de AA obtido a partir da Figura 28 do poli-AV/MWCNT/ECV, em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, na ausência e presença de AA, $E_{inicial} = +0,050 V$ e $E_{final} = -0,100 V$ vs. Ag/AgCl, respectivamente. | 71 |
| Figura 33 | Dependência de I_{cat}/I_{lim} vs. $t^{1/2}$ derivado dos cronoamperogramas da Figura 26 em poli-AV/MWCNT/ECV, em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, na ausência e presença de AA, $E_{inicial} = +0,050 V$ e $E_{final} = -0,100 V$ vs. Ag/AgCl, respectivamente. | 72 |

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 34 | Gráfico da inclinação de I_{cat}/I_{Lim} vs. concentração de AA em poli-AV/MWCNT/ECV, em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0 na ausência e presença de AA, $E_{inicial} = +0,050$ V e $E_{final} = -0,100$ V vs. Ag/AgCl, respectivamente. | 73 |
| Figura 35 | Voltamogramas Cíclicos disco rotatório para oxidação de AA em várias concentrações em poli-AV/MWCNT/ECV em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, $v = 0,005$ V.s ⁻¹ e $\omega = 10,47$ rad s ⁻¹ . | 74 |
| Figura 36 | Gráfico de Levich para a resposta eletrocatalítica de estado-estacionário para um EDR de poli-AV/MWCNT/ECV, em diferentes [AA]. Estudos realizados em tampão fosfato 0,1 M em pH 7,0 e $\Gamma = 4.37 \times 10^{-9}$ mol cm ⁻² . | 75 |
| Figura 37 | Gráficos de Koutecky-Levich dos dados experimentais mostrados na Figura 32. Estudos realizados em tampão fosfato 0,1 M em pH 7,0 e $\Gamma = 4.37 \times 10^{-9}$ mol cm ⁻² . | 78 |
| Figura 38 | Corrente em função do potencial aplicado para o poli-AV/MWCNT/ECV em presença de 700 μ M de AA. Condições utilizadas, tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0. | 80 |
| Figura 39 | Corrente em função do potencial aplicado para o poli-AV/MWCNT/ECV em presença de 700 μ M de AU. Condições utilizadas, tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0. | 81 |
| Figura 40 | Corrente em função do potencial aplicado para o poli-AV/MWCNT/ECV em presença de 700 μ M de DA. Condições utilizadas, tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0. | 82 |
| Figura 41 | Medidas cronoamperométricas para a eletrooxidação de AA, DA e AU no poli-AV/MWCNT/ECV obtidas em tampão fosfato 0,1 M em pH 7,0 | 83 |
| Figura 42 | Curva analítica para a eletrooxidação de AA no poli-AV/MWCNT/ECV, em tampão fosfato 0,1 M em pH 7,0 $E_{aplicado} = +0,100$ V vs. Ag/AgCl. | 84 |
| Figura 43 | Curva analítica para a eletrooxidação de AA no poli-AV/MWCNT/ECV, em tampão fosfato 0,1 M em pH 7,0 $E_{aplicado} = +0,225$ V vs. Ag/AgCl. | 85 |
| Figura 44 | Curva analítica para a eletrooxidação de AU no poli-AV/MWCNT/ECV, em tampão fosfato 0,1 M em pH 7,0 $E_{aplicado} = +0,325$ V vs. Ag/AgCl. | 86 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|----------|---|----|
| Tabela 1 | Espécies Reativas de oxigênio e de nitrogênio radicalares e não-radicalares. | 22 |
| Tabela 2 | Potenciais referentes à oxidação de AA, DA e AU em diferentes plataformas obtidos por voltametria cíclica. | 58 |
| Tabela 3 | Comparação dos valores de κ_{cat} entre eletrodos modificados | 77 |
| Tabela 4 | Parâmetros eletroquímicos e analíticos de eletrodos modificados para a determinação simultânea de AA, DA e AU | 88 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

DPR- Desvio Padrão relativo

ECV- Eletrodo de Carbono Vítreo

EDR- Eletrodo de Disco Rotatório

LD- Limite de detecção

LQ- Limite de quantificação

MWCNT- “Multi-walled carbon nanotubes” Nanotubos de carbono de paredes múltiplas

NTC- Nanotubos de carbono

SWCNT- “Single-walled carbon nanotubes” Nanotubos de carbono de paredes simples

CLAE- Cromatografia líquida de alta eficiência

NADH- Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)

α - Coeficiente de transferência de elétrons

ΔE_p - Separação de potencial de pico

A- Área geométrica do eletrodo

Ag/AgCl- Eletrodo de prata cloreto de prata

b- Coeficiente angular

C_o - Concentração do analito, no seio da solução

D- Coeficiente de difusão

E- Potencial

n- número de elétrons

$E\lambda$ - Potencial de inversão

$E_{inicial}$ - Potencial Inicial

E_{final} - Potencial final

E_p - Potencial de pico

E_{pa} - Potencial de pico anódico

E_{pc} - Potencial de pico catódico

F- Constante de Faraday

I- Corrente

k_{cat} - Constante de velocidade da reação

AV- Ácido vanílico

Poli-AV- polímero de ácido vanílico

Q- Carga

R- Coeficiente de correlação

σ - Desvio padrão

T- temperatura

v- Velocidade de varredura de potencial

VC- Voltametria Cíclica

VPD- Voltametria de Pulso Diferencial

ERO- Espécies Reativas de Oxigênio

ERN- Espécies Reativas de Nitrogênio

ERONs- Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio

EQM- Eletrodo Quimicamente Modificado

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 18 |
| 1.1 | Introdução Geral..... | 18 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 20 |
| 2.1 | Eletroanalítica | 20 |
| 2.2 | Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio | 22 |
| 2.3 | Antioxidantes e Compostos Fenólicos | 25 |
| 2.3.1 | Classificação Química dos Ácidos Fenólicos..... | 27 |
| 2.3.2 | Ácido Vanílico..... | 29 |
| 2.4 | A importância das substâncias químicas selecionadas | 30 |
| 2.4.1 | L- Ácido Ascórbico..... | 30 |
| 2.4.2 | Ácido Úrico..... | 32 |
| 2.4.3 | Dopamina..... | 33 |
| 2.5 | Nanotubos de carbono (NTC) | 35 |
| 2.6 | Polímeros | 38 |
| 2.6.1 | Filmes Poliméricos em eletrodos modificados..... | 40 |
| 2.7 | O emprego dos Eletrodos Quimicamente Modificados para determinação de Ácido Úrico, Dopamina e L- Ácido Ascórbico | 41 |
| 3 | OBJETIVOS | 43 |
| 3.1 | Gerais | 43 |
| 3.2 | Específicos | 43 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS | 44 |
| 4.1 | Reagentes | 44 |
| 4.1.1 | Equipamentos e materiais..... | 44 |
| 4.2 | Preparação de solução de AV | 45 |

| | | |
|------------|--|----|
| 4.3 | Tratamento dos nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) | 45 |
| 4.3.1 | Preparação da dispersão de MWCNT..... | 45 |
| 4.4 | Limpeza do eletrodo de carbono vítreo (ECV) | 46 |
| 4.4.1 | Modificação do eletrodo de carbono vítreo com MWCNT e AV..... | 46 |
| 4.5 | Emprego do poli-AV/MWCNT/ECV na análise de AA, AU E DA | 46 |
| 4.6 | Determinação da área ativa do EQM | 47 |
| 4.7 | Estudo de repetibilidade no preparo do sensor | 47 |
| 5 | Resultados e discussão | 48 |
| 5.1 | Preparo do eletrodo modificado..... | 48 |
| 5.2 | Comportamento Eletroquímico do Ácido Vanílico em diferentes valores de pH | 55 |
| 5.3 | Oxidação Eletrocatalítica de AA, DA e AU | 58 |
| 5.4 | Características Cinéticas do poli-AV/MWCNT/ECV | 61 |
| 5.5 | Estudos Cronoamperométricos | 67 |
| 5.6 | Estudos com Eletrodo de Disco Rotatório | 74 |
| 5.7 | Detecção amperométrica de AA, AU e DA | 79 |
| 6 | CONCLUSÃO | 90 |
| 6.1 | Conclusões Gerais..... | 90 |
| 7 | PERSPECTIVAS | 91 |
| | REFERÊNCIAS | 92 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Introdução Geral

As reações de oxi-redução estão envolvidas em vias metabólicas importantes, em organismos vivos. Como resultado do metabolismo celular, principalmente na mitocôndria, espécies reativas de oxigênio (EROs) podem ser geradas, espécies essas derivadas da redução do oxigênio molecular (MELLO et al., 2013). Outras espécies nitrogenadas e suas combinações com as espécies oxigenadas e outras têm também relevância para os seres vivos.

Nos últimos 25 anos, o estudo de radicais livres e da ação antioxidante em sistemas fisiológicos tem sido amplamente reconhecido como relevante. Provou-se que há um aumento da ocorrência de patologias, principalmente no desenvolvimento de doenças crônicas degenerativas associadas com a condição do estresse oxidativo. A investigação de depleção de antioxidantes como biomarcadores de estresse oxidativo tem um papel central nesta área e pode envolver avaliação de diminuição nas concentrações de antioxidantes ou aumento de seus metabólitos, oriundos de processos oxidativos. O diagnóstico precoce é importante para o início da terapia e consequente manutenção da saúde de um paciente, impedindo ou diminuindo o ritmo de desenvolvimento de doenças. Na área de sensores para diagnóstico, a demanda cresceu para dispositivos simples e descartáveis, que também demonstram tempos de resposta rápidos, são rentáveis e têm produção em massa adequada para utilização pelos variados sistemas de saúde. Os sensores eletroquímicos atendem a esses requisitos, pois combinam abordagens de química, nanotecnologia e biotecnologia e permitem um desempenho comparável ao de técnicas cromatográficas e espectroscópicas. A literatura tem demonstrado o desenvolvimento de métodos baseados em sensores que podem caracterizar uma condição de estresse oxidativo e a quantificação de antioxidantes de forma adequada (MELLO e KUBOTA, 2007).

Devido a todos esses fatores, a determinação e quantificação de biomarcadores e antioxidantes associados ao estresse oxidativo têm revelado desafios no desenvolvimento de sensores com as propriedades exigidas para análise.

O presente trabalho descreve um dispositivo eletroquímico para detectar e quantificar alguns compostos antioxidantes envolvidos no estresse oxidativo.

Para uma melhor compreensão do tópico, faz-se breve revisão sobre eletroanalítica, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, compostos fenólicos, atuação dos compostos selecionados para análise, nanotubos de carbono, polímeros e trabalhos reportados que realizaram análise dos mesmos compostos utilizados neste trabalho.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Eletroanalítica

As técnicas eletroquímicas constituem-se em poderosa ferramenta para os químicos analíticos na resolução de seus problemas, especialmente por causa de algumas características vantajosas como a elevada sensibilidade das determinações, custo moderado e portabilidade (BRETT e BRETT, 1988; BARD e FAULKNER, 2001).

A versatilidade das técnicas eletroquímicas também merece destaque visto que é possível controlar as reações eletródicas, modificando a interface eletrodo-solução e selecionando criteriosamente o potencial aplicado à célula. A facilidade de automação em virtude da medição de sinais elétricos, a possibilidade de se proceder à especificação de íons metálicos em certos casos e a “compatibilidade ambiental”, pois o reagente empregado é o elétron, também consistem em aspectos que conferem aos métodos eletroanalíticos uma posição de destaque no contexto da Química Analítica (LOWINSOHN e BERTOTTI, 2006).

O desenvolvimento de sensores eletroquímicos é uma das áreas de maior e mais rápido crescimento dentro da Química Analítica, principalmente devido aos novos desafios impostos por amostras de interesse industrial, clínico e ambiental, que têm levado a uma crescente busca por sensores com melhores características, tais como alta sensibilidade, seletividade e estabilidade (SUZUKI, 2000).

Apesar da grande versatilidade e perspectivas apresentadas pelos sensores eletroquímicos, a utilidade de um eletrodo é muitas vezes limitada devido à passivação gradual de sua superfície, consequência principalmente da adsorção dos produtos da própria reação de oxi-redução utilizada na detecção, ou ainda, dos subprodutos destas reações que podem se polimerizar e se depositar sobre a superfície dos eletrodos.

A habilidade para controlar e manipular deliberadamente as propriedades das superfícies dos eletrodos pode proporcionar uma variedade de efeitos atrativos, levando a superfícies com características que podem contornar efetivamente muitos dos problemas apresentados pelos sensores eletroquímicos tradicionais, como por

exemplo, baixa seletividade, baixa área eletroativa, entre outros (FREIRE et al., 2003).

A manipulação na superfície de eletrodos tem vasta aplicação em eletroanalítica, pois conduz à melhoria na capacidade de reconhecimento e/ou na amplificação de sinais de corrente, ao mesmo tempo em que pode tornar as determinações mais seletivas pelo efeito eletrocatalítico (diminuição do sobrepotencial dos processos eletródicos), por catálise redox (uso de mediadores, com transferência de elétrons homogênea) ou pela restrição da passagem de espécies interferentes empregando-se membranas apropriadas (LOWINSOHN e BERTOTTI, 2006).

O mediador geralmente é um composto cujo par redox catalisa reações facilitando seletivamente a transferência de elétrons entre os analitos e o eletrodo. Funcionam como mediadores espécies tais como quinonas, tetratiofulvaleno, tetracianoquinodimetano; compostos organometálicos (ferrocenos, ftalocianinas, óxidos de rutênio, metaloporfirinas, etc.) ou enzimas (LIMA et al., 2008; PEREIRA et al., 2002). O mediador deve, geralmente, possuir um potencial redox mais baixo (menos negativo ou menos positivo, dependendo se o processo é redução ou oxidação, respectivamente) que os interferentes eletroquimicamente ativos na amostra, apresentando como vantagens, medidas com menor dependência ou completa independência da concentração do oxigênio e de outras substâncias presentes nas amostras e alta estabilidade (ROSATTO et al., 2001)

A sensibilidade da análise de muitos analitos importantes pode ser prejudicada em função da cinética de transferência de elétrons entre estes compostos e os materiais dos eletrodos, quando esta se torna excessivamente lenta. Outra limitação é a dificuldade de discriminar entre compostos alvos que possuam características redox similares (FREIRE et al, 2003).

2.2 Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), de nitrogênio (ERN), entre outras espécies (Tabela 1, Figura 1), é parte integrante do metabolismo

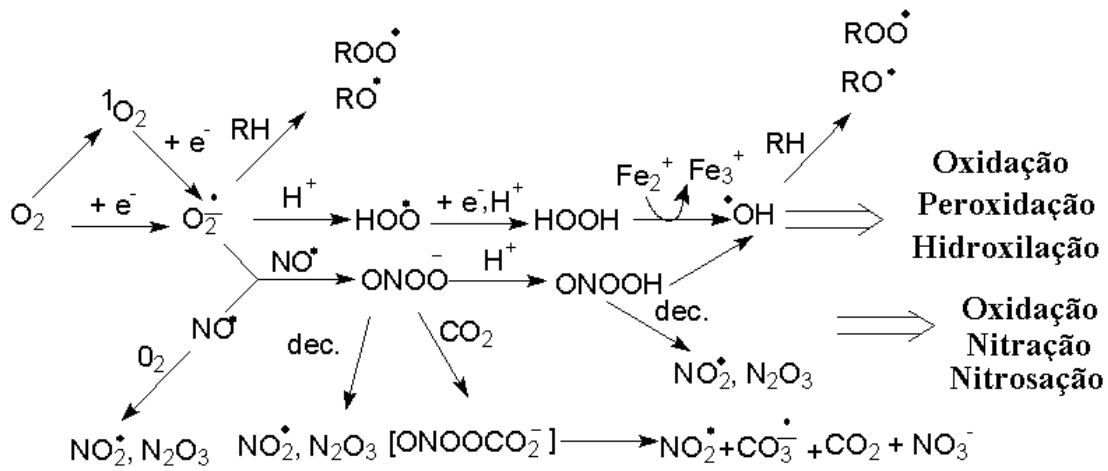
humano e é observada em diversas condições fisiológicas. ERO e ERN têm importante função biológica, como na fagocitose, fenômeno em que essas espécies são produzidas para eliminar o agente agressor. Por outro lado, quando sua produção é exacerbada, o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio. O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante, com predominância do primeiro (VASCONCELOS et al., 2007; SCHAFER e BUETTNER, 2001).

Tabela 1: Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio radicalares e não-radicalares.

| ERO | ERN |
|---|--|
| Radicais | Radicais |
| O ₂ ^{•-} ânion radical superóxido | NO [•] óxido de nitrogênio |
| HO [•] radical hidroxila | NO ₂ [•] dióxido de nitrogênio |
| RO ₂ [•] radical peroxila | |
| RO [•] radical alcoxila | Não Radicais |
| HO ₂ [•] radical hidroperoxila | ONOO ⁻ peroxinitrito |
| | ONOOH ácido peroxinitroso |
| Não Radicais | ROONO alquil peroxinitrito |
| ¹ O ₂ oxigênio singleto | NO ⁻ ânion nitroxil |
| O ₃ ozônio | NO ⁺ cátion nitrosil |
| H ₂ O ₂ peróxido de hidrogênio | HNO ₂ ácido nitroso |
| HOCl ácido hipocloroso | N ₂ O ₃ trióxido de dinitrogênio |
| ONOO ⁻ peroxinitrito | NO ₂ Cl cloreto de nitrila |
| CO ₃ ²⁻ íon carbonato | NO ₃ ⁻ nitratos |
| | NO ₂ ⁻ nitritos |

Fonte: Autor, 2013.

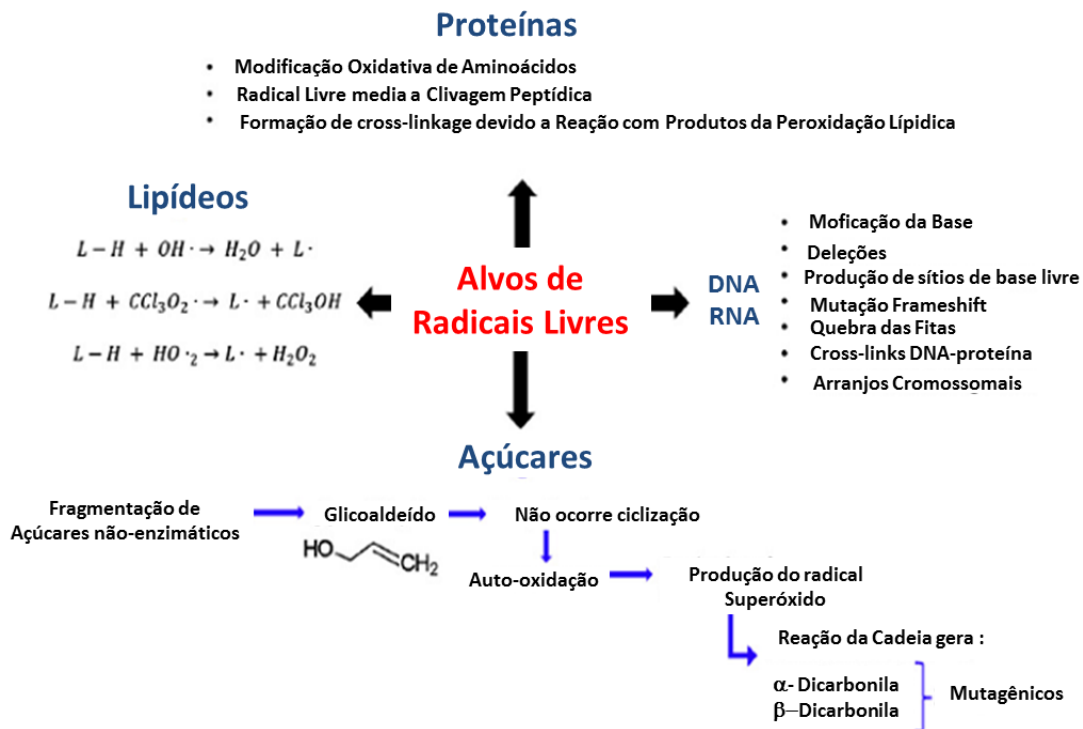
Figura 1- Geração e reações que envolvem ERO e ERN.



Fonte: LIMA, 2009. (Adaptado de Arbault e Amatore).

ERONs reagem com macromoléculas causando modificações estruturais. Algumas destas moléculas modificadas podem ser consideradas biomarcadores de dano oxidativo. As principais classes de macromoléculas que são alvos do “ataque” de ERONs estão presentes na Figura 2.

Figura 2- Macromoléculas que são alvos de ataque de radicais livres.



Fonte: Adaptado de DIZDAROGLU et al., 2002; VALKO et al., 2004; BENOVA e BEEMA, 2003; HALLIWELL e CHIRICO, 1993; LOBO et al., 2010.

Segundo ZWART e colaboradores (1999) e LABAER (2005), os biomarcadores têm características passíveis de avaliação e mensuração, como indicadores de processos biológicos normais, processos patogênicos ou de resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica. Como tal, refletiriam mudanças em sistemas biológicos relacionadas à exposição ou aos efeitos de xenobióticos, ou outros tipos de fatores, como doenças, por exemplo.

É também fato reconhecido que ERO e ERN desempenham papéis fisiológicos importantes como o controle da pressão sanguínea, na sinalização celular, na apoptose, na fagocitose de agentes patogênicos, na fertilização de ovos e no amadurecimento de frutos. O reconhecimento dessa relação estimulou o desenvolvimento de estudos de marcadores de dano oxidativo e de substâncias antioxidantes em sistemas biológicos (VASCONCELOS et al., 2007), além do desenvolvimento de sensores para detecção e quantificação dessas espécies.

2.3 Antioxidantes e Compostos Fenólicos

HALLIWELL e GUTTERIDGE (2007) definiram como antioxidantes “qualquer substância que quando presentes em baixas concentrações em relação à de um substrato oxidável atrasa ou inibe significativamente a oxidação do substrato”, mais tarde definiu como “qualquer substância que atrase, impeça ou elimine os danos oxidativos a uma molécula-alvo”. O sistema antioxidante humano é dividido em dois grandes grupos, antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Figura 3).

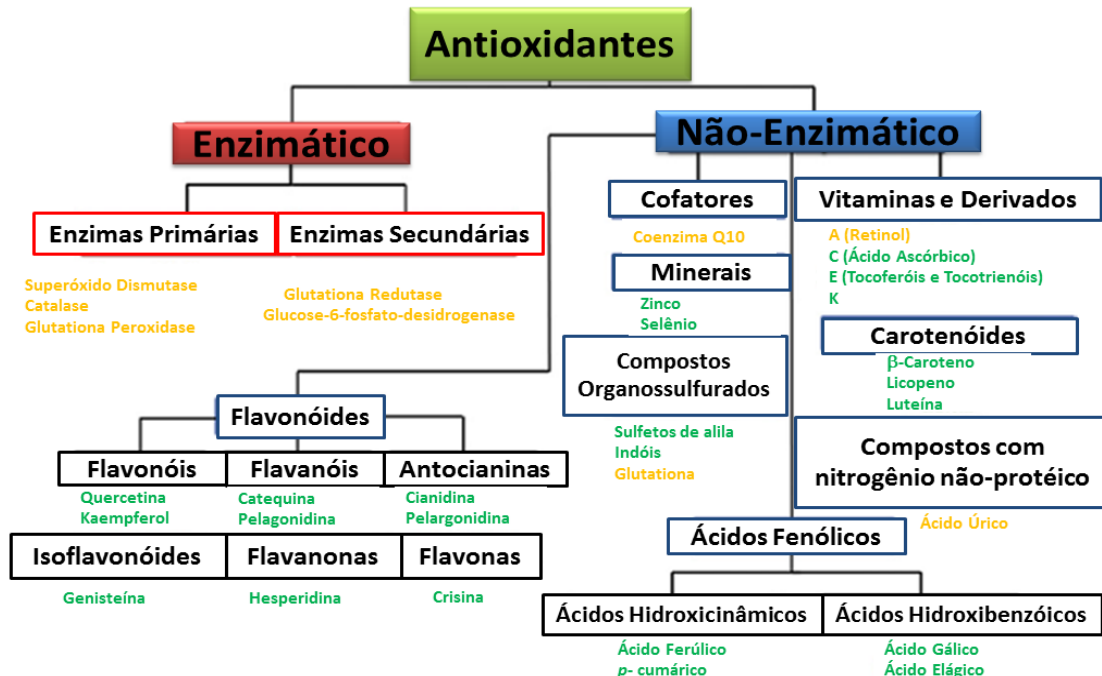
Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro* (HASLAM, 1996; SOARES, 2002).

Compostos fenólicos são abundantes em frutas, vegetais e alimentos derivados dos mesmos, e são consistentemente associados à redução do risco de doenças cardiovasculares, câncer e outras doenças crônicas (SPENCER et al., 2008)

A presença dos compostos fenólicos em plantas tem sido muito estudada por estes apresentarem atividades farmacológica e nutricional e também por inibirem a oxidação lipídica e a proliferação de fungos (NAGEM et al., 1992; GAMACHE et al., 1993; IVANOVA et al., 1997; AZIZ et al., 1998; FERNANDEZ et al., 1998; HOLLMAN e KATAN, 1998), além de participarem de processos responsáveis pela cor, adstringência e aroma em vários alimentos (PELEG et al., 1998), e são utilizados como mediadores redox em sensores (LIN, REN e LUO, 2007; SONG et al., 2010).

Os compostos fenólicos representam uma grande variedade de substâncias caracterizadas pela presença de um ou mais anéis aromáticos ligados a pelo menos um grupo hidroxila e/ou outros substituintes, e podem ser divididos de acordo com o número de anéis fenólicos e com as estruturas as quais estão ligados (D'ARCHIVIO et al., 2007, CAROCHO e FERREIRA, 2013).

Figura 3- Antioxidantes naturais separados em classes (Em verde, antioxidantes exógenos, em amarelo, antioxidantes endógenos).



Fonte: Adaptado de PIETTA, 2000; RATUAN et al.,2006;GOLMAN et al., 2011.

Os compostos fenólicos de plantas enquadram-se em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (HASLAM, 1996).

A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estruturas químicas. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou seqüestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância no anel aromático presente na estrutura destas substâncias (HASLAM, 1996; SOARES, 2002; CHUN et al.,2005).

Embora as evidências sejam claras sobre a ação *in vitro* dos fenóis e polifenóis com espécies reativas de oxigênio eles podem, em algumas circunstâncias, tal como o ascorbato e os carotenóides, mostrarem características pró-oxidantes (VALKO et al., 2004).

Evidências recentes sugerem que estes compostos possam atuar por meio de outros mecanismos além da capacidade antioxidante, como a modulação da atividade de diferentes enzimas como telomerase, lipoxigenase e cicloxigenase, interações com receptores e vias de transdução de sinais, regulação do ciclo celular, entre outras, essenciais para a manutenção da homeostase dos organismos vivos (D'ARCHIVIO et al., 2007).

Visto que estes compostos são reconhecidos pelo organismo como xenobióticos, estimulando os mecanismos de destoxificação e defesa antioxidante, a concentração fisiológica dos mesmos é relativamente restrita e sua biodisponibilidade constitui importante fator de controle. Isto explica a relação entre o consumo diário de compostos fenólicos, que atinge alguns gramas e as baixas concentrações (micromóis) desses compostos nos organismos (OLIVEIRA e BASTOS, 2011).

2.3.1 Classificação Química dos Ácidos Fenólicos

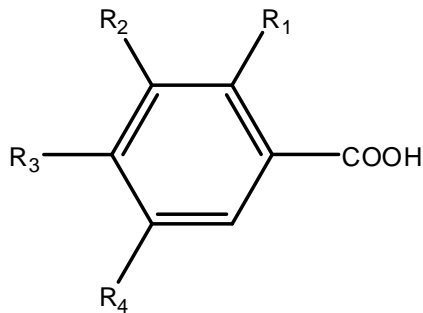
Os ácidos fenólicos apresentam um grupo funcional carboxila e são divididos em duas classes: os ácidos hidroxibenzóicos e os hidroxicinâmicos.

Os primeiros são componentes das complexas estruturas dos taninos hidrolisáveis e são menos abundantes nos vegetais consumidos pelos humanos (MANACH et al., 2004).

Os ácidos fenólicos (Figura 4) são algumas das substâncias que constituem o grupo dos compostos fenólicos. Caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo propriedades antioxidantes tanto para os alimentos como para o organismo, sendo, por isso, indicados para o tratamento e prevenção do câncer,

doenças cardiovasculares e outras doenças (KERRY e ABBEY, 1997; BRAVO, 1998; CROFT, 1998; FERGUSON e HARRIS, 1999).

Figura 4- Estrutura Química dos principais Ácidos Benzóicos



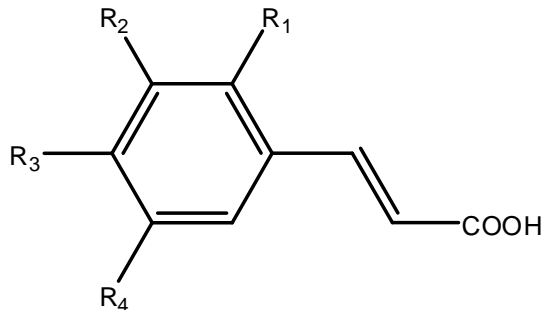
Ácido Salicílico: $R_1=OH$; $R_2=R_3=R_4=H$
 Ácido Gentísico: $R_1=R_4=OH$; $R_2=R_3=H$
 Ácido p-hidroxibenzoico: $R_1=R_2=R_4=H$; $R_3=OH$
 Ácido Protocatequínico: $R_1=R_4=H$; $R_2=R_3=OH$
 Ácido Vanílico: $R_1=R_4=H$; $R_2=OCH_3$; $R_3=OH$
 Ácido Gálico: $R_1=H$; $R_2=R_3=R_4=OH$
 Ácido Siríngico: $R_1=H$; $R_2=R_4=OCH_3$; $R_3=OH$

Fonte: RAMALHO e JORGE, 2006.

Os ácidos hidroxicinâmicos (Figura 5) estão presentes em vários alimentos e bebidas de origem vegetal, como o café, erva mate, maçã, ameixa e outras frutas, crucíferas, cereais, entre outros (CLIFFORD, 1999).

Exemplos desta classe de compostos são o ácido cafeico, *p*-cumárico, ferúlico e sinápico que, na maioria dos alimentos, se encontram esterificados ao ácido quínico, ácido tartárico ou carboidratos e derivados (LAFAY, 2008; KARAKAYA, 2004). Ácidos hidroxicinâmicos também podem ser encontrados na forma livre em alimentos, como o tomate e a cerveja. (BOURNE e RICE-EVANS, 1998).

Figura 5- Estrutura Química dos principais Ácidos Cinâmicos



Ácido Cinâmico: $R_1=R_2=R_3=R_4=H$

Ácido o-cumárico: $R_1=OH$; $R_2=R_3=R_4=H$

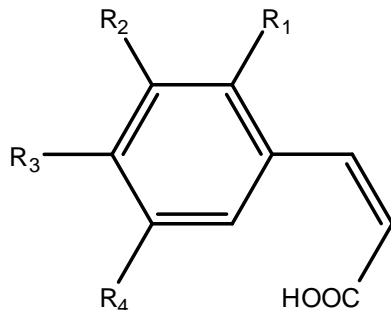
Ácido m-cumárico: $R_1=R_3=R_4=H$; $R_2=OH$

Ácido p-cumárico: $R_1=R_2=R_4=H$; $R_3=OH$

Ácido caféico: $R_1=R_4=H$; $R_2=R_3=OH$

Ácido ferúlico: $R_1=R_4=H$; $R_2=OCH_3$

Ácido sinápico: $R_1=H$; $R_2=R_4=OCH_3$; $R_3=OH$

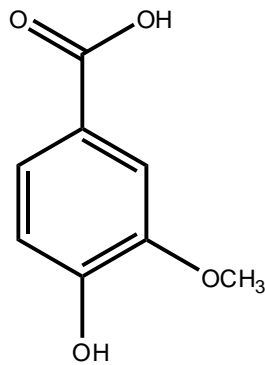


Fonte: Adaptado de RAMALHO e JORGE, 2006.

2.3.2 Ácido Vanílico

O ácido vanílico (4-hidroxi-3-metoxibenzoico) utilizado como mediador redox neste trabalho (Figura 6-A) é um composto fenólico natural obtido de plantas e frutas comestíveis. Vários estudos têm fornecido evidências da eficácia do ácido vanílico no tratamento de processos imunológicos ou inflamatórios. Por exemplo, o ácido vanílico aumentou a atividade de proliferação de linfócitos humanos (CHIANG et al., 2003). Apresenta propriedades antibacteriana (RAI e MAURYA, 1996) e antimicrobiana (DELAQUIS et al., 2005), além de apresentar efeito quimiopreventivo em carcinogênese induzida experimentalmente (TSUDA et al., 1994). É um derivado do ácido benzoico utilizado como um agente flavorizante, além de ser uma forma oxidada de vanilina produzida durante a conversão de vanilina a ácido ferúlico (CIVOLANI et al., 2000).

Figura 6- Estrutura Química do Ácido Vanílico (A) e foto da *Angelica sinensis* (B)



(A)



(B)

Fonte: (A) Autor, 2013; (B) Retirado de <http://www.herbsfor.net/dong-quai-angelica-sinensis.html> em 17/11/12.

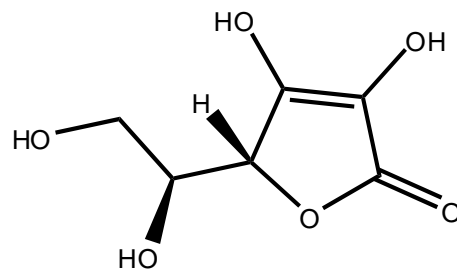
A maior quantidade de ácido vanílico em plantas foi encontrada nas raízes de *Angelica sinensis*, com nomes populares de ginseng e angélica chinesa (Figura 6-B), utilizadas na medicina tradicional chinesa (DUKE, 1992).

2.4 A importância das substâncias químicas selecionadas

2.4.1 L- Ácido Ascórbico

O L-Ácido Ascórbico (AA) (Figura 7) é uma vitamina solúvel presente em muitos sistemas biológicos e em preparações de multivitaminas, comumente usado como antioxidante (AGUI et al., 2007). Tem sido utilizado também para a prevenção e tratamento de resfriado comum, doenças mentais, infertilidade, câncer, AIDS, entre outras (REFSUM et al., 1998).

Figura 7- Estrutura Química do L- Ácido Ascórbico

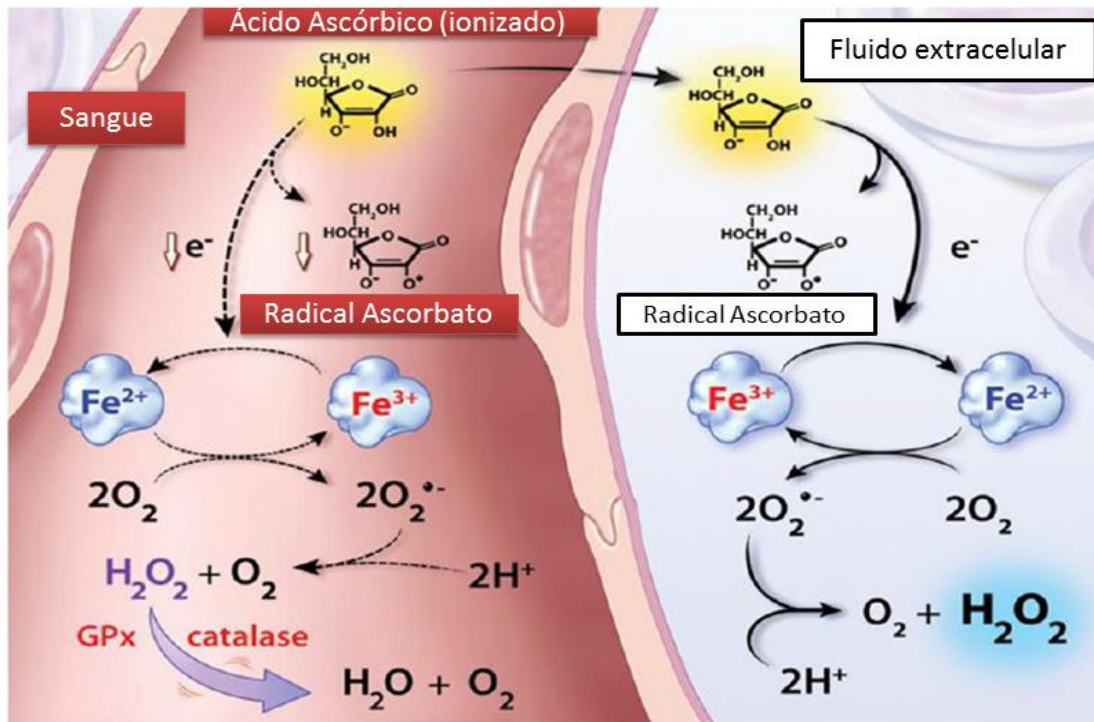


Fonte: Autor, 2013.

Em sistemas biológicos, em pH fisiológico (7,4), 99,95 % da vitamina C (AA) encontra-se na forma de ascorbato, que é a forma que atua como antioxidante, ao doar um $H\cdot$ ou $[-1 e^-, -H^+]$ para um radical (LIMA, 2009) .

O ascorbato ($AsCH^-$) atua como antioxidante sobre ERO e ERN, em ambiente biológico aquoso, resultando na formação do ânion radical semidesidroascorbato ($Asc\cdot^-$), ascorbila ou radical ascorbato pouco reativo. Atua eficientemente sobre o ânion-radical superóxido ($O_2\cdot^-$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o hipoclorito (ClO^-) e os radicais hidroxila ($\cdot OH$) e peroxila ($\cdot OOH$). O ascorbato pode atuar diretamente nas membranas celulares, por impedir a iniciação da peroxidação lipídica ou, indiretamente, por regenerar a vitamina E, que atua como antioxidante na face lipofílica da membrana (BARREIROS et al., 2006; LIMA, 2009) e sua concentração no plasma está na faixa de 40 a 80 μM (DU, CULLEN e BUETTNER, 2012). O ascorbato pode apresentar efeito pro-oxidante por ser um excelente agente redutor de 1 elétron, o qual pode reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} , sendo oxidado a radical ascorbato. Dependendo da biodisponibilidade de Fe^{2+} , este pode reagir com O_2 gerando ânion radical superóxido, o qual sofre dismutação produzindo H_2O_2 e O_2 , ocorrendo este processo em meio intracelular e extracelular (Figura 8)

Figura 8- Ação do L- Ácido Ascórbico como pró-oxidante em fluidos biológicos.

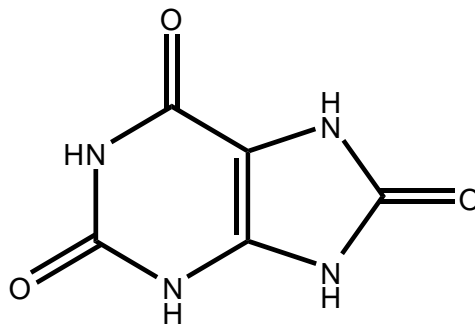


Fonte: Adaptado de LEVINE, PADAYATTY e ESPEY, 2011.

2.4.2 Ácido Úrico

O Ácido Úrico (AU) (Figura 9) deriva do metabolismo das purinas e é produzido pela oxidação de hipoxantina e xantina pela xantina oxidase e xantina desidrogenase. Seu nível anormal é normalmente indicativo de algumas doenças como a gota e doença de Lesch-Nyhan. Apresenta atividade antioxidante significativa e sua concentração no plasma é maior que a de outros antioxidantes, tais como as vitaminas C e E, sendo sua faixa de concentração de 200-450 μ M. (GHISELLI et al., 2000; SILVA et al., 2012).

Figura 9- Estrutura Química do Ácido Úrico.

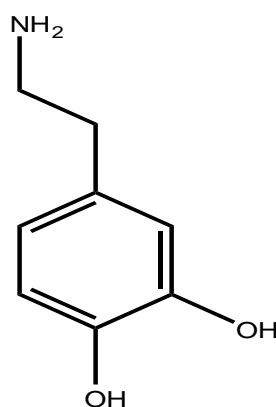


Fonte: Autor, 2013.

2.4.3 Dopamina

A dopamina (DA) (Figura 10) é um neurotransmissor importante da classe das catecolaminas, é amplamente distribuída no sistema nervoso central de mamíferos para transferência de impulsos elétricos entre os neurônios. Ela desempenha um papel muito importante nos sistemas renal, hormonal e cardiovascular. Anormalidades extremas de níveis de dopamina levam a desordens no cérebro tais como esquizofrenia e doença de Parkinson (WIGHTMAN, MAY e MICHAEL, 1988; ADAMS, 1976; VENTON e WIGHTMAN, 2003).

Figura 10- Estrutura Química da Dopamina.



Fonte: Autor, 2013.

DA atua como uma fonte de estresse oxidativo celular e é conhecido por sofrer oxidação que leva à formação de radicais citotóxicos e quinonas (Figura 11-A). Tais oxidações podem ocorrer espontaneamente via metal, oxigênio ou mecanismos catalisados por enzimas. Além disto, oxidações que envolvem DA podem resultar na produção de ERO que são capazes de induzir a peroxidação lipídica e danos a outras macromoléculas celulares, tais como DNA e proteínas. Outro mecanismo potencial de toxicidade para DA se dá pelo seu metabolismo fisiológico a 3,4 di-hidroxifenilacetaldeído (ANDERSON et al., 2011). Em altos valores de pH, a dopamina se encontra em sua forma não protonada, sendo possíveis reações químicas acopladas à etapa de formação da dopamina *orto*-quinona. Esta sofre reação de ciclização para formar um leucoaminocromo, sendo este oxidado a um potencial menos positivo do que a DA; portanto, reage imediatamente com a dopamina *orto*-quinona para formar aminocromo e dopamina, como apresentado na Figura 11-B (CHEN, TAI e WEBSTER, 2011).

Figura 11- Mecanismos de oxidação da Dopamina.

(*Continua*)

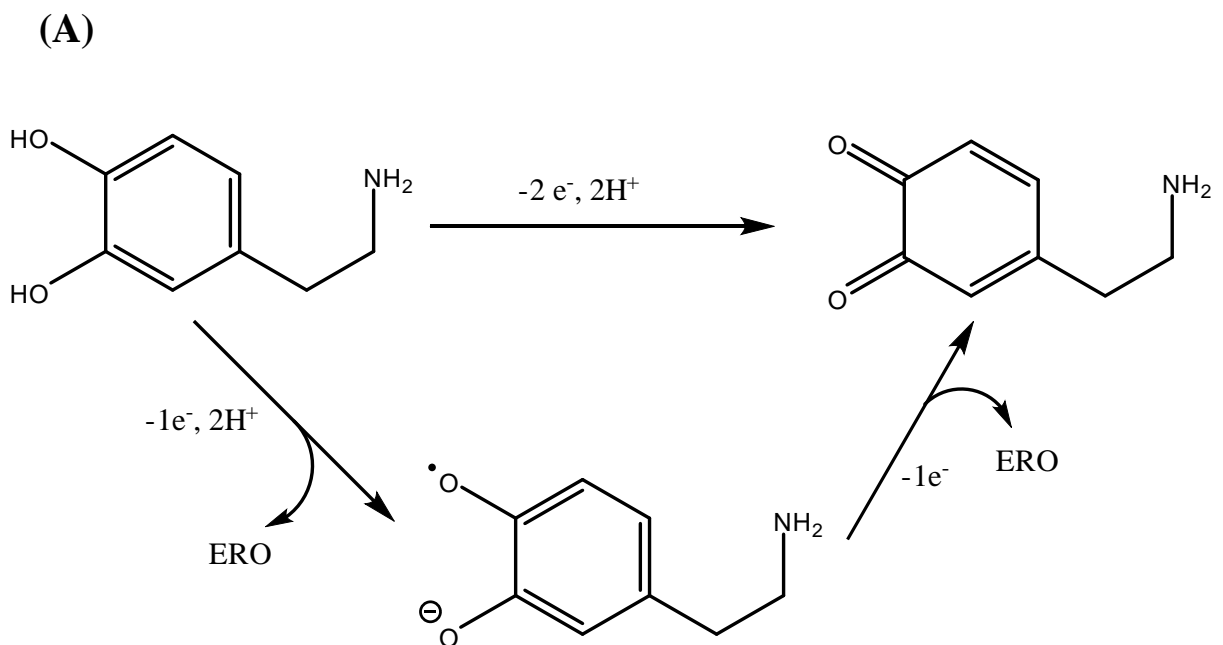
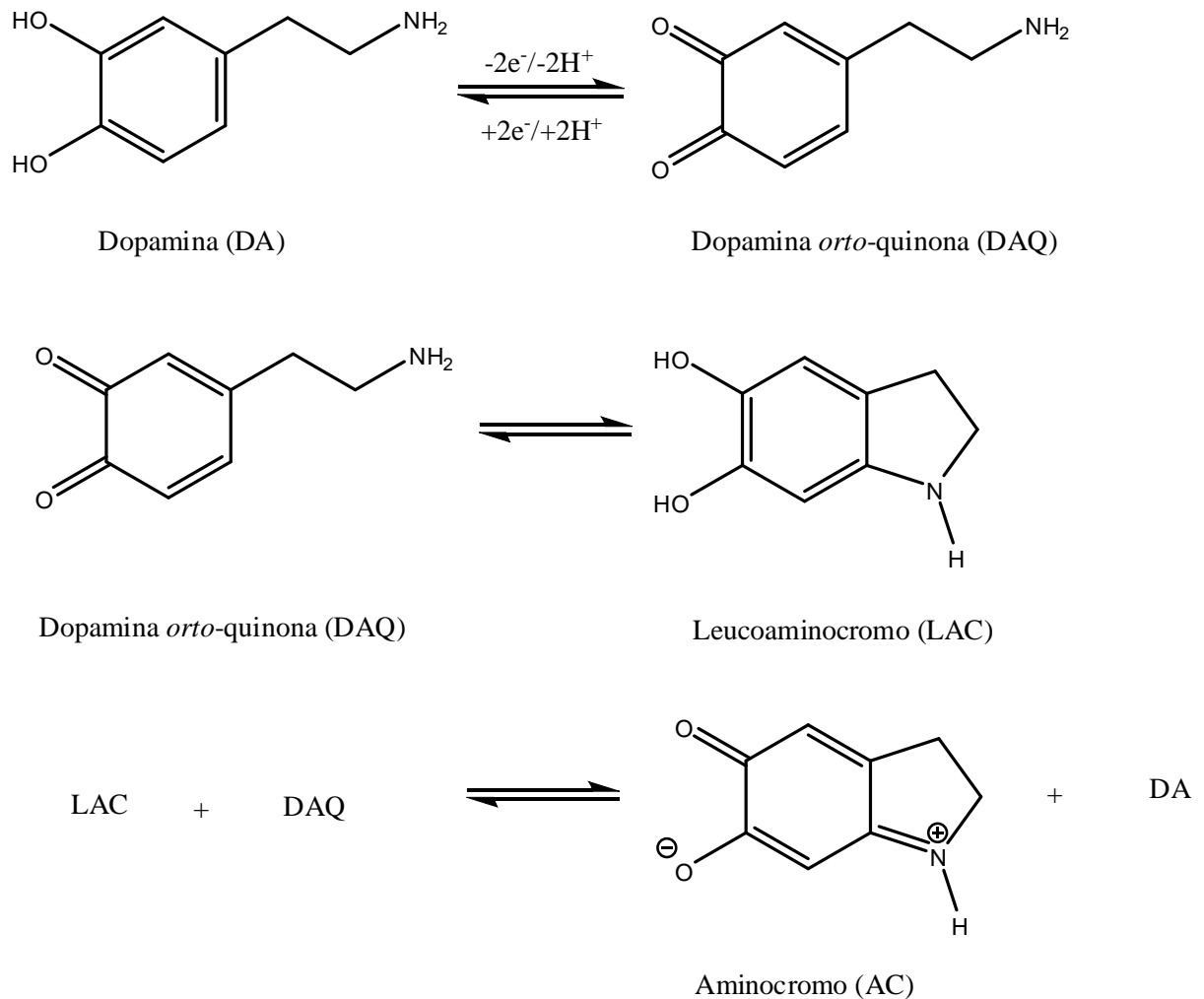


Figura 11- Mecanismos de oxidação da Dopamina.

(Continuação)

(B)



Fonte: Adaptado de (A) ANDERSON et al., 2011; (B) CHEN, TAI e WEBSTER, 2011.

2.5 Nanotubos de carbono (NTC)

O desenvolvimento de sensores eletroquímicos tem sido amplamente pesquisado como um método de baixo custo para detecção sensível de uma variedade de analitos biológicos. Eletrodos à base de carbono têm sido utilizados devido ao seu baixo custo, boa cinética na transferência de elétrons, e biocompatibilidade. Recentemente, os nanotubos de carbono (NTC) foram

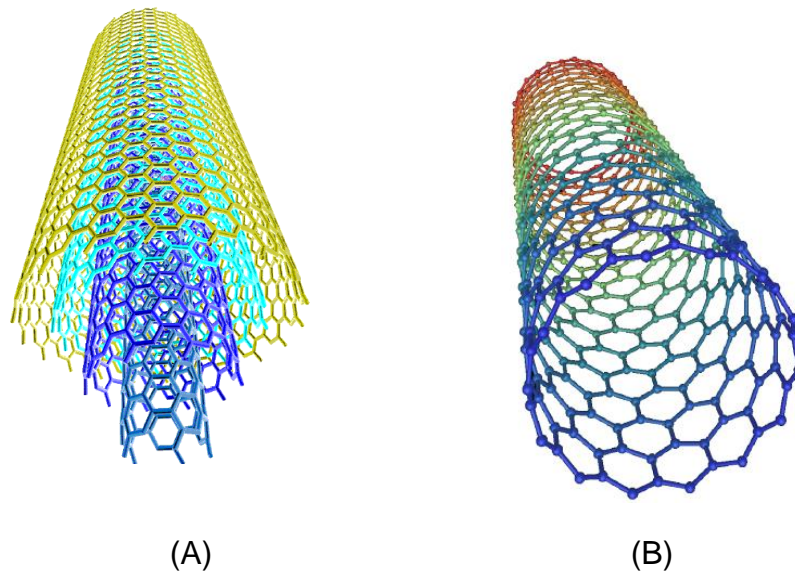
incorporados em sensores eletroquímicos. A literatura apresenta uma série de trabalhos com a utilização de plataformas modificadas com NTC.

Sensores baseados em NTC têm geralmente sensibilidades mais altas, menores limites de detecção e cinética de transferência de elétrons mais rápida do que eletrodos de carbono tradicionais. Muitas variáveis precisam ser testadas e, em seguida, otimizados para criar um sensor baseado em NTC. O desempenho do eletrodo pode depender do método de síntese do nanotubo, modificação da superfície de NTC e do modo de fixação na adição de mediadores no eletrodo. (JACOBS, PEAIRS E VENTON, 2010).

As propriedades físicas e catalíticas tornam o uso de NTCs ideal em sensores. Notavelmente, os nanotubos de carbono exibem alta condutividade elétrica, estabilidade e resistência mecânica. Os dois principais tipos de nanotubos de carbono são os nanotubos de carbono de parede única (SWCNTs) (do inglês “single-walled carbon nanotubes”) (Figura 12-B) de diâmetros de 1 a 2 nm e os nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs) (do inglês “multi-walled carbon nanotubes”) (Figura 12-A) de diâmetro de 2 a 25 nm (LIJIMA, 1991).

Há um significativo debate sobre a eletroatividade fundamental de nanotubos de carbono, estudos sugerem que as paredes laterais de MWCNTs são essencialmente inertes e que as bordas incluindo extremidades abertas são responsáveis pela eletroatividade de MWCNT. Em SWCNT, os defeitos na borda tais como as extremidades oxigenadas, também são considerados responsáveis por sua eletroatividade. O efeito eletrocatalítico é muitas vezes associado à presença de grupos funcionais presentes em nanotubos e nanopartículas de ferro, níquel e cobalto advindas da síntese de nanotubos de carbono (DUMITRESCU, UNWIN e MACPHERSON, 2009).

Figura 12 -Representação esquemática: (A) MWCNT e (B) SWCNT



Fonte: Adaptado de SILVA, 2011 e <http://students.chem.tue.nl/ifp03/default.htm>, acessado em 05/01/13.

Os nanotubos de carbono podem ser tratados para funcionalizar as suas superfícies. O tratamento ácido adiciona grupos carboxila e outros, na superfície dos nanotubos. Reações químicas posteriores podem ser realizadas para funcionalizar estes grupos, gerando amidas, tioésteres ou outros. A modificação da superfície do nanotubo afeta fortemente as propriedades de solubilidade, que podem afetar a facilidade de fabricação dos sensores de NTC (ZHAO e STODDART, 2009).

É intenso o uso de nanotubos de carbono em sensores eletroquímicos devido aos benefícios: correntes mais elevadas, sobrepotenciais mais baixos e altas taxas de transferência de elétrons. Nanotubos de carbono são normalmente incorporados sobre eletrodos por crescimento direto na superfície do eletrodo, encaixando-os em revestimentos de polímero, ou combinando com um ligante para formar pastas, a serem incorporadas em eletrodos. Os métodos eletroquímicos comuns utilizados com sensores NTC incluem voltametria, amperometria, espectroscopia de impedância elétrica, potenciometria (RIVAS, 2007).

O NTC permite a imobilização de mediadores tanto de origem biológica, quanto inorgânica, orgânica ou por processos de polimerização em eletrodos modificados com NTC, apresentando, desta forma, comportamento eletroquímico com ótimas características, garantindo assim alta estabilidade, desejável para um ótimo desempenho de sensores químicos.

2.6 Polímeros

Os polímeros são uma importante classe de materiais com propriedades elétricas que permitem uma vasta gama de aplicações em eletrônica, optoeletrônica e biotecnologia, tais como baterias recarregáveis, eletrônica molecular, “displays” eletrônicos, células solares, em membranas trocadoras de íons, em células combustíveis, diodos, capacitores, transistores, placas de circuito impresso, sensores químicos, sistemas de liberação de drogas, biossensores entre outros (FERREIRA et al., 2011).

A síntese de polímeros pode ser realizada por via química ou eletroquímica. A síntese eletroquímica de polímeros tornou-se um recurso muito atraente, uma vez que é rápida e fácil. Também apresenta elevada reprodutibilidade e estabilidade, com controle da espessura. As reações podem ser realizadas à temperatura e pressão ambientes. A estrutura dos polímeros eletroativos pode ser controlada por processos eletroquímicos, produzindo efeitos dramáticos sobre a morfologia dos filmes poliméricos.

Além disso, os revestimentos poliméricos podem ser aplicados a uma vasta gama de materiais de eletrodo, incluindo carbono vítreo, grafite, Au e Pt.

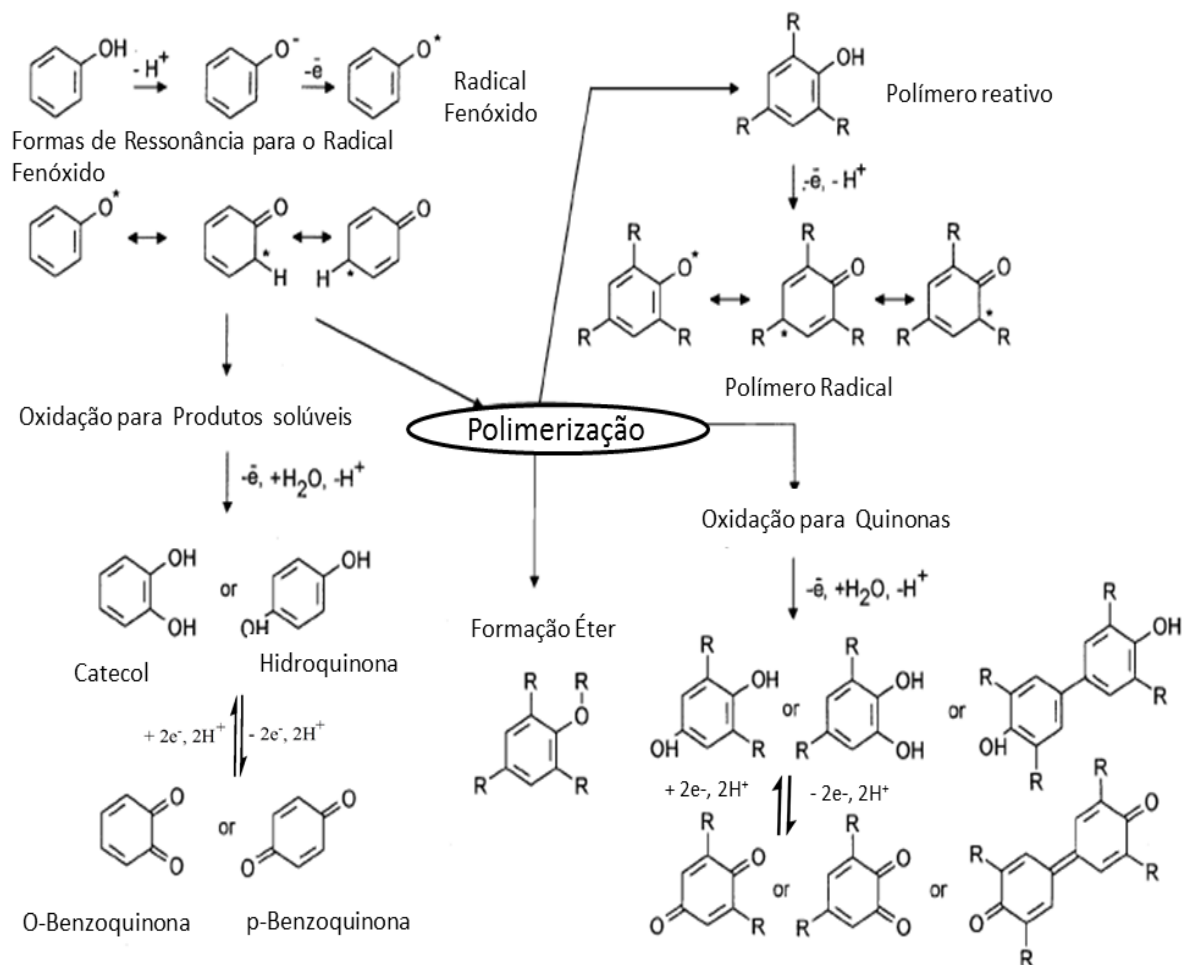
Eletrodos revestidos com polímeros levam a uma cobertura de superfície mais elevada e conseqüentemente aumentam a quantidade de material eletroativo ligado à superfície (CASSIDY, VOS e DOHERTY, 1998).

Segundo ABREU e colaboradores (2002), a oxidação de fenóis pode formar polímeros não eletroativos aderentes à superfície eletródica, com conseqüente passivação, entretanto SILVA et al., (2010) demonstraram que a oxidação de fenóis

pode formar dímeros/polímeros fortemente adsorvidos na superfície, mas na presença de nanotubos de carbono não ocorre o bloqueio da superfície.

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 como observado na Figura 13.

Figura 13- Rotas para polimerização de fenóis



Fonte: Adaptado de EZERSKIS e JUSYS, 2001.

2.6.1 Filmes Poliméricos em eletrodos modificados

PEREIRA e colaboradores (2002) realizaram uma revisão sobre filmes poliméricos na modificação de eletrodos.

Esta técnica consiste no recobrimento da superfície do eletrodo, com filmes poliméricos condutores ou permeáveis ao eletrólito de suporte e à espécie de interesse. A modificação com membranas poliméricas permite a imobilização de muitas monocamadas da espécie ativa na superfície modificada, ampliando consideravelmente a resposta eletroquímica.

Desta forma, filmes poliméricos têm sido empregados no desenvolvimento de sensores para evitar alguns problemas do sinal analítico a partir de reações paralelas, bem como para imobilizar biocomponentes, incorporar mediadores e fornecer biocompatibilidade (SOUZA e FAGAN, 1997).

Devido à grande variedade dos polímeros, pode-se explorar suas propriedades conforme o interesse. Dessa forma, polímeros eletroativos (eletrocatalise), quimicamente ativos (propriedades ligantes ou de troca-iônica para pré-concentração) e inertes (apenas exclusão de interferentes) são frequentemente utilizados. No geral, os filmes poliméricos são classificados em 4 classes: condutores, de troca-iônica, não-condutores, e de membranas compostas.

Filmes poliméricos condutores são amplamente usados devido à característica de aumentar a velocidade de transferência de elétrons. Geralmente, os filmes poliméricos de troca iônica possuem um componente redox ativo, o qual é um contra-íon de um filme poli-iônico como polivinilpiridina ou Nafion.

Os polímeros não-condutores são frequentemente usados por suas características permeosseletivas. Estes tipos de filmes poliméricos são empregados em biossensores para prevenir interferentes, impurezas sobre a superfície do eletrodo, para imobilizar biocomponentes e mediadores de tal forma que estes não sejam lixiviados para solução. A espessura típica para estes filmes formados por eletropolimerização é de cerca de 10 nm (PEREIRA et al., 2002).

2.7 O emprego dos Eletrodos Quimicamente Modificados para determinação de Ácido Úrico, Dopamina e L- Ácido Ascórbico

Fluorescência, quimiluminescência, cromatografia de íons, CLAE, espectrometria de massas e eletroforese capilar são algumas das técnicas utilizadas para detecção e quantificação de Ácido *L*-Ascórbico, Ácido Úrico e Dopamina, mas o seu relativo alto custo e o fato de suas aplicações para determinação *in situ* estarem longe de serem completamente desenvolvidas dificultam a utilização destas técnicas (LI et al., 2007).

As técnicas eletroquímicas quando comparadas às técnicas citadas anteriormente apresentam inúmeras vantagens como já descrito no início do trabalho, tais como: baixo custo, acessibilidade, confiabilidade, fácil automação, possibilidade de miniaturização e de aplicações *in situ*.

Alguns fatores dificultam a determinação simultânea de AA, DA e AU, uma vez que AA e AU interagem fortemente com DA em pH 7,0, pelo fato de AA e AU estarem dissociados e portanto carregados negativamente e DA associada carregada positivamente, além de que possuem potenciais de oxidação próximos e por ocorrer passivação dos eletrodos utilizados em suas análises por produtos de oxidação destas espécies. As concentrações de AA e AU são cerca de 100 a 1000 vezes maiores do que a de DA em fluídos biológicos, o que dificulta a análise desta (LI et al., 2007).

Nos últimos anos, vários eletrodos modificados têm sido desenvolvidos para a determinação simultânea de vários compostos de relevância biológica. A necessidade de manipular a superfície de eletrodos faz-se necessária para se obter sobrepotenciais de oxidação menores (processo eletrocatalítico), aumentar a área eletroativa na superfície do eletrodo, conseqüentemente resultando em melhora na sensibilidade, menores limites de detecção e quantificação, quando comparados aos eletrodos tradicionais.

SAFAVI e colaboradores (2006) trabalharam com eletrodo de carbono modificado por líquido iônico, utilizado para a determinação simultânea de DP, AA e AU. A construção e uso de eletrodo de pasta de carbono modificado com grafite

oxidado para determinação seletiva de dopamina foi registrado por THOMAS e colaboradores, (2011).

MWCNT-quitosana/poli(amidoamina) (PAMAM) nanocompósito com incorporação de DNA foi desenvolvido para determinação simultânea de DA e AU na presença de AA por LIU e colaboradores, (2011). MWCNT modificado com compostos inorgânicos como nanopartículas de hexacianoferrato de níquel para determinação de AU foi descrito por FANG et al., (2011).

CHEN e colaboradores (2010) sintetizaram ácido metacrílico molecularmente impresso na superfície de MWCNT para detectar AU. DNA e RNA têm sido utilizados para modificação de eletrodos de carbono vítreo, desde que essas biomoléculas tenham capacidade de reconhecer neurotransmissores como a dopamina (LIN et al., 2007; KAWG e LIN, 2006). SILVA e colaboradores (2012) desenvolveram um sensor amperométrico baseado em poli- ácido xanturênico, nanotubos de carbono e eletrodo de carbono vítreo para determinação simultânea de AA e AU.

Eletrodos modificados com polímeros derivados de eletropolimerização de ácidos fenólicos são citados na literatura. HOU e colaboradores, (2008) trabalharam na determinação de dopamina na presença de AA usando eletrodo de carbono vítreo modificado com poli (ácido 3,5-Diidroxibenzóico). LI, REN e LUO (2007) utilizaram eletrodo de carbono vítreo modificado com poli (ácido caféico), para determinação de dopamina e epinefrina. Já SONG e colaboradores (2010) descreveram a modificação do eletrodo de carbono vítreo com poli(ácido gálico) para determinação de dopamina.

O presente trabalho descreve a preparação e o uso de eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNT com ácido vanílico, no qual a eletropolimerização é realizada *in situ* por meio da oxidação do fenol que resulta na formação de novas espécies eletroativas gerando assim, um polímero baseado em ácido vanílico.

3 OBJETIVOS

3.1 Gerais

Este trabalho visa o desenvolvimento de um sensor fundamentado em nanotubos de carbono e polímero derivado do ácido vanílico (poli-AV) para determinação simultânea de ácido ascórbico (AA), ácido úrico (AU) e dopamina (DA).

3.2 Específicos

- Estudar o comportamento eletroquímico do sensor poli-AV/MWCNT/ECV na ausência e presença de AA, AU e DA;
- Verificar a estabilidade e repetibilidade das medidas e no preparo do sensor;
- Calcular parâmetros cinéticos na ausência de AA, AU e DA;
- Estudar o comportamento de oxidação de AV em diferentes valores de pH;
- Estudar a dependência dos sítios redox em relação ao pH do meio, na ausência de AA, AU e DA;
- Estudar o comportamento eletrocatalítico da plataforma nanoestruturada a base de poli-AV/MWCNT/ECV na detecção de AA, AU e DA;
- Investigar os mecanismos das reações eletroquímicas;
- Calcular os parâmetros cinéticos (k_{cat}) da reação entre poli-AV e AA;
- Obter uma curva analítica de detecção de AA, AU e DA sobre a plataforma poli-AV/MWCNT/ECV;
- Determinar os parâmetros analíticos tais como: LD, sensibilidade e faixa linear de resposta para a detecção de AA, AU e DA.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes

Os seguintes reagentes foram obtidos de seus respectivos fornecedores e utilizados sem tratamento prévio: ácido vanílico (4-hidroxi-3-metoxibenzóico) (AV), L-ácido ascórbico (AA), ácido úrico (AU) e dopamina (DA) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), fosfato de sódio monobásico monoidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), fosfato de sódio dibásico diidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), hidróxido de sódio (NaOH), ácido clorídrico (HCl) e ácido nítrico (HNO_3) foram obtidos da Vetec.

Nanotubos de carbono de paredes múltiplas (do inglês *multi-walled carbon nanotubes*, *MWCNT*), obtidos da Sigma, passaram por tratamento prévio com ácido nítrico (HNO_3) como será descrito na metodologia.

4.1.1 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. Além disso, nos estudos amperométricos para obtenção da curva analítica foi empregado um eletrodo de disco rotatório (EDR), com uma velocidade de rotação otimizada (100 rpm).

As medidas foram realizadas usando 5,0 mL de solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0. A eliminação de oxigênio dissolvido foi feita pelo borbulhamento de um fluxo de nitrogênio ($\text{N}_{2(g)}$) nas soluções, durante 10 minutos, antes das análises.

4.2 Preparação de solução de AV

Em um eppendorf, foram pesados 6,73 mg de ácido vanílico (0,04 mmol) e adicionado 1,0 mL de tampão fosfato pH 7,0 (40,0 mM). Esta solução foi preparada

antes das polimerizações e foi utilizada até quinze dias. Esta solução foi armazenada em temperatura ambiente.

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

Em um balão de fundo redondo de 50 mL foram pesados 50 mg de nanotubos de carbono de paredes múltiplas. A seguir adicionou-se cuidadosamente 20 mL de ácido nítrico concentrado. Deixou-se o sistema em aquecimento entre 140-150 ° C sob refluxo durante 4 horas.

Transferiu-se o meio reacional para um funil de Buchner no qual foi filtrado e lavado sucessivamente com água Milli-Q até se obter uma solução com pH 7,0 (OKPALUG et al., 2005).

4.3.1 Preparação da dispersão de MWCNT

Em um eppendorf, foi pesado 1 mg de MWCNT (obtido do tratamento com ácido nítrico) e adicionado 1,0 mL de DMF. Esta mistura ficou sob agitação no ultrassom por 2 horas para uma melhor dispersão. Esta solução foi preparada antes das análises e pôde ser utilizada durante um mês. Esta dispersão pode ser armazenada em temperatura ambiente e utilizada em outros experimentos.

4.4 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 2-3 min, em etanol, e lavado novamente com água destilada. A limpeza do eletrodo foi verificada por voltametria cíclica, utilizando uma sonda eletroquímica bem conhecida, o $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ e $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 1 mM, em KCl 0,1 M, um sistema reversível, em potenciais adequados. Em seguida, o ECV foi lavado com água Milli-Q e secado à temperatura ambiente.

4.4.1 Modificação do eletrodo de carbono vítreo com MWCNT e AV

A dispersão de MWCNT, com o auxílio de uma micropipeta, foi adicionada na superfície do eletrodo. Uma alíquota de 5,0 μL desta dispersão foi adicionada à superfície do eletrodo, em 5 frações sucessivas de 1,0 μL . Em cada adição, o DMF foi lentamente evaporado em estufa a 80°C durante 10 minutos para só então serem adicionadas as próximas frações. Para a geração da espécie eletroativa na plataforma nanoestruturada MWCNT/ECV por um processo de eletropolimerização, o eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNT foi imerso em uma solução de ácido vanílico, com concentração de 0,8 mM e realizadas 20 ciclagens na faixa de -0,5 a 1,0 V versus Ag/AgCl em 5,0 mL de tampão fosfato pH = 5,5, em velocidade de 0,050 V s^{-1} .

4.5 Emprego do poli-AV/MWCNT/ECV na análise de AA, AU E DA

O eletrodo modificado poli-AV/MWCNT/ECV foi imerso em uma solução (0,1 M) de tampão fosfato pH 7,0, sob atmosfera de nitrogênio. Em seguida, foram adicionadas alíquotas de AA, AU e DA, em diferentes concentrações e os sinais destas foram comparados com o sinal do branco (ausência dos analitos). Nestes experimentos foi selecionada uma faixa de potencial entre -0,25 a 0,50 V vs. Ag/AgCl, por voltametria cíclica no sentido anódico, a uma velocidade de varredura de 0,005 V s^{-1} .

4.6 Determinação da área ativa do EQM

A área ativa do poli-AV/MWCNT/ECV, foi calculada, utilizando-se ferricianeto de potássio como sonda eletroquímica e a equação de Randles-Sevcik (Equação 1):

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

Sendo D e C_0 o coeficiente de difusão e a concentração do ferricianeto de potássio no seio da solução, respectivamente. Experimentos de voltametria cíclica em diferentes velocidades de varredura foram realizados no poli-AV/MWCNT/ECV, em uma solução de 1 mM de $K_3[Fe(CN)_6]$ e $K_4[Fe(CN)_6]$ em KCl 0,1 M. A partir das inclinações de I_p vs. $v^{1/2}$ e utilizando $D = 7,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $n = 1$, a área ativa foi então obtida, a qual apresentou um valor de $0,147 \text{ cm}^2$. (SANTHIAGO et al., 2009; SILVA et al., 2011).

4.7 Estudo de repetibilidade no preparo do sensor

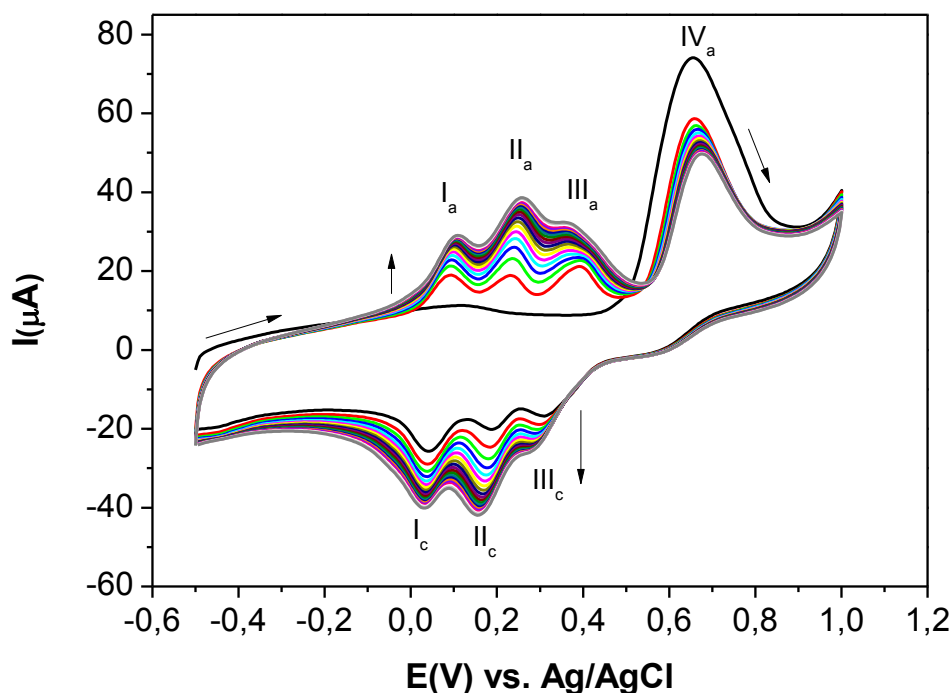
A repetibilidade no preparo do sensor foi investigada por meio da construção de 5 sensores em dias diferentes e, em seguida, o desvio padrão relativo (DPR) foi calculado para as medidas obtidas com os sensores.

5 Resultados e discussão

5.1 Preparo do eletrodo modificado

Inicialmente, o eletrodo de carbono vítreo (ECV) foi modificado, depositando-se 5 μL de uma dispersão 1 mg mL^{-1} de nanotubos de carbono (MWCNT) tratados, em DMF. Posteriormente, o AV foi eletrodepositado *in situ* sobre MWCNT/ECV, a partir de uma solução 0,8 mM, através de sucessivas varreduras de potencial com $E_{\text{inicial}} = -0,5 \text{ V}$ e $E_{\text{f}} = 1,0 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl (20 ciclos, $\nu = 0,050 \text{ V s}^{-1}$) (Figura 14). Em seguida, o poli-AV/MWCNT/ECV obtido foi lavado e imerso em uma nova solução tampão. Assim, foi possível observar a formação de sistemas redox quinônicos, a partir da oxidação irreversível do grupo funcional di-oxigenado do AV.

Figura 14- Voltamogramas cíclicos na faixa de -0,5 a 1,0 V vs. Ag/AgCl para a ativação do MWCNT/ECV com ácido vanílico a 0,8 mM, em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 5,5 e $\nu = 0,05 \text{ V s}^{-1}$.



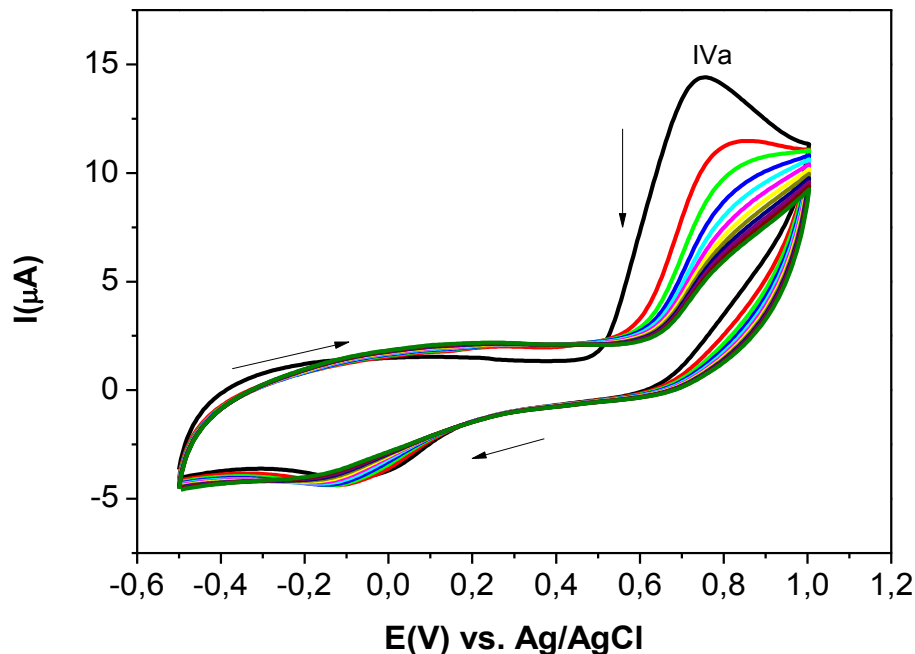
Fonte: Autor, 2013.

Na primeira varredura do voltamograma da figura 14, um pico anódico irreversível (IV_a) é observado, em 0,65 V vs. Ag/AgCl, com subsequente

aparecimento de três ondas catódicas (Ic, IIc e IIIc), em 0,03, 0,15 e 0,30 V. Na segunda e subsequentes varreduras, pôde-se observar a formação de três novas ondas anódicas (Ia, IIa e IIIa), as ondas reversas das ondas catódicas Ic, IIc e IIIc que tiveram suas correntes aumentadas nas varreduras posteriores, constituindo sistemas redox bem definidos. Os vários pares redox não desaparecem, quando o eletrodo é lavado e transferido a uma nova solução tampão livre de AV, o que indica a permanência do novo material eletrogerado na superfície.

Sem utilização de nanotubos de carbono sobre o eletrodo de carbono vítreo não se observa a formação das três espécies redox e a oxidação de IVa ocorre a 0,75 V vs. Ag/AgCl (Figura 15), e leva à conseqüente passivação do eletrodo, fato este característico de compostos fenólicos (EZERSKIS e JUSYS, 2001).

Figura 15- Voltamogramas cíclicos na faixa de -0,5 a 1,0 V vs. Ag/AgCl para a ativação do ECV com ácido vanílico a 0,8 mM, em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 5,5 e $\nu = 0,05 \text{ V s}^{-1}$.

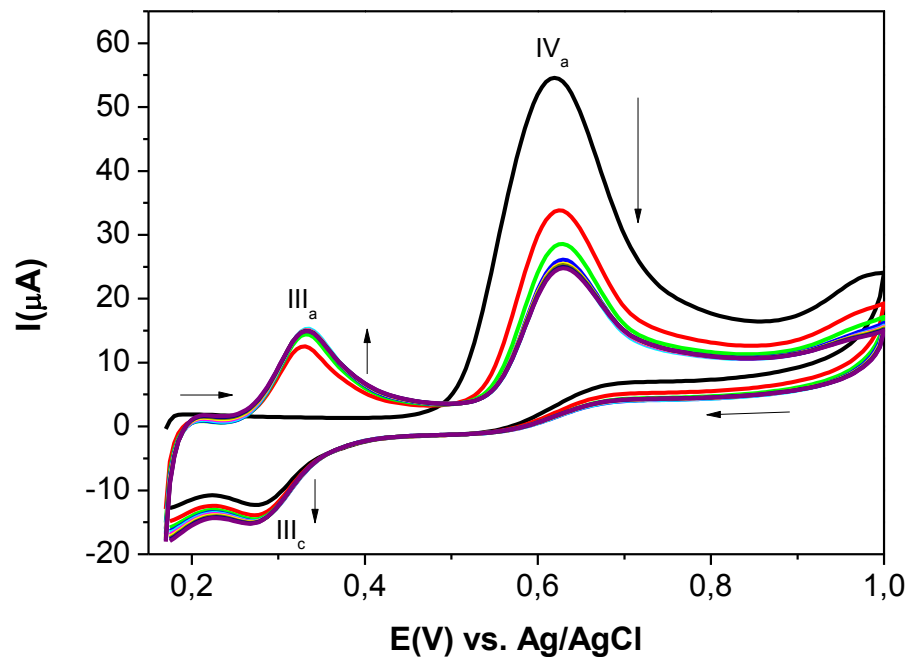


Fonte: Autor, 2013.

No intuito de otimizar o tempo de ativação *in situ* da fase sensora com polimerização de AV e MWCNT/ECV e a eficiência eletrocatalítica na presença de AA, bem como avaliar a importância das espécies eletrogeradas nas varreduras sucessivas de potencial apresentadas nos voltamogramas da Figura 14, foram selecionadas estrategicamente algumas faixas de potencial de inversão.

O primeiro corte restringiu a janela de potencial a uma faixa de 0,17 a 1,0 V vs. Ag/AgCl, como pode ser observado na Figura 16 na qual se verifica somente a formação do par redox correspondente ao sistema das ondas IIIa e IIIc, o qual pode estar relacionado a um dos três produtos eletrogerados do pico IVa. Além disso, a fase sensora apresentou resposta eletrocatalítica inferior para a detecção de AA quando comparado com a primeira faixa de potencial estudada apresentada na Figura 14, bem como uma diminuição na estabilidade do poli-AV eletrogerado *in situ* sobre a plataforma nanoestruturada MWCNT/ECV.

Figura 16- Voltamogramas cíclicos na faixa de 0,17 a 1,0 V vs. Ag/AgCl para a ativação do MWCNT/ECV com ácido vanílico a 0,8 mM, em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 5,5 e $\nu = 0,05 \text{ V s}^{-1}$.

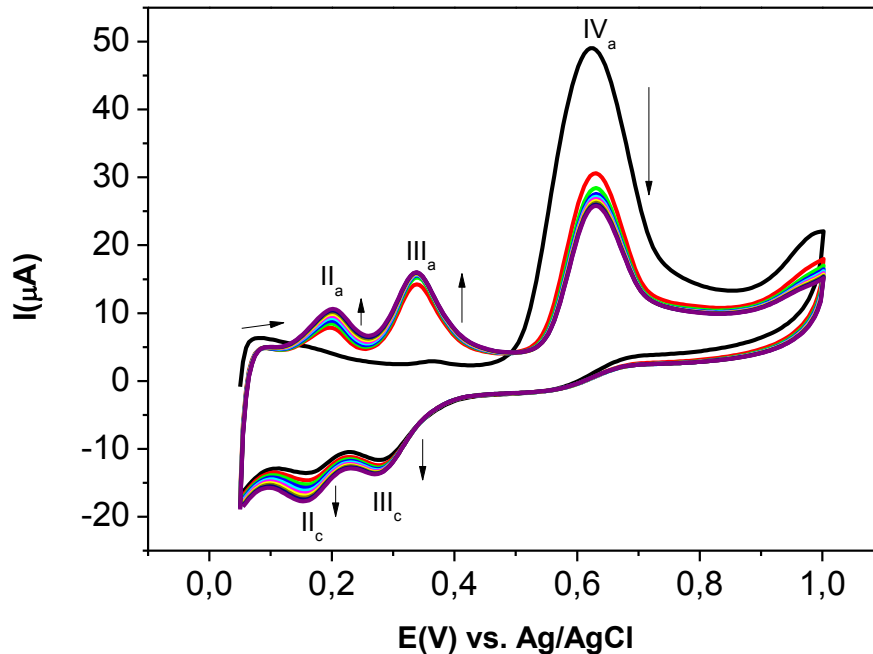


Fonte: Autor, 2013.

Após ser feita outra restrição da janela de potencial, de 0,05 a 1,0 V vs. Ag/AgCl (Figura 17), constatou-se que eram necessários os 3 pares redox, uma vez que a estabilidade também se apresentou inferior quando o MWCNT/ECV foi ativado com ácido vanílico nesta faixa de potencial. Portanto a faixa de potencial compreendida entre -0,5 e 1,0 V mostrou-se necessária para se obter uma melhor resposta na eletrocatalise de AA e uma maior separação entre os potenciais de oxidação de AA, DA e AU para a determinação simultânea destes analitos. Por essa razão, esta faixa de potencial foi selecionada para os estudos seguintes, levando em consideração a estabilidade e eficiência na resposta eletrocatalítica, e a maior separação entre os potenciais de oxidação na presença dos analitos alvos. Como podem ser observados, os processos interfaciais, neste trabalho, são muito complexos, sugerindo, a necessidade de se lançar mão de técnicas de superfície na tentativa de compreender a dinâmica dos eventos eletroquímicos, embora se reconheça que o par redox ativo na presença de AA seja o Ia/Ic.

Além disso, o par redox eletrogerado Ia/Ic, a partir da oxidação do grupo fenólico pode ser corroborado através de estudos reportados na literatura com compostos similares (SILVA, 2011; SILVA, 2012), outros sensores polimerizados com compostos fenólicos são citados na literatura, como a partir de ácido gálico (SONG et al., 2010) e ácido caféico (LI et al., 2007).

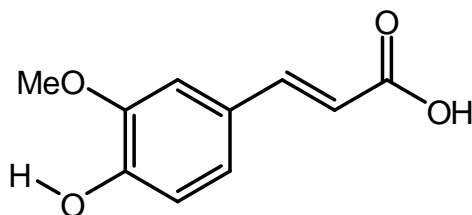
Figura 17: Voltamogramas cíclicos na faixa de 0,05 a 1,0 V vs. Ag/AgCl para a ativação do MWCNT/ECV com ácido vanílico a 0,8 mM, em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 5,5 e $\nu = 0,050 \text{ Vs}^{-1}$.



Fonte: Autor, 2013.

Um possível mecanismo para a formação dos produtos gerados a partir da oxidação do ácido vanílico é baseado no trabalho de TRABELSI e colaboradores (2005), que descreveram a oxidação do ácido ferúlico, em eletrodo de ouro. Neste trabalho, houve evidência do aparecimento de 3 novos sistemas redox, a partir da oxidação do ácido ferúlico, semelhante ao observado para o ácido vanílico. As estruturas de ácido vanílico e ácido ferúlico (Figura 18) são muito próximas e o mecanismo de oxidação de ambos também, uma vez que o sítio de oxidação é o anel aromático di-oxigenado, não havendo forte interferência da cadeia lateral.

Figura 18- Estrutura do Ácido Ferúlico.

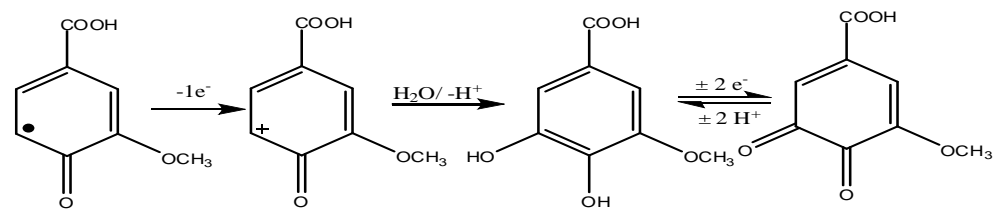
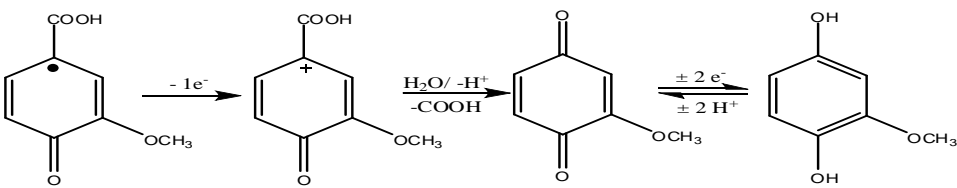
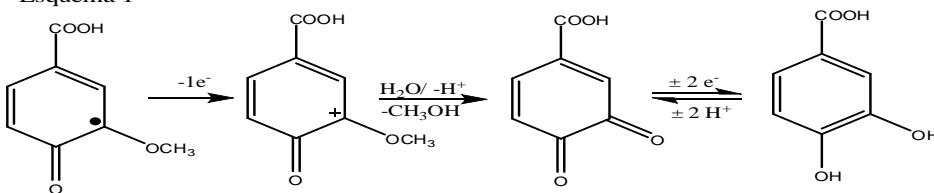
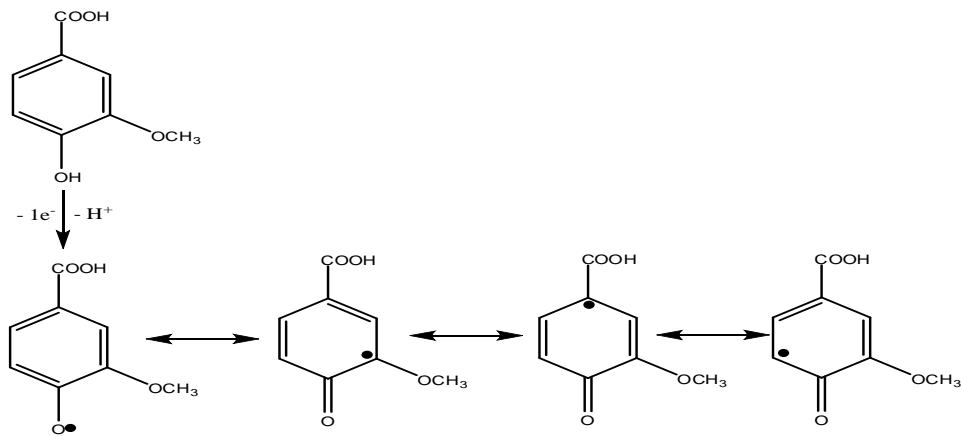


Fonte: Autor, 2013.

Na figura 19, propõe-se um mecanismo para a oxidação do AV baseado no trabalho de TRABELSI et al., (2005). No esquema 1 da Figura 19, ocorre a oxidação monoelétrica de AV com saída de 1 próton, o que leva à formação de radicais fenoxila, no qual a distribuição de carga eletrônica pode ser representada por quatro formas mesoméricas. Essa etapa relaciona-se, provavelmente, à onda IVa, em 0,65 V vs. Ag/AgCl (Figura 14), e sua irreversibilidade devido às reações químicas acopladas e geração de espécies mais estáveis nas etapas seguintes, conforme mostrado no esquema 1.

Os sistemas redox Ia/Ic, IIa/IIc e IIIa/IIIc podem ser compreendidos como formados através da oxidação monoelétrica dos radicais fenoxila, que levará à formação de carbocátions que, por sua vez, sofrerão hidrólise, levando à formação de quinonas (como apresentado nos esquemas 2, 3 e 4 da Figura 19). A reversibilidade dos sistemas redox gerados (Figura 14) pode ser explicada pela formação de *orto*- e *para*-quinonas, um dos mais importantes exemplos de pares redox em eletroquímica orgânica, por possuírem habilidade em sofrer reações redox reversíveis. A facilidade de redução pode ser explicada pela formação de sistemas aromáticos.

Figura 19- Provável mecanismo para a formação dos produtos gerados através da oxidação de AV em pH 1,0.



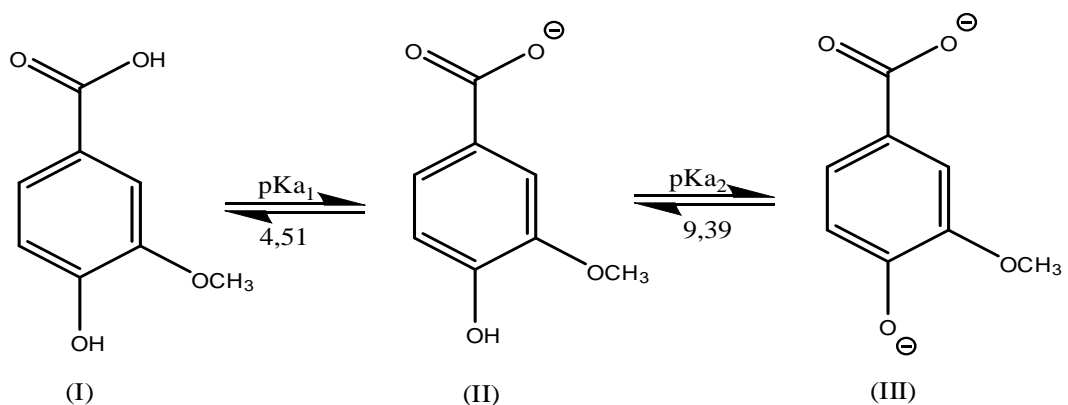
Fonte: Autor, 2013.

5.2 Comportamento Eletroquímico do Ácido Vanílico em diferentes valores de pH.

O pH influencia diretamente o comportamento eletroquímico de compostos que trazem em sua estrutura grupos ionizáveis. O pK_a ou coeficiente de ionização é uma das principais propriedades físico-químicas de moléculas capazes de alterar seu perfil farmacoterapêutico. Ele descreve a extensão da ionização de grupos funcionais, sendo este parâmetro de grande importância em algumas áreas, como o desenvolvimento de fármacos, onde o conhecimento do estado de ionização de um grupo funcional é, muitas vezes, essencial para entender as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas de novos fármacos (LIMA et al., 2001; AVDEEF et al., 1999).

Fez-se necessário verificar a influência do pH no processo de eletropolimerização do ácido vanílico no sistema MWCNT/ECV, para alcançar melhores respostas na determinação dos analitos adquirindo, desta forma, uma melhor sensibilidade e garantindo a estabilidade do sistema poli-AV/MWCNT/ECV. A Figura 20 apresenta as formas protonadas e desprotonadas referentes ao AV, dependendo do potencial hidrogeniônico do meio.

Figura 20- Ácido Vanílico em diferentes valores de pH (MOURTZINOS et al., 2009).



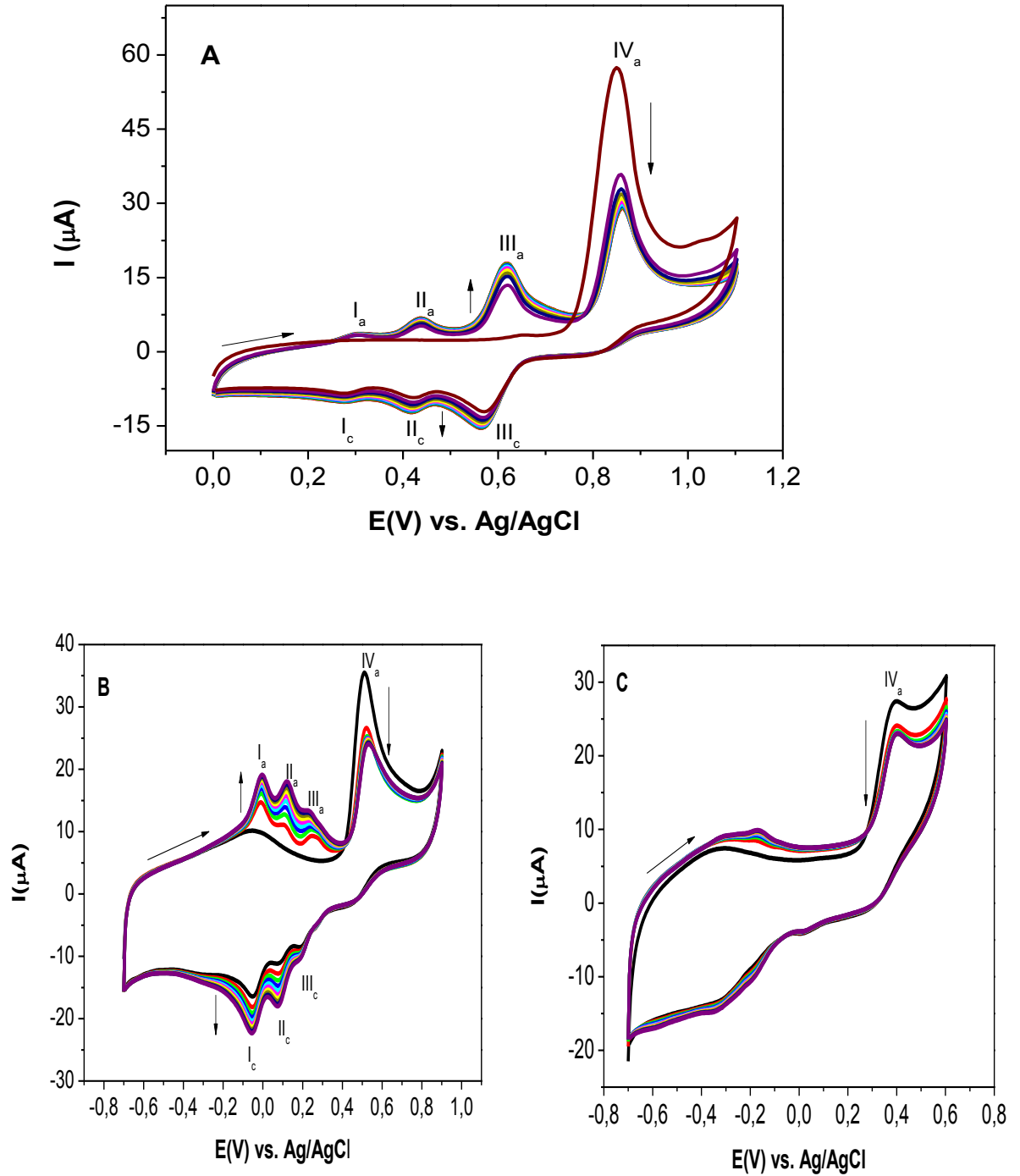
Fonte: Autor, 2013.

A figura 21 apresenta o efeito do pH no comportamento eletroquímico do ácido vanílico em eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNT. Em meios muito ácidos, AV possui o grupo carboxila associado. Com o aumento dos valores de pH, ocorre a desprotonação do grupo carboxila originando a estrutura II da Figura 20. Em meio altamente básico acima de pK_{a2} , -OH e -COOH são desprotonados (estrutura III).

Voltamogramas cíclicos mostrados na figura 21 evidenciam a ocorrência do deslocamento do primeiro potencial de oxidação de AV com o aumento dos valores de pH. O potencial necessário para oxidar AV em meio neutro ou básico é menos positivo do que em meio ácido, devido ao aumento na densidade eletrônica causada pela presença dos grupos aniônicos carboxilato e fenóxido. O grupo carboxilato diminui o efeito indutivo eletroatraente no anel aromático e o grupo fenóxido, eletrodoador, favorece a dispersão de carga no anel aromático, facilitando a geração do cátion radical para iniciar o processo de polimerização (FERREIRA et al., 2012).

As melhores respostas para a determinação simultânea de AA, DA e AU foram obtidas nas condições em que o processo de eletropolimerização ocorreu em meio ácido, sendo a melhor resposta alcançada em pH 5,5. Verifica-se que em valores de pH alcalinos não ocorre o processo de polimerização (Figura 21-C), uma vez que não se observa a formação de produtos referentes à oxidação de IV_a . Os valores referentes ao potencial de oxidação de AV em pH 1, 7 e 12 foram respectivamente 0,85; 0,51 e 0,39 V. Esses resultados estão de acordo com comportamentos registrados na eletropolimerização de compostos fenólicos (FERREIRA et al., 2012; SILVA et al., 2008). A facilidade de oxidação dos fenóis relaciona-se à maior densidade eletrônica, condição alcançada em valores de pH mais elevados.

Figura 21: Voltamogramas cíclicos para a ativação do MWCNT/ECV com ácido vanílico a 0,8 mM, em solução tampão fosfato 0,1 M, $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$ em pH (A) 1,0; (B) 7,0; (C) 12,0.



Fonte: Autor, 2013.

5.3 Oxidação Eletrocatalítica de AA, DA e AU.

A atividade eletrocatalítica do poli-AV/MWCNT/ECV foi avaliada na oxidação de AA, DA e AU. Na figura 22-A, o voltamograma cíclico representa o poli-AV/MWCNT/ECV que tem um papel como mediador redox, baseado em um sistema quinona/hidroquinona. Um exemplo de mediador que apresenta este sistema na literatura é o descrito por SILVA e colaboradores (2010), no qual foi desenvolvido um sensor a base de nanotubos de carbono e ácido xanturênico para a determinação de NADH.

Observou-se efeito eletrocatalítico na oxidação de AA, uma vez que o potencial de oxidação de AA em ECV (Figura 22-C) é em torno de 0,2 V, porém em MWCNT/ECV e poli-AV/MWCNT/ECV, o potencial de oxidação diminui para 0,0 V. Nenhum efeito eletrocatalítico foi observado na determinação de DA e AU, uma vez que seus potenciais de oxidação permaneceram praticamente inalterados nos três sistemas representados na Tabela 1.

Tabela 2- Potenciais referentes à oxidação de AA, DA e AU em diferentes plataformas obtidos por voltametria cíclica.

| | Epa(AA) | Epa(DA) | Epa(AU) |
|---------------------------|---------|---------|---------|
| ECV | 0,200 V | 0,220 V | 0,327 V |
| MWCNT/ECV | 0,0 V | 0,200 V | 0,315 V |
| Poli-AV/ MWCNT/ECV | 0,0 V | 0,200 V | 0,315 V |

Fonte: Autor, 2013.

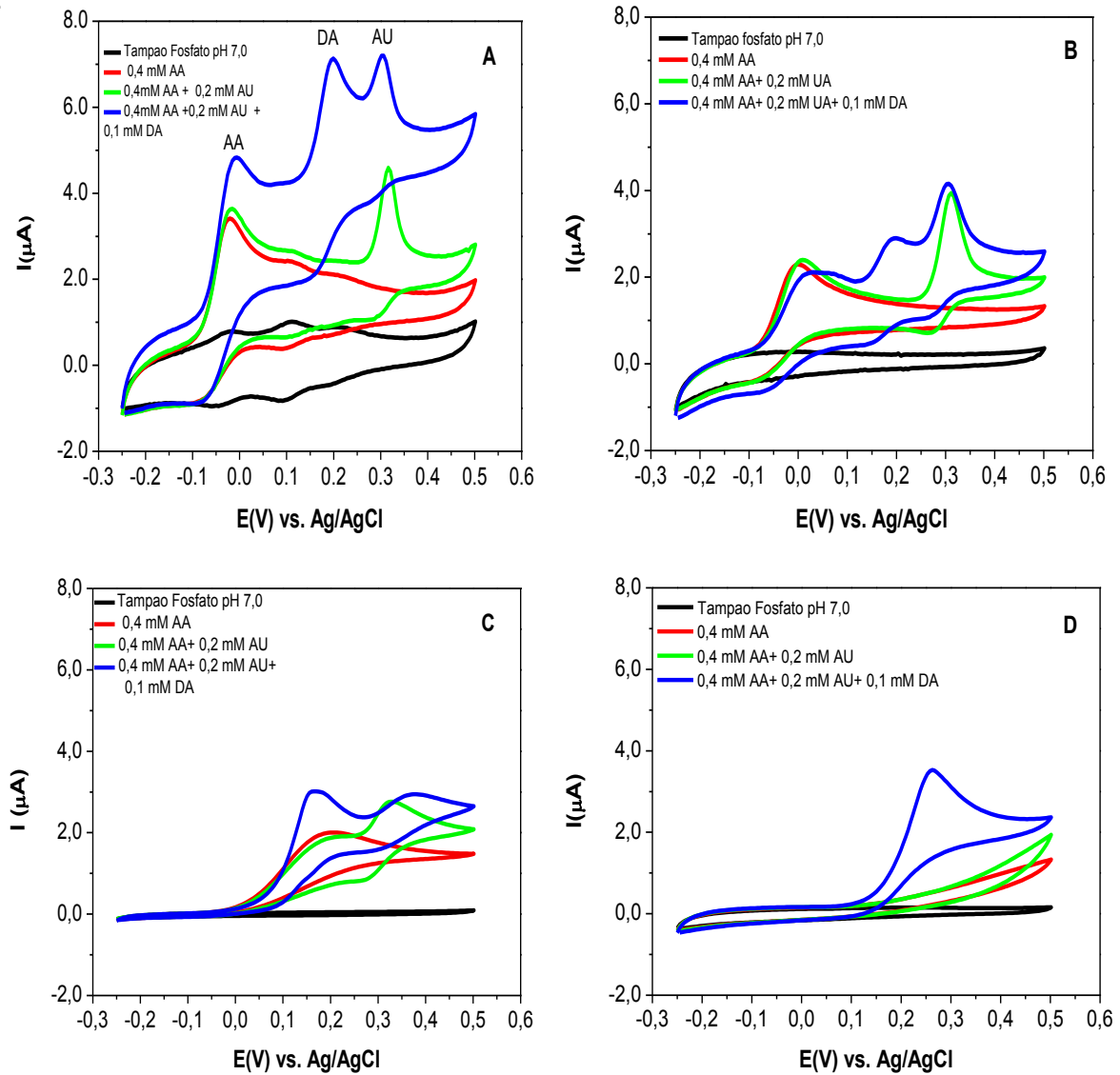
Quando uma solução de AA é adicionada, a corrente de oxidação, $E_{paAA} = 0,00 \text{ V vs Ag/AgCl}$ aumenta significativamente com o desaparecimento concomitante do pico de redução (Figura 22-A). Para confirmar a atividade catalítica do eletrodo modificado para a oxidação de AA, soluções de AA e AU foram adicionadas simultaneamente. A análise da figura 22-A permite sugerir a natureza catalítica da oxidação de AA, sem qualquer efeito sobre a oxidação de DA e AU. Além disso, a diferença entre os dois potenciais de pico de AA e DA está próxima de 200 mV vs

Ag/AgCl, e a de DA e AU em torno de 115 mV vs Ag/AgCl, suficientes para permitir a determinação simultânea e seletiva destes 3 analitos.

Em ECV, onde os potenciais de picos de oxidação AA, DA e AU são muito próximos (Tabela 1), é praticamente impossível analisar a contribuição de cada composto na mistura (Figura 22-C). No entanto, na Figura 22-B, com ECV modificado com nanotubos de carbono apenas (MWCNT/ECV), $E_{pa_{AA}}$, $E_{pa_{DA}}$ e $E_{pa_{AU}}$ estão separados. Entretanto, o eletrodo modificado com nanotubos de carbono e ácido vanílico apresentou maior reprodutibilidade e melhor resposta quando comparados com ECV e MWCNT/ECV. Na figura 22-D não se observam picos referentes à oxidação de AA e AU, ocorrendo somente para DA com a utilização de poli-AV/ECV, isso deve-se provavelmente a passivação de ECV com o poli-AV aniônico em pH 7,0.

Este resultado mostra um efeito sinérgico entre os nanotubos de carbono e a superfície modificada com polímero de AV para a oxidação catalítica de AA e determinação simultânea de AA, DA e AU. Este comportamento pode ser explicado por uma taxa mais rápida de transferência de elétrons na superfície quimicamente modificada.

Figura 22- Voltamogramas Cíclicos de (A) poli-AV/MWCNT/ECV, (B) MWCNT/ECV, (C) ECV e (D) poli-AV/ECV, em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, $\nu= 0,005 \text{ Vs}^{-1}$, na presença de AA, DA e AU.



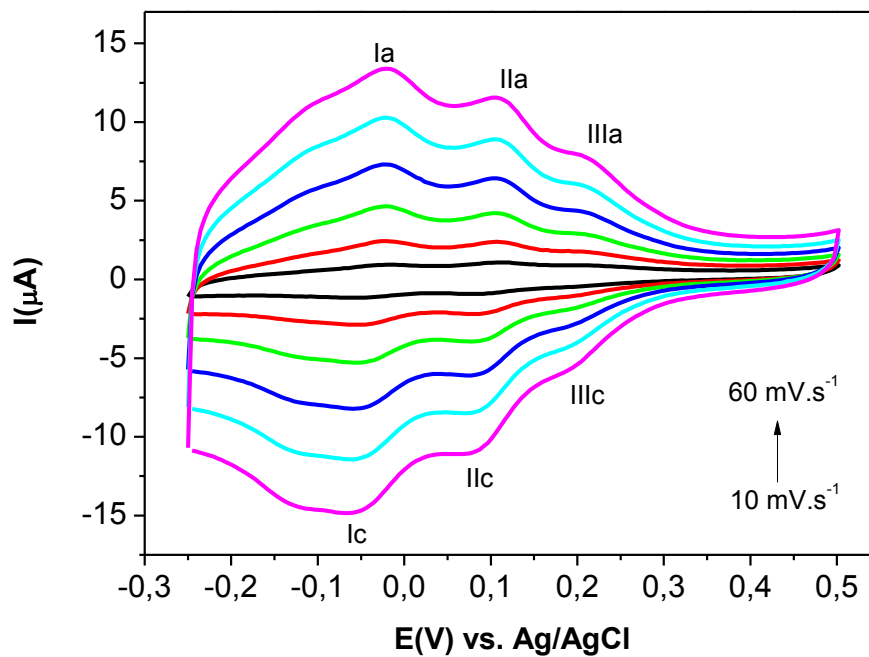
Fonte: Autor, 2013.

5.4 Características Cinéticas do poli-AV/MWCNT/ECV

O sucesso do processo eletrocatalítico frente à detecção de AA, DA e AU depende primariamente da eficiência do mediador eletrodepositado na plataforma nanoestruturada.

Para isto, após o processo de polimerização *in situ*, a faixa de potencial do par redox foi selecionada, e usando a voltametria cíclica, as características cinéticas do poli-AV/MWCNT/ECV foram estudadas, como pode ser observado na Figura 23.

Figura 23- Voltamogramas cíclicos em poli-AV/MWCNT/ECV em solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 em diferentes velocidades de varredura ($0,01 - 0,06 \text{ V s}^{-1}$), $E_{\text{inicial}} = -0,25 \text{ V}$ e $E_{\lambda} = 0,5 \text{ V}$, varredura no sentido anódico.

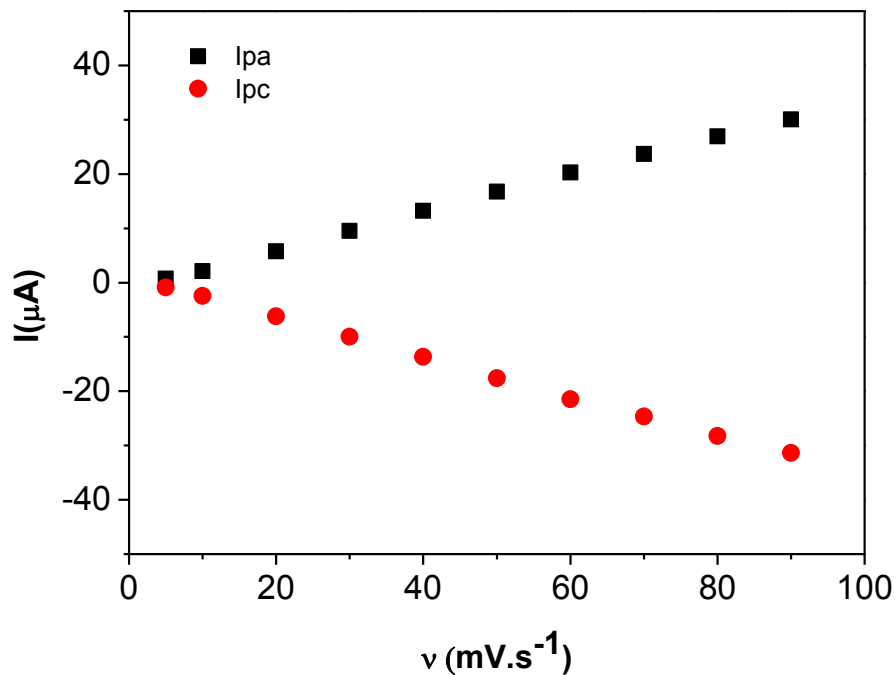


Fonte: Autor, 2013.

Os voltamogramas cíclicos representativos obtidos para o poli-AV/MWCNT/ECV são mostrados na Figura 23, para várias velocidades de varredura de potencial ($0,01 - 0,06 \text{ V s}^{-1}$). A observação de picos voltamétricos persistentes e bem definidos indica que o processo redox do par (quinona/hidroquinona) exhibe

características de espécies confinadas na plataforma nanoestruturada à base de nanotubos de carbono, o que pode ser confirmado com a correlação linear entre as correntes de pico correspondentes a I_{pa} / I_{pc} e a velocidade de varredura (Figura 24).

Figura 24- Dependência da corrente de pico anódico (I_{pa}) e catódico (I_{pc}), em função da velocidade de varredura em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0.



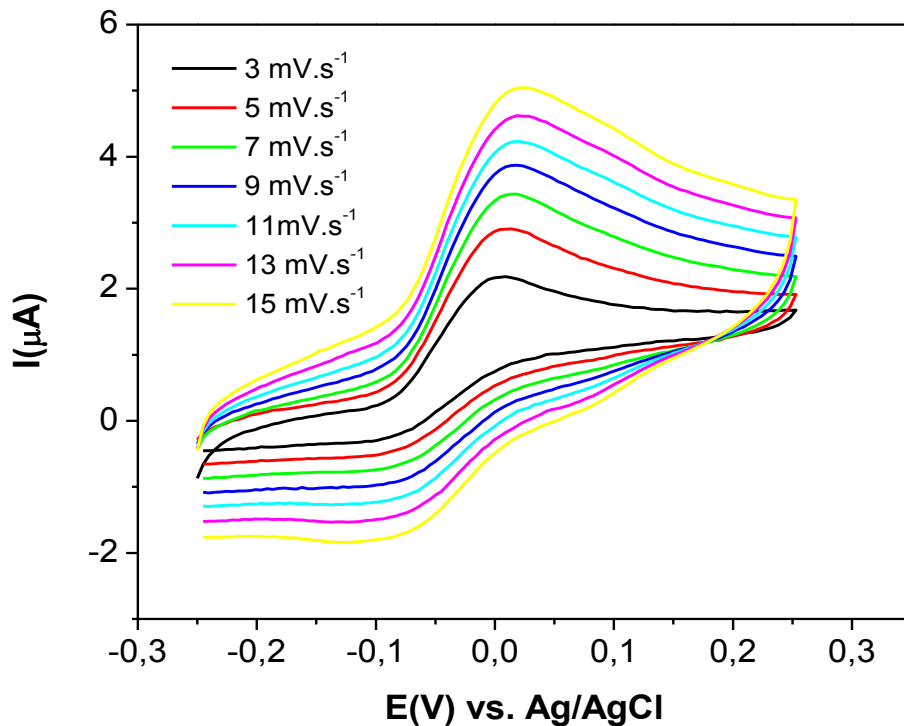
Fonte: Autor, 2013.

Após o processo de polimerização *in situ* do ácido vanílico, a estabilidade do par redox (poli-AV/MWCNT/ECV) foi checada por meio de voltamogramas cíclicos sucessivos. A variação da corrente de pico, depois de estabilizada, foi avaliada, com o desvio padrão relativo (DPR) como observado em vários trabalhos (LIMA et al., 2008, LIMA et al., 2009, SANTHIAGO et al., 2009). Assim, após 50 ciclos foi observado um DPR menor do que 5%, ou seja, nenhuma mudança significativa foi observada nas respostas voltamétricas, sugerindo uma excelente estabilidade da plataforma nanoestruturada à base de MWCNT e poli-AV.

De maneira a verificar a atividade eletrocatalítica do par redox (quinona/hidroquinona) na presença de AA, alguns experimentos foram realizados.

Após a adição de AA à solução, o pico referente à oxidação de AA (I_a) aumenta gradualmente de forma significativa como foi visto na Figura 22-A, com o aumento da velocidade de varredura ocorre também o aumento da corrente de pico de oxidação de AA, assim como o deslocamento do potencial de oxidação com aumento da velocidade de varredura (Figura 25).

Figura 25- Voltamogramas cíclicos de poli-AV/MWCNT/ECV em várias velocidades de varredura em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0 na presença de 0,4 mM AA.

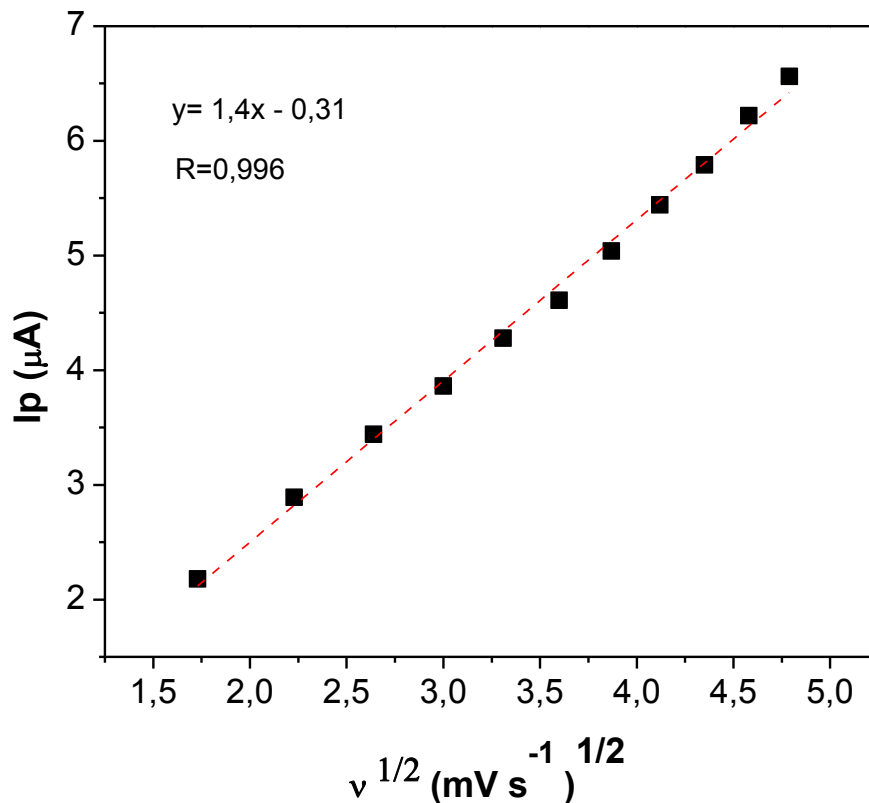


Fonte: Autor, 2013.

Com o aumento da velocidade de varredura, o pico de oxidação catalítico desloca gradualmente para potenciais mais positivos, sugerindo uma limitação cinética na reação entre os grupos eletroativos e AA. Por outro lado, um gráfico da corrente catalítica I_{pa} versus a raiz quadrada da velocidade de varredura de

potencial ($v^{1/2}$) na faixa de velocidade de 0,003 a 0,023 $V s^{-1}$ foi construído e resultou numa dependência linear (Figura 26).

Figura 26- Variação da corrente de pico anódica I_{pa} vs. $v^{1/2}$ no poli-AV/MWCNT/ECV, em solução contendo 0,4 mM de AA. Medidas realizadas em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0 e v : 0,003-0,023 $V s^{-1}$.



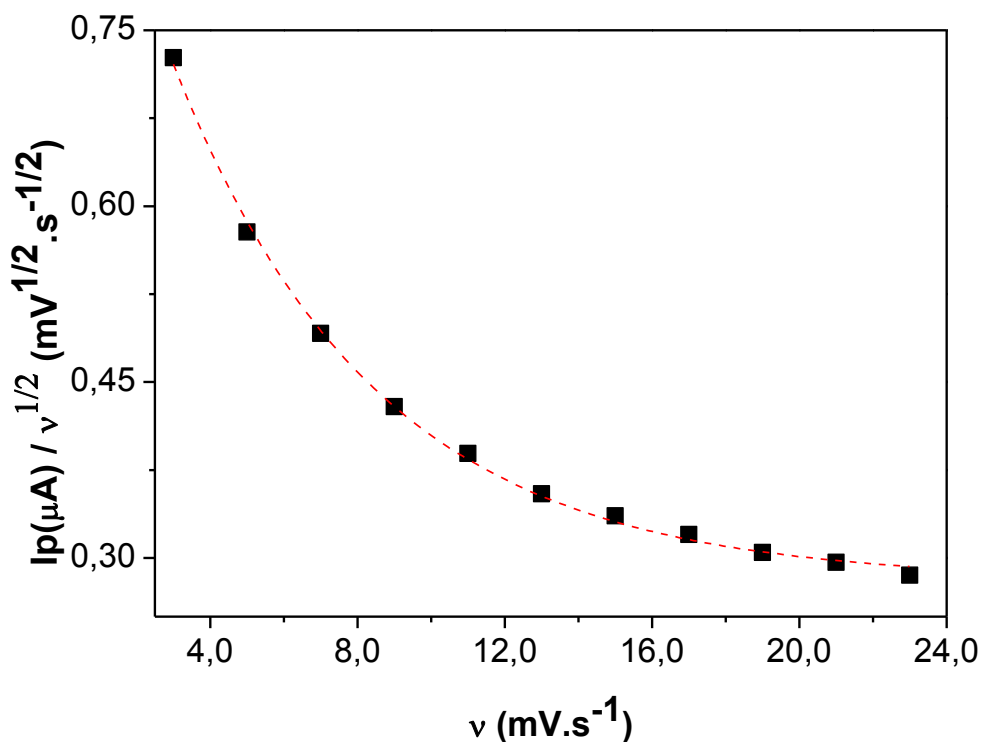
Fonte: Autor, 2013.

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 AA e o poli-AV/MWCNT/ECV de fato apresenta uma etapa química acoplada, foram realizados alguns ensaios neste sentido, o qual através do gráfico da corrente de pico normalizada com a raiz quadrada da velocidade de varredura ($I_{pa}/v^{1/2}$) versus v

(Figura 27) é possível observar um perfil característico de um processo eletroquímico-químico catalítico (EC_{cat}) (BARD e FAULKNER, 2001).

Figura 27- Variação da corrente de pico anódica normalizada $I_p/v^{1/2}$ vs. v no poli-AV/MWCNT/ECV em solução contendo 0,4 mM de AA. Medidas realizadas em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0 e v : 0,003-0,023 $V s^{-1}$.

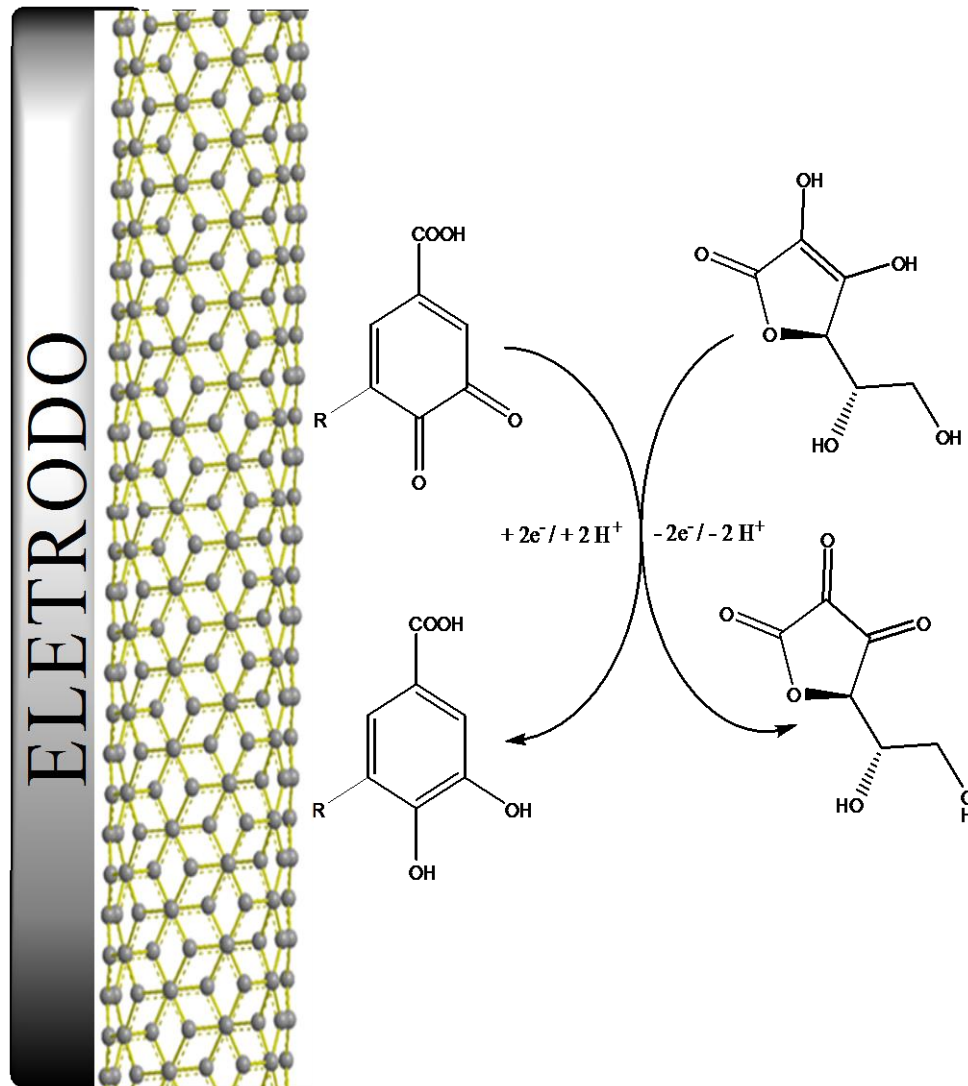


Fonte: Autor, 2013.

Os substituintes hidroxila e metoxila no ácido vanílico podem ser oxidados, formando a respectiva quinona que, na varredura reversa, pode ser reduzida novamente à hidroquinona por um processo de dois elétrons e dois prótons. Assim, o ciclo catalítico para a oxidação electrocatalítica de AA (Figura 28) envolve o par redox (quinona/hidroquinona), semelhante ao sistema bem conhecido e reportado na literatura (SILVA et al., 2010) e o que foi apresentado na dissertação de SILVA, (2011) para detecção de NADH. O autor descreve a formação de polímero à base de ácido ferúlico em nanotubos de carbono como mediador, sugerindo a formação de uma *orto*-quinona gerada pela oxidação dos substituintes hidroxila e metoxila.

Em geral, o grupo eletrogerado - quinona, é hábil para se submeter a um processo de transferência de elétron-próton-elétron sequencial ou a uma transferência de hidreto (CARLSON e MILLER, 1985).

Figura 28- Modelo simplificado do mecanismo proposto para o processo de eletrocatalise do AA sobre a plataforma poli-AV/MWCNT/ECV.



Fonte: Autor, 2013.

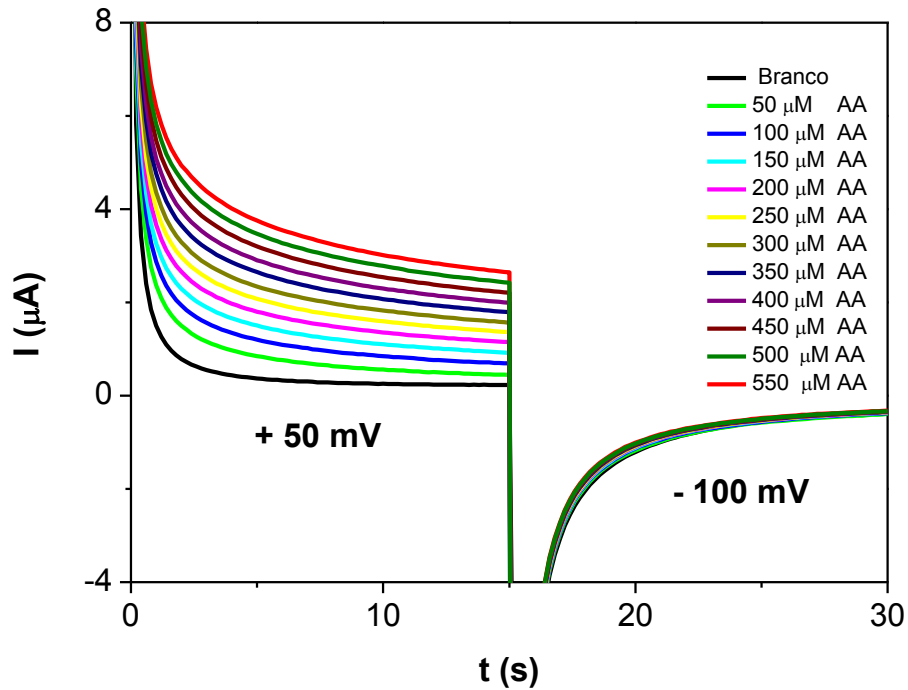
5.5 Estudos Cronoamperométricos

Para a avaliação quantitativa do comportamento eletrocatalítico da oxidação de AA frente ao poli-AV/MWCNT/ECV, no intuito de obter alguns parâmetros cinéticos foi empregada a cronoamperometria de duplo salto de potencial. A Figura 29 mostra as curvas de corrente *versus* tempo, obtidos com poli-AV/MWCNT/ECV, $E_{\text{inicial}} = +0,050 \text{ V}$ e $E_{\text{final}} = -0,100 \text{ V}$ *versus* Ag/AgCl para várias concentrações de AA, em tampão fosfato 0,1 M e pH 7,0. Como pode ser verificado, não há corrente catódica líquida correspondente à redução do mediador, na presença de AA.

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.

Assim sendo, os cronoamperogramas de duplo salto de potencial direto e reverso para o mediador na ausência de AA, mostraram-se simétricos com um consumo de carga igual para redução e oxidação do sistema redox eletrogerado na superfície do poli-AV/MWCNT/ECV. Por outro lado, na presença de diferentes concentrações de AA, os valores da corrente anódica associada aos amperogramas diretos são significativamente maiores do que aqueles observados para o processo reverso (Figura 29).

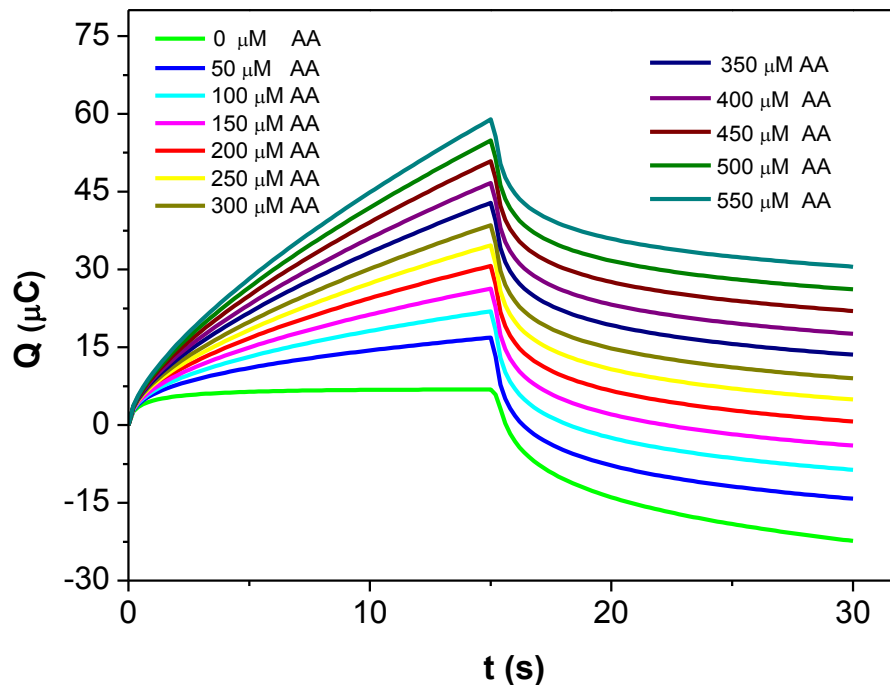
Figura 29- Cronoamperogramas obtidos no poli-AV/MWCNT/ECV em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, na ausência e presença de AA, $E_{\text{inicial}} = +0,050 \text{ V}$ e $E_{\text{final}} = -0,100 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl, respectivamente.



Fonte, Autor, 2013.

A partir da integração dos cronoamperogramas, é possível visualizar melhor a carga, tanto do processo catódico, quanto do anódico. Nestes, há um aumento significativo da carga do referido processo anódico e uma diminuição no processo catódico (Figura 30), indicando, portanto, que o grupo quinona está sendo consumido pela etapa química acoplada como observado na Figura 29.

Figura 30-Integração dos cronoamperogramas obtidos no poliAV/MWCNT/ECV, em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, $E_{inicial} = +0,050$ V e $E_{final} = -0,100$ V vs. Ag/AgCl, respectivamente.



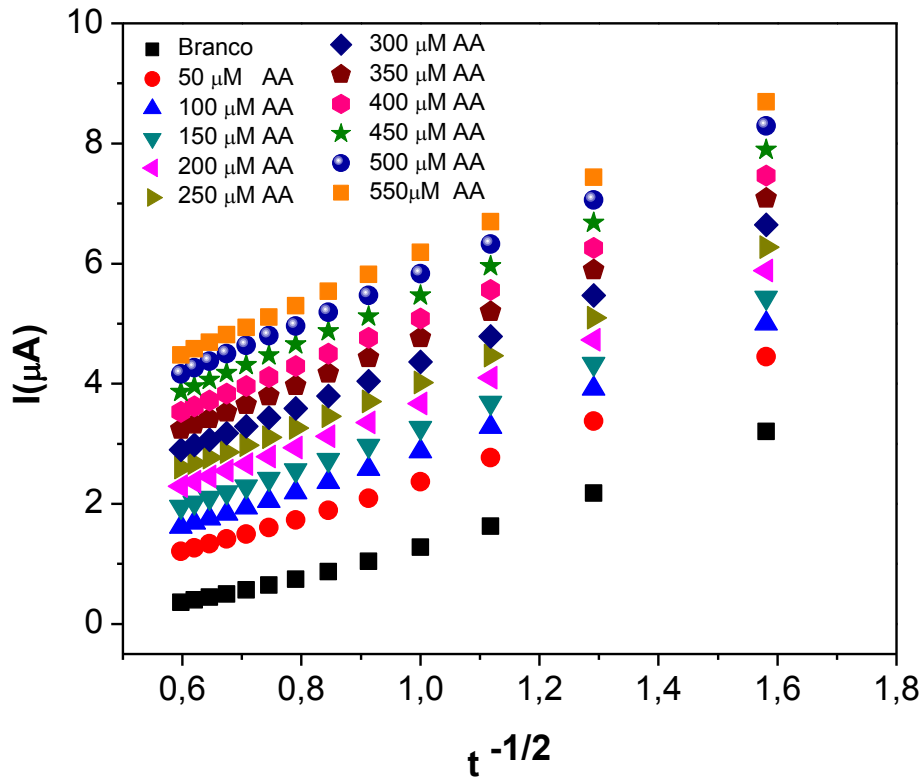
Fonte: Autor, 2013.

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

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

Sendo D_{AA} e C_0 o coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$) e a concentração de AA no seio da solução (mol cm^{-3}), respectivamente. A Figura 31 mostra os gráficos de I versus $t^{1/2}$ com o melhor ajuste linear para diferentes concentrações de AA, o qual indica que a corrente observada deve ser controlada pela difusão de AA em solução.

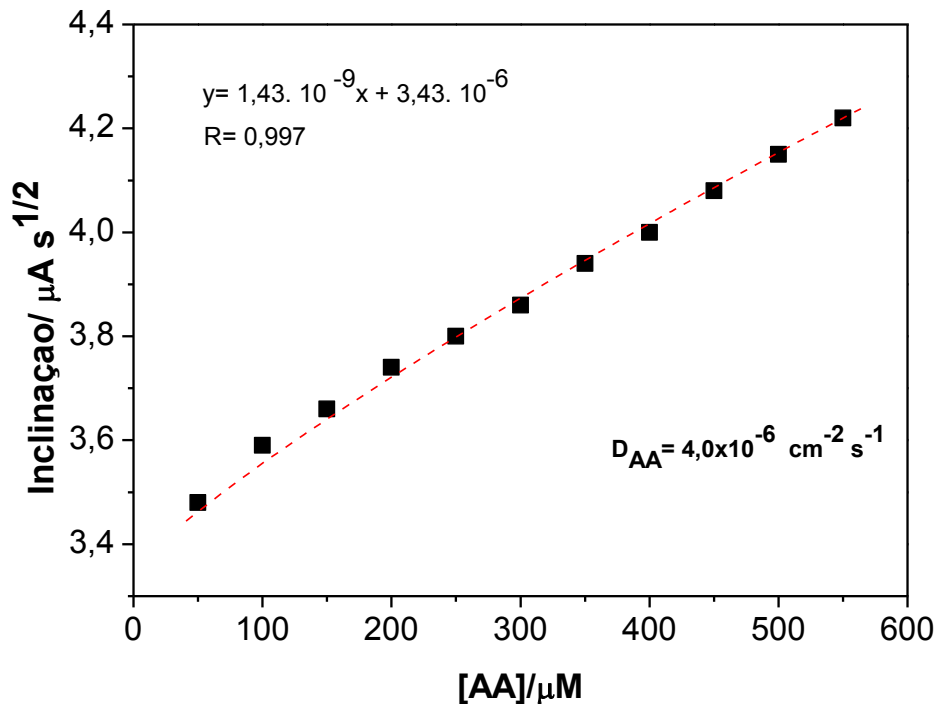
Figura 31- Gráfico de I vs. $t^{-1/2}$ obtidos a partir dos cronoamperogramas da Figura 29 em poli-AV/MWCNT/ECV em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, na ausência e presença de AA, $E_{inicial} = +0,050$ V e $E_{final} = -0,100$ V vs. Ag/AgCl, respectivamente.



Fonte: Autor, 2013.

Um gráfico a partir das inclinações obtidas das linhas retas *versus* a concentração de AA foi construído (Figura 32). A partir da inclinação da Figura 31 e usando a Equação de Cottrell (Equação 2), um coeficiente de difusão de $4,0 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ foi obtido para a faixa de concentração de 50 μM a 550 μM de AA. Este valor está próximo aos valores registrados na literatura (LIMA, 2009; SILVA et al., 2012).

Figura 32- Gráfico de inclinação ($I/t^{1/2}$) versus a concentração de AA obtidos a partir da Figura 30 do poli-AV/MWCNT/ECV, em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7, na ausência e presença de AA, $E_{\text{inicial}} = +0,050$ V e $E_{\text{final}} = -0,100$ V vs. Ag/AgCl, respectivamente.



Fonte: Autor, 2013.

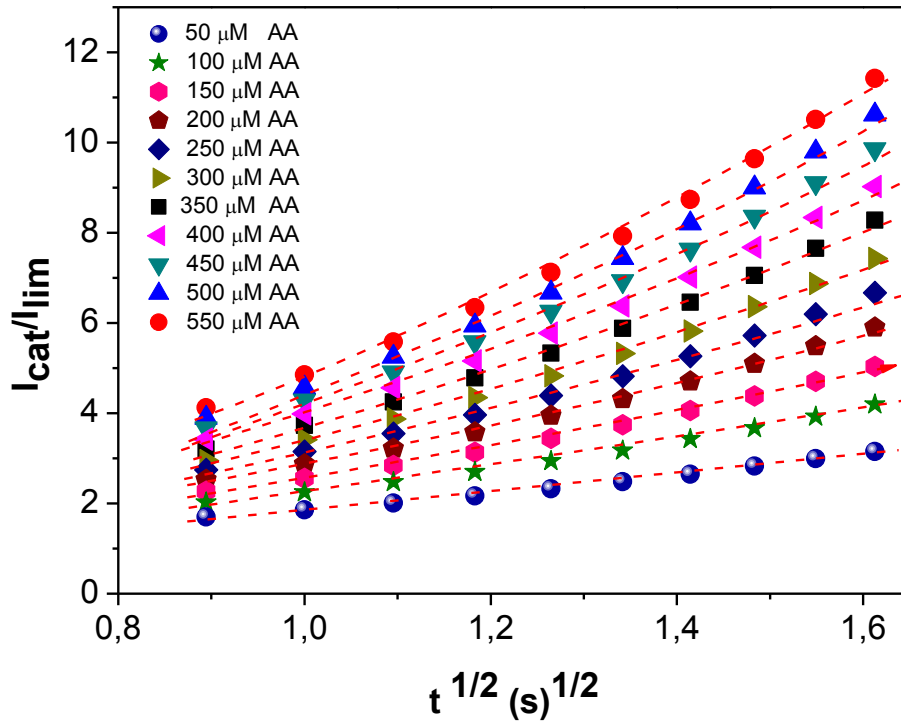
Além disso, a constante de velocidade, k_{cat} , para a reação química entre o AA e os sítios redox confinados na superfície do eletrodo modificado pode ser avaliada, este cálculo foi possível através da cronoamperometria com base no método descrito na literatura (GALUS, 1976; LIMA et al., 2008, SANTHIAGO et al., 2009; SILVA et al., 2010).

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

A partir das inclinações do gráfico $I_{\text{cat}}/I_{\text{Lim}}$ versus $t^{1/2}$ (Figura 33), foi possível obter o gráfico da Figura 34 (inclinações vs. [AA]). Assim, usando o novo coeficiente angular da Figura 34 e a Equação 3, determinou-se de forma simples, o valor de

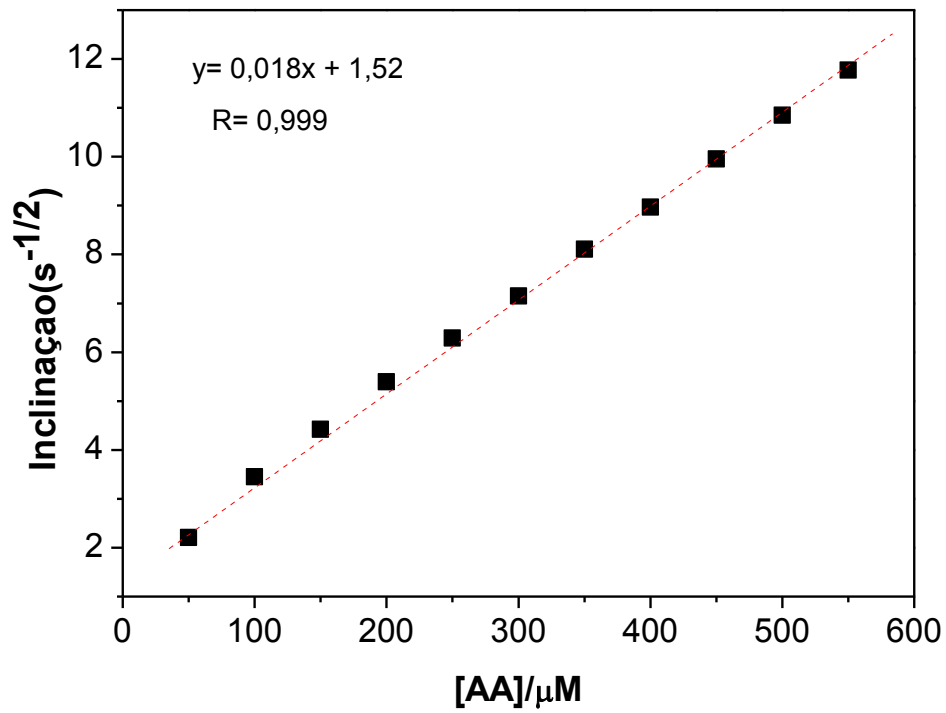
k_{cat} , o qual apresentou um valor calculado na faixa de concentração estudada de $3,75 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Figura 33-Dependência de I_{cat}/I_{lim} vs. $t^{1/2}$ derivado dos cronoamperogramas da Figura 29 em poli-AV/MWCNT/ECV, em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, na ausência e presença de AA, $E_{inicial} = +0,050 \text{ V}$ e $E_{final} = -0,100 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl, respectivamente.



Fonte: Autor, 2013.

Figura 34- Gráfico da inclinação de I_{cat}/I_{Lim} vs. concentração de AA em poli-AV/MWCNT/ECVECV, em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0 na ausência e presença de AA, $E_{inicial} = +0,050$ V e $E_{final} = -0,100$ V vs. Ag/AgCl, respectivamente.



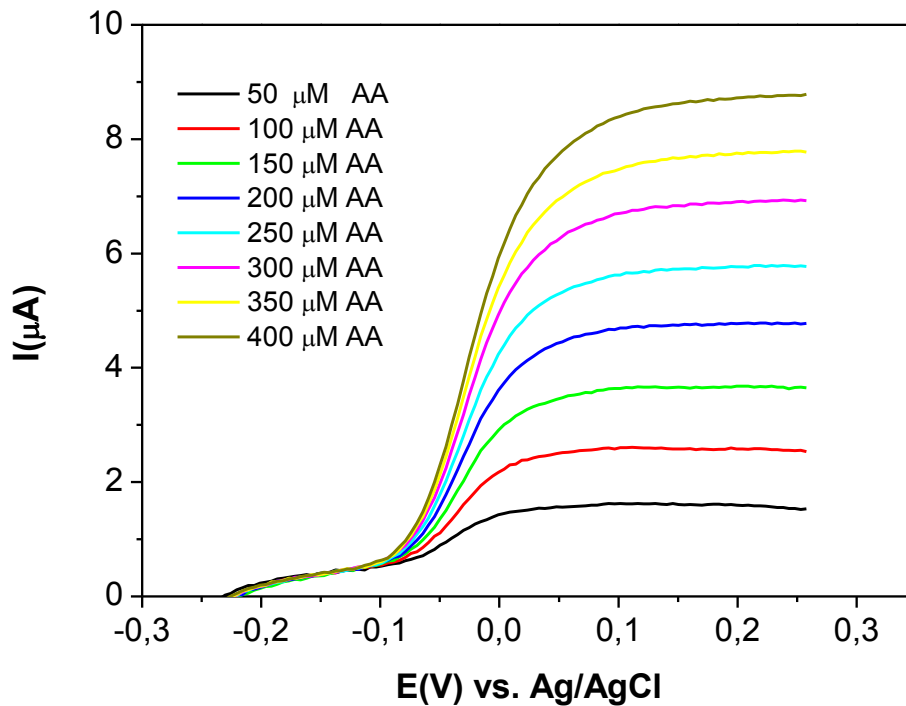
Fonte: Autor, 2013.

5.6 Estudos com Eletrodo de Disco Rotatório

Para uma melhor avaliação quantitativa do comportamento electrocatalítico da oxidação de AA frente a poli-AV/MWCNT/ECV, medidas cinéticas foram realizadas em diferentes concentrações de AA, a diversas velocidades de rotação ω (rad s^{-1}).

Estes experimentos foram realizados em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0) e uma velocidade de varredura fixa de 5 mV s^{-1} (Figura 35).

Figura 35- Voltamogramas lineares realizados em disco rotatório para oxidação de AA em várias concentrações em poli-AV/MWCNT/ECV em solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, $v = 0,005 \text{ V s}^{-1}$ e $\omega = 10,47 \text{ rad s}^{-1}$.



Fonte: Autor, 2013.

O processo catalítico é resultado da difusão do AA para a superfície eletródica, onde ocorre a redução do mediador oxidado para formar AA oxidado e a forma reduzida do mediador.

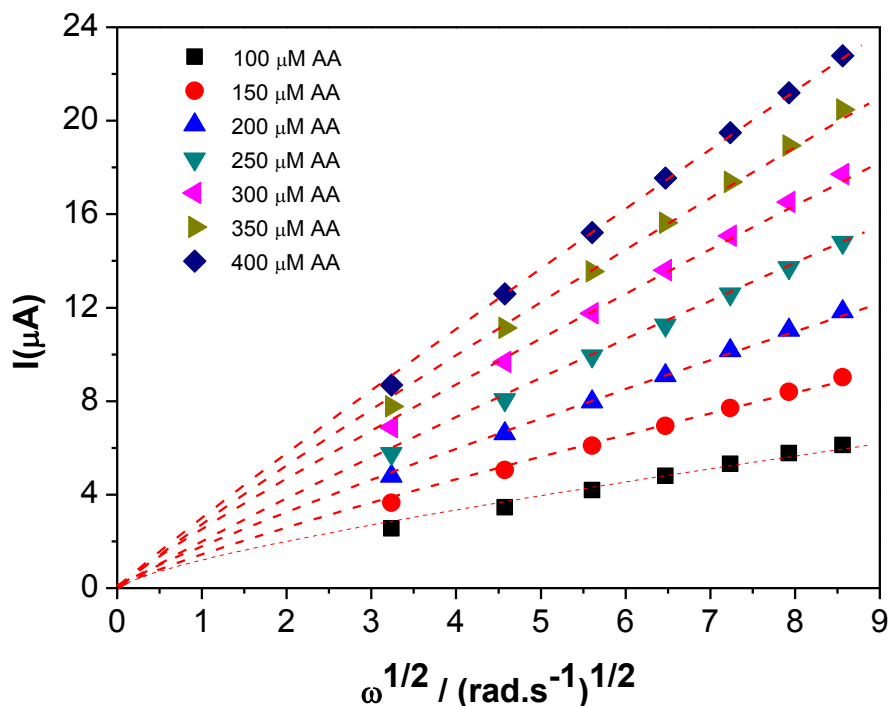
Experimentos foram então realizados com o objetivo de estudar o mecanismo da reação, bem como para avaliar a constante catalítica do referido processo

eletrocatalítico. A Figura 36 mostra os gráficos de Levich obtidos para o poli-AV/MWCNT/ECV para diferentes concentrações de AA em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,0). A corrente de oxidação para AA, no eletrodo modificado, pode ser limitada pelo transporte de massa do AA para a superfície do eletrodo e/ou pela cinética da reação. A partir da Figura 35, 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 AA no seio da solução [AA], de acordo com a equação de Levich (BARD e FAULKNER, 2001) (Equação 4):

$$I_{d(L)} = 0,620nFA[AA]D^{2/3}\nu^{-1/6}\omega^{1/2} \text{ (Equação 4)}$$

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 $4,49 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (MOIROUX e ELVING, 1980) e $0,01 \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (BARD e FAULKNER, 2001), respectivamente foram empregados.

Figura 36- Gráfico de Levich para a resposta eletrocatalítica de estado-estacionário para um EDR de poli-AV/MWCNT/ECV, em diferentes [AA]. Estudos realizados em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,0 e $\Gamma = 4,37 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$.



Fonte: Autor, 2013.

Para uma reação catalisada, a corrente limitada cineticamente (I_{kin}) é dada geralmente pela seguinte expressão (Equação 5):

$$I_{kin} = nFAk_{cat}\Gamma[AA]D^{2/3}\nu^{-1/6}\omega^{1/2} \text{ (Equação 5)}$$

Sendo $\Gamma = 4,37 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$ a cobertura total do poli-AV, que pôde ser obtida através da equação 6, onde Q é a carga obtida através da integração da onda anódica a $0,050 \text{ V s}^{-1}$, n é o número de elétrons envolvidos na transferência de carga por molécula, sendo igual a 2, e A corresponde a área geométrica do eletrodo modificado.

$$\Gamma = \frac{Q}{nFA} \text{ (Equação 6)}$$

Uma dependência linear da corrente catalítica na $\omega^{1/2}$ é esperada a partir da equação de Levich (Equação 4). 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 7):

$$I^{-1} = I_{d(L)}^{-1} + I_{kin}^{-1} \text{ (Equação 7)}$$

Fazendo a inversão das equações 5 e 4, tem-se a conhecida Equação 8 de Koutecky-Levich, muito utilizada em reações catalíticas empregando eletrodos contendo mediadores para transferência de elétrons (MURRAY, 1984).

$$\frac{1}{I} = \frac{1}{nFAk_{cat}\Gamma[AA]} + \frac{1}{0,620nFA\nu^{-1/6}D^{2/3}[AA]\omega^{1/2}} \text{ (Equação 8)}$$

Através do gráfico (Figura 37) e da equação de Koutecky-Levich é possível também avaliar o k_{cat} , conhecendo-se então o valor de Γ . O valor de k_{cat} obtido foi $3,75 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, ou seja, o mesmo valor obtido nos experimentos cronoamperométricos. A Tabela 3 lista alguns trabalhos registrados na literatura envolvendo eletrodos modificados com vários mediadores, bem como seus valores de k_{cat} para fins de comparação com o valor obtido neste trabalho. Observa-se que o valor de k_{cat} obtido é maior quando comparado aos valores apresentados previamente para os sistemas eletrodo-mediador, exceto para os trabalhos de SILVA (2012), LIMA (2009), KARIM-NEZHAD (2009) e seus colaboradores.

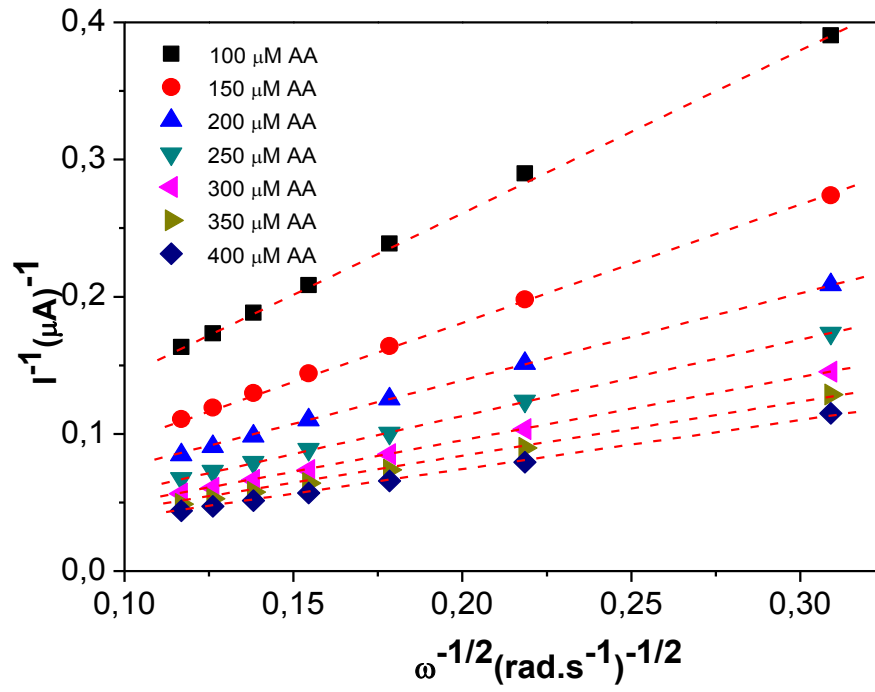
Tabela 3- Comparação dos valores de k_{cat} entre eletrodos modificados.

| Eletrodo | Modificador | $k_{cat} (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$ | Referência |
|-------------------------|--|---|-----------------------------------|
| ECV | Poli-AX | $2,3 \times 10^6$ | SILVA <i>et al.</i> , 2012 |
| ECV | Polipirrol/Ferrocianeto | $4,7 \times 10^3$ | RAOOF <i>et al.</i> , 2004 |
| Pt | Polipirrol/Naftol Verde B | $4,4 \times 10^3$ | ALIREZA e MOHAMMAD, 2007 |
| Pasta de Carbono | 4-Nitroftalonitrila | $6,0 \times 10^6$ | LIMA <i>et al.</i> , 2009 |
| EGP | Benzoquinona | $3,2 \times 10^7$ | MURTHY e SHARMA, 1998 |
| ECV | Hidróxido de Cobalto | $2,36 \times 10^6$ | KARIM-NEZHAD <i>et al.</i> , 2009 |
| ECC | Hexacianoferrato de Térbio | $3,0 \times 10^3$ | SHENG <i>et al.</i> , 2007 |
| Pasta de Carbono | AC/TiO ₂ /Sb ₂ O ₅ / <i>p</i> -Benzoquinona | $2,0 \times 10^4$ | ROCHA <i>et al.</i> , 2012 |
| ECV | Poli-AV/MWCNT | $3,75 \times 10^5$ | Este trabalho |

EGP: eletrodo de grafite pirolítico; ECC: eletrodo de carbono cerâmico; ECV: eletrodo de carbono vítreo; Poli-AX: polímero ácido xanturênico; AC: Acetato de celulose

Fonte: Autor, 2013.

Figura 37-Gráficos de Koutecky-Levich dos dados experimentais mostrados na Figura 35. Estudos realizados em tampão fosfato 0,1 M em pH 7,0 e $\Gamma = 4,37 \times 10^{-9} \text{ mol cm}^{-2}$.



Fonte: Autor, 2013.

5.7 Detecção amperométrica de AA, AU e DA

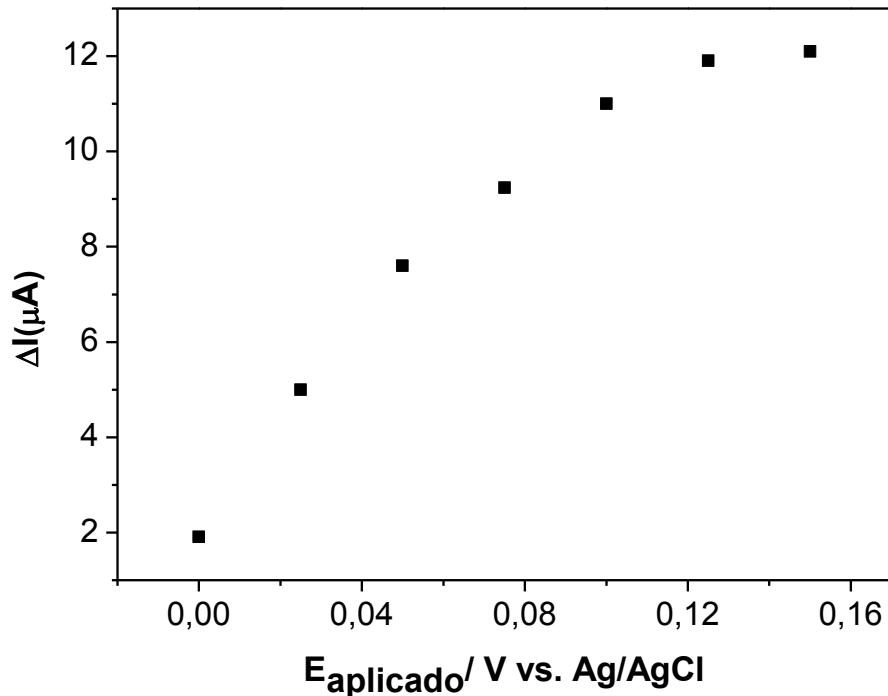
Com intuito de obter uma curva analítica para o sensor desenvolvido frente à determinação simultânea de AA, AU e DA, alguns ensaios foram realizados. Assim, a detecção amperométrica de potencial pulsado foi usada para este propósito. O método é baseado na aplicação de vários degraus de potencial-tempo, o que gerencia o processo analítico sequencial (KILBEY et al., 2006).

A oxidação simultânea de AA, AU e DA foi realizada em $E_1 = 0,1$ V, $E_2 = 0,225$ V e $E_3 = 0,325$ V *versus* Ag/AgCl, respectivamente (em $E_1 = 0,10$ V há oxidação de AA). Por outro lado, em $E_3 = 0,325$ V ocorre oxidação tanto de AU quanto de AA e DA. Por esta razão, para obter o amperograma líquido ou curva analítica, em outras palavras, sem a contribuição da corrente de oxidação de AA, é necessário subtrair a corrente dos amperogramas entre E_3 , E_2 e E_1 , em diferentes concentrações de tampão fosfato 0,1 M em pH 7,0, após otimização dos parâmetros experimentais.

Nas medidas amperométricas, um estudo inicial foi realizado com intuito de determinar o melhor potencial para aplicar no eletrodo para a oxidação de AA, AU e DA. Assim, o potencial aplicado foi escolhido, baseado nas medidas das intensidades da corrente. Desta forma foram selecionados alguns potenciais a partir dos amperogramas obtidos, os quais variaram de 0 até 0,15 V *vs.* Ag/AgCl com um variação de potencial de 25 mV para cada análise de AA

Na Figura 38, observa-se um discreto aumento da corrente do processo de oxidação de AA para os potenciais entre 0 até 0,15 V *vs.* Ag/AgCl, com um máximo em +0,1 V *vs.* Ag/AgCl. Para potenciais de oxidação maiores, a corrente tende a aumentar de forma menos acentuada. Portanto, o potencial aplicado de +0,10 V *vs.* Ag/AgCl foi selecionado para a oxidação de AA. Além disso, em potenciais maiores há perda de seletividade para aplicação do sensor.

Figura 38- Corrente em função do potencial aplicado para o poli-AV/MWCNT/ECV em presença de 700 μ M de AA. Condições utilizadas: tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0.

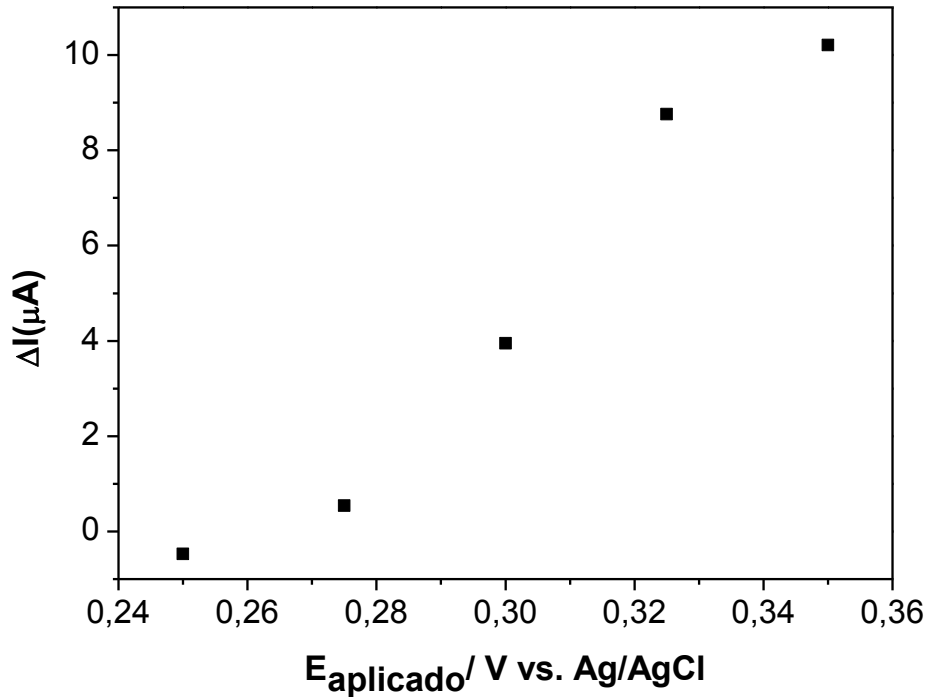


Fonte: Autor, 2013.

Para AU foram selecionados alguns potenciais os quais variaram de 0,25 até 0,35 V vs. Ag/AgCl com um variação de potencial de 25 mV para cada análise.

Na Figura 39, observa-se um discreto aumento da corrente do processo de oxidação de AU para os potenciais entre 0,25 e 0,35 V vs. Ag/AgCl, com um máximo em +0,325V vs. Ag/AgCl. Para potenciais de oxidação maiores, a corrente tende a aumentar de forma menos acentuada. Portanto, o potencial aplicado de +0,325 V vs. Ag/AgCl foi selecionado para a oxidação de AU.

Figura 39- Corrente em função do potencial aplicado para o poli-AV/MWCNT/ECV em presença de 700 μM de AU. Condições utilizadas: tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0.

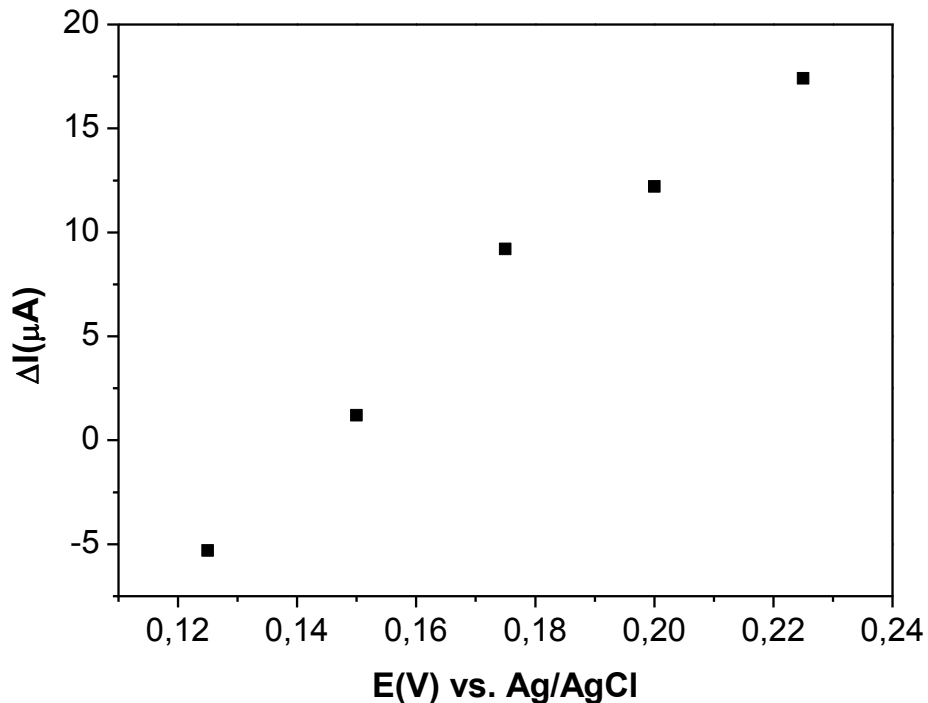


Fonte: Autor, 2013.

Para DA foram selecionados alguns potenciais os quais variaram de 0,125 até 0,225 V vs. Ag/AgCl com um variação de potencial de 25 mV para cada análise.

Na Figura 40, observa-se um discreto aumento da corrente do processo de oxidação de DA para os potenciais entre 0,125 e 0,225 V vs. Ag/AgCl, com um máximo em +0,225 V vs. Ag/AgCl. Para potenciais de oxidação maiores, a corrente tende a aumentar de forma menos acentuada.

Figura 40- Corrente em função do potencial aplicado para o poli-AV/MWCNT/ECV em presença de 700 μM de DA. Condições utilizadas: tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0.

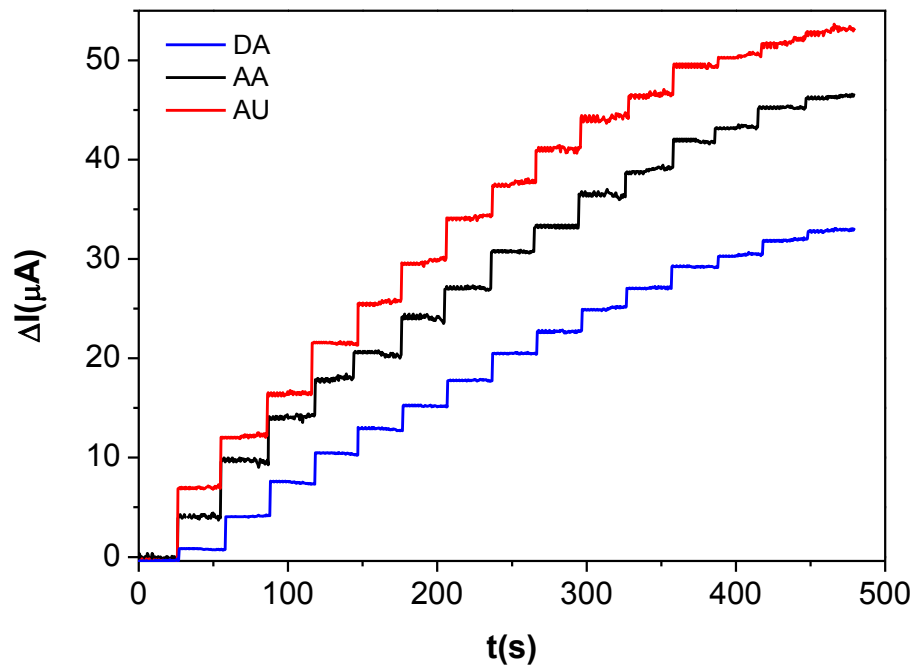


Fonte: Autor, 2013.

Para obter curvas analíticas para o sensor desenvolvido, amperogramas para a oxidação simultânea de AA, DA e AU foram realizados em diferentes concentrações em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0) e potenciais aplicados de +0,100 V, +0,225 V e +0,325 V vs. Ag/AgCl (Figura 41).

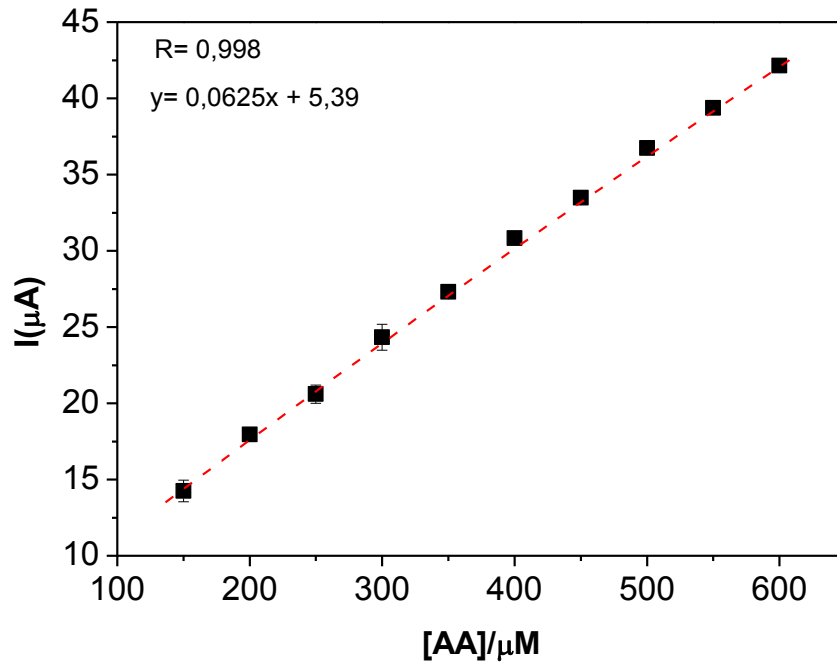
Assim, o sensor amperométrico proposto mostrou uma faixa linear de resposta de 150 a 600 μM , com um coeficiente de correlação de 0,998 para $n=10$ (Figura 42) para determinação de AA em presença de DA e AU.

Figura 41-Medidas cronoamperométricas para a eletro-oxidação de AA, DA e AU no poli-AV/MWCNT/ECV obtidas em tampão fosfato 0,1 M em pH 7,0.



Fonte: Autor, 2013.

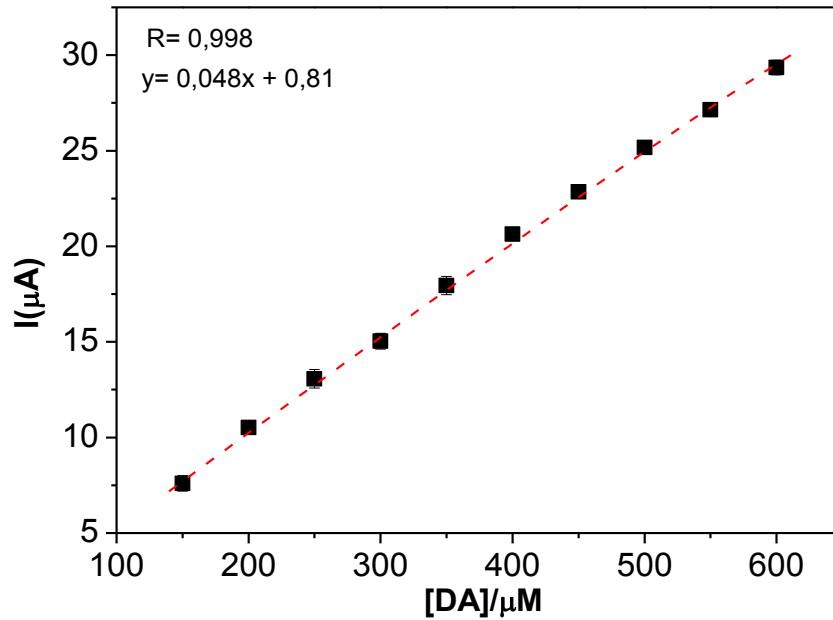
Figura 42-Curva analítica para a eletro-oxidação de AA no poli-AV/MWCNT/ECV, em tampão fosfato 0,1 M em pH 7,0 $E_{\text{aplicado}} = +0,100$ V vs. Ag/AgCl.



Fonte: Autor, 2013.

Para a determinação de DA, o sensor amperométrico apresentou uma faixa linear de resposta de 150 a 600 μM , com um coeficiente de correlação de 0,998 para $n=10$ (Figura 43), em presença de AA e AU.

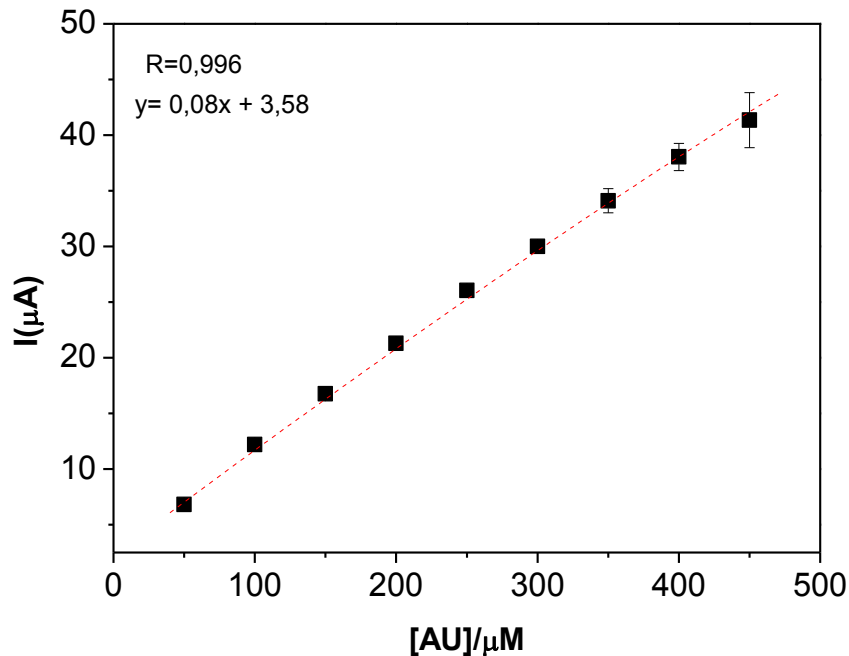
Figura 43- Curva analítica para a eletro-oxidação de DA no poli-AV/MWCNT/ECV, em tampão fosfato 0,1 M em pH 7,0 $E_{\text{aplicado}} = +0,225 \text{ V vs. Ag/AgCl}$.



Fonte: Autor, 2013.

Para a determinação de AU, o sensor amperométrico apresentou uma faixa linear de resposta de 50 a 450 μM , com um coeficiente de correlação de 0,996 para $n=9$ (Figura 44) em presença de DA e AA.

Figura 44-Curva analítica para a eletro-oxidação de AU no poli-AV/MWCNT/ECV, em tampão fosfato 0,1 M em pH 7,0 $E_{\text{aplicado}} = +0,325$ V vs. Ag/AgCl.



Fonte: Autor, 2013.

Limites de detecção foram calculados para AA, DA e AU e foram respectivamente 3,5 μM , 4,5 μM e 1,5 μM , os quais foram determinados, usando uma razão $3\sigma/b$ e 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).

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

O procedimento usado para construir o sensor fundamentado em MWCNT e poli-AV gerado *in situ* resultou num sistema bem empacotado, tornando difícil a

solução difundir profundamente através da plataforma, e isso pode levar a uma resposta mais rápida, pois somente os sítios superficiais devem contribuir para a resposta (SILVA, 2011).

Os dados obtidos levam a crer que o sensor desenvolvido possa ser utilizado em amostras biológicas, tais como: sangue e urina, uma vez que a faixa de resposta do sensor está dentro das concentrações em que estes se encontram em matrizes biológicas. Além disto, a preparação do sensor é relativamente simples, e os reagentes utilizados são disponíveis comercialmente e de relativo baixo custo e a técnica empregada apresenta maior sensibilidade e tempo de resposta curto quando comparado com as técnicas de Voltametria de Pulso diferencial (VPD) e Voltametria Cíclica (VC).

A forma na qual foi realizada a análise foi baseada em manter os analitos em uma mesma concentração em cada ponto da curva analítica para assim verificar o real efeito da interferência entre eles na determinação simultânea. A maioria dos trabalhos relatados na literatura para determinação simultânea de AA, AU e DA não trabalha desta forma como foi relatada neste trabalho (Tabela 3), isso se deve muito provavelmente à perda da resposta quando são analisados em mesma concentração, devido à sobreposição das correntes de pico na VPD (SEKLI-BELAIDI, GALINIER e GROS, 2013) fato este que prejudica a determinação destes analitos em uma mesma concentração, por VC e VPD.

Tabela 4- Parâmetros eletroquímicos e analíticos de eletrodos modificados para a determinação simultânea de AA, DA e AU.

(Continua)

| Plataforma | Técnica | pH | ΔE_{pDA-AA} (V) | ΔE_{pAU-DA} (V) | Faixa Linear (μM) | LD (μM) | Referência |
|------------------------|--------------|-----|-------------------------|-------------------------|--|-----------------------------------|-----------------------------|
| NFC/EPC | VPD | 4,5 | 0,176 | 0,099 | AA: 2–64 DA: 0,04–5,6 AU: 0,8–16,8 | AA: 2 DA: 0,04 AU: 0,2 | LIU et al., 2008 |
| HO-MWCNT/ECV | VPD | 7,4 | 0,178 | 0,148 | - | AA: 50 DA: 1 AU: 50 | BI et al., 2012 |
| HOOC-MWCNT/ECV | VPD | 7,4 | 0,164 | 0,152 | - | AA: 10 DA: 0,5 AU: 10 | BI et al., 2012 |
| BMPTB/EPC | VPD | 6,6 | 0,275 | 0,429 | - | AA: - DA: 0,01 AU: - | PANDURANGACHAR et al., 2011 |
| TBQ/EPC | VPD | 7,0 | 0,100 | 0,225 | AA: 10-100 DA: 10-100 AU: 10-100 | AA: 0,62 DA: - AU: - | ZARE et al., 2005 |
| OGM/ECV | VPD | 6,0 | 0,200 | 0,132 | AA: 5–1300 DA: 0,5–170 AU: 0,1–20 | AA: 2,2 DA: 0,25 AU: 0,045 | SHENG et al., 2012 |
| AMT/ECV | Amperometria | 5,0 | 0,130 | 0,150 | - | AA: 0,075 DA: 0,04 AU: 0,06 | KALIMUTHU e JOHN, 2009 |
| GF/EG | VPD | 7,0 | 0,193 | 0,172 | AA: - DA: 0,5 - 50 AU: 1,75 - 90 | AA: - DA: 0,25 AU: 0,45 | MALLESHA et al., 2011 |
| ECV¹ | VPD | 7,0 | 0,165 | 0,135 | AA: 25–300 DA: 3–30 AU: 5–70 | AA: 23,38 DA: 2,67 AU: 4,70 | TEMOÇIN, 2013 |

Tabela 4- Parâmetros eletroquímicos e analíticos de eletrodos modificados para a determinação simultânea de AA, DA e AU.

(Continuação)

| | | | | | | | |
|---------------------------|--------------|-----|-------|-------|--|-----------------------------|--------------------------------------|
| PVA/ECV | VPD | 7,0 | 0,140 | 0,140 | AA: 10–250 DA: 2–70 AU: 2–50 | AA:7,6 DA:1,4 AU:0,6 | LI e LIN, 2006 |
| SP/MWCNT/GE | Amperometria | 7,0 | 0,192 | 0,123 | AA:50-1000 DA:50-350 AU:50-800 | AA:0,5 DA:0,15 AU:0,8 | MANJUNATHA et al.,2010 |
| Poli-AE/ECV | VPD | 4,5 | 0,182 | 0,180 | AA:5-105 DA:1-10 AU:30-110 | AA:0,3 DA:0,25 AU:2,0 | LIN et al., 2008 |
| ECLI | VPD | 6,8 | 0,150 | 0,130 | AA:50-7400 DA:2-1000 AU:2-220 | AA:20 DA:1,0 AU:1,0 | SAFAVI et al.,2006 |
| Poli-tir/MWCNT/ECV | VPD | 7,4 | 0,160 | 0,150 | AA:50-1000 DA: 0,1-30 AU: 1-350 | AA:2,0 DA:0,02 AU:0,3 | WANG e BI, 2013 |
| ACAK/ECV | VPD | 4,0 | 0,193 | 0,166 | AA: 50–1000 DA: 1–200 AU: 1–120 | AA: 10 DA:0,5 AU:0,5 | ZHANG et al., 2009 |
| PEDOT/Au-Micro | VPD | - | 0,250 | - | AA: 5-200 DA: - AU: 3-700 | AA:4,2 DA: AU:2,0 | SEKLI-BELAIDI, GALINIER e GROS, 2013 |
| Poli-AV/MWCNT/ECV | Amperometria | 7,0 | 0,200 | 0,115 | AA: 150 -600 DA: 150 -600 AU: 50-450 | AA:3,5 DA:4,5 AU:1,5 | Este Trabalho |

EPC: eletrodo de pasta de carbono; VPD: voltametria de pulso diferencial; NFC: Nanofibra de carbono; HO-MWCNT: Nanotubos de carbono de paredes múltiplas hidroxilado; HOOC-MWCNT: Nanotubos de carbono de paredes múltiplas carboxilado; BMPTB: 1-butiril-4-metilpiridiniotetrafluoroborato; TBQ:Tetrabromo-*p*-benzoquinona; OGM: óxido de grafite e melanina; AMT: 5-amino-2-mercapto-1,3,4-tiadiazol; EG: eletrodo de grafite; FG: grafeno funcionalizado; ECV¹: eletrodo de carbono vítreo modificado em meio básico; PVA: poli(álcool vinílico); SP: sulfonato poliestireno; Poli-AE: polímero azul de Evans; ECLI: eletrodo de carbono e líquido iônico; Poli-tir: polímero tirosina; ACAK: Ácido cromo azul K; Poli-AV: polímero ácido vanílico; PEDOT: poli(3,4-etilenodioxitiofeno); Au-Micro: microeletrodo de ouro.

Fonte: Autor, 2013.

6 CONCLUSÃO

6.1 Conclusões Gerais

Este trabalho relata a construção de uma nova plataforma nanoestruturada, simples, fundamentada em nanotubos de carbono de paredes múltiplas, funcionalizados com ácido vanílico e ativada *in situ*. Este processo de ativação promove a formação de pares redox (quinona /hidroquinona).

Os estudos eletrocatalíticos e cinéticos do AA por meio da voltametria de disco rotatório e cronoamperometria empregando o sistema desenvolvido poli-AV/MWCNT/ECV comprovaram a eficiência deste sistema em mediar a transferência de elétrons, envolvendo a molécula de AA.

A plataforma nanoestruturada modificada pelo mediador poli-AV constitui um excelente sistema para a elaboração de sensores capazes de promover a detecção de AA, DA e AU com boa sensibilidade e estabilidade, bem como um tempo de resposta curto.

O sensor proposto é de fácil preparação quando comparado a vários materiais envolvidos na modificação de eletrodos e os materiais utilizados são de baixo custo, além de que a técnica amperométrica utilizada apresenta alta sensibilidade quando comparada a técnicas voltamétricas e curto período de tempo para serem realizadas as análises.

A avaliação dos parâmetros analíticos deste sensor mostrou que são ótimos dispositivos para a determinação de AA, DA e AU.

7 PERSPECTIVAS

- Realizar eletrólise para identificar os produtos gerados da oxidação de AV;
- Utilizar o sensor em matrizes biológicas, tais como sangue e urina;
- Estudo de interferentes que afetam a determinação de AA, DA e AU em matrizes biológicas;
- Fazer análise por Impedância para avaliar o comportamento eletrônico do polímero gerado em diferentes valores de pH;
- Utilizar microscopia de força atômica para analisar a morfologia do eletrodo poli-AV/MWCNT/ECV.

REFERÊNCIAS

ABDEL-HAMID, R.; NEWAIR, E.F. Electrochemical behavior of antioxidants: I. Mechanistic study on electrochemical oxidation of gallic acid in aqueous solutions at glassy-carbon electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 657 ,p. 107–112, 2011.

ABREU,F.C.;GOULART,M.O.F.;BRETT,A.M. Detection of the damage caused to DNA by niclosamide using an electrochemical DNA-biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 17, p. 913-919, 2002.

ANDERSON, D.G. et al. Oxidation of 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyde, a Toxic Dopaminergic Metabolite, to a Semiquinone Radical and an *ortho*-Quinone. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p. 26978–26986, 2011.

ATTA, N. F.;GALAL, A.; R. A. AHMED. Poly(3,4-ethylene-dioxythiophene) electrode for the selective determination of dopamine in presence of sodium dodecyl sulfate. **Bioelectrochemistry**, v. 80, p. 132-141, 2011.

AZIZ, N.H. et al. Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. **Microbios**, v.93, p.43-54, 1998.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. Electrochemical methods – Fundamentals and Applications, 2nd, ed. **Wiley**, New York, 2001.

BARROS, E. B. et al. Review on the symmetry-related properties of carbon nanotubes. **Physics Reports**, v. 431, p.261-302, 2006.

BARREIROS, A. L. B. S. et al. Estresse Oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e a defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.

BARTLETT, P. Modified electrode surface in amperometric biosensors. **Medical and Biological Engineering and Computing**, v. 28, p.B10-B17, 1990.

BELIN., EPRON, F., Characterization methods of carbon nanotubes: a review. **Materials Science and Engineering B**, v. 119, p.105-118, 2005.

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

BOUDET, A. Evolution and current status of research in phenolic compounds. **Phytochemistry**,v. 68, p. 2722–2735, 2007.

BOURNE, L. C.;RICE-EVANS, C. Bioavailability of ferulic acid. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 253, p. 222-227., 1998.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutrition Reviews**, New York, v. 56, p.317-333, 1998.

BRETT, C.M.A.; BRETT, A.M.O. Electroanalysis, Oxford, University Press; Oxford, 1998.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I.C.F.R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future Perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p.15–25, 2013.

CHAUHAN, N.; PUNDIR, C.S. An amperometric uric acid biosensor based on multiwalled carbon nanotube–gold nanoparticle composite. **Analytical Biochemistry**, v. 413, p. 97–103, 2011.

CHEN, S.; TAI, K.Y.; WEBSTER, R.D. The Effect of the Buffering Capacity of the Supporting Electrolyte on the Electrochemical Oxidation of Dopamine and 4-Methylcatechol in Aqueous and Nonaqueous Solvents. **Chemistry - An Asian Journal**, v.6, p.1492 – 1499, 2011.

CHIANG, L.C. et al. Immunomodulatory activities of flavonoids, monoterpenoids, triterpenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of *Plantago* species. **Planta Med.**, v. 69, p. 600-604, 2003.

CIVOLANI, C. et al. Bioconversion of ferulic acid into vanillic acid by means of a vanillate-negative mutant of *Pseudomonas fluorescens* strain BF13. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, p. 2311–2317, 2000.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates--nature occurrence and dietary burden. **J. Sci. Food Agric.**, v. 70, p. 362-372, 1999.

COLLADO, S.; LACA, A.; DIAZ, M. Effect of the carboxylic substituent on the reactivity of the aromatic ring during the wet oxidation of phenolic acids. **Chemical Engineering Journal**, v.166, p. 940–946, 2011.

CROFT, K.D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 854, p. 435-442, 1998.

D'ARCHIVIO, M. et al. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Ann. Ist. Super Sanità**, v. 43, p. 348-361, 2007.

DELAQUIS, P., STANICH, K., TOIVONEN, P. Effect of pH on the inhibition of *Listeria* spp. by vanillin and vanillic acid. **J. Food Prot.**, v. 68, p.1472–1476, 2005.

DU, J.; CULLEN, J.J.; BUETTNER, G.R. Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1826, p.443–457, 2012.

DUKE, J.A. Handbook of Phytochemical Constituents of GRAS Herbs and Other Economic Plants, 999th ed.; **CRC Press**: Boca Raton, FL, USA, 1992.

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

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

EZERSKIS, Z.; JUSYS, Z. Electropolymerization of chlorinated phenols on a Pt electrode in alkaline solution Part I: A cyclic Voltammetry Study. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 31, p.1117-1124, 2001.

FANG, B. et al. A uric acid sensor based on electrodeposition of nickel hexacyanoferrate nanoparticles on an electrode modified with multi-walled carbon nanotubes. **Microchimica Acta**, v. 173, p. 27, 2011.

FERGUSON, L.R., HARRIS, P.J. Protection against cancer by wheat bran: role of dietary fibre and phytochemicals. **European Journal of Cancer Prevention**, Oxford, v. 8, p.17-25, 1999.

FERNANDEZ, M.A., SAENZ, M.T., GARCIA, M.D. Antiinflammatory activity in rats and mice of phenolic acids isolated from *Scrophularia frutescens*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 50, p.1183-1186, 1998.

FERREIRA, D. C. et al. Molecular modeling study on the possible polymers formed during the electropolymerization of 3-hydroxyphenylacetic acid. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 34, p.18–27, 2012.

FERREIRA, L.F. et al. Formation of novel polymeric films derived from 4-hydroxybenzoic acid. **Materials Chemistry and Physics**, v. 129, p. 46– 52, 2011.

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

FRANCO, D. L. et al. Electropolymerization of 3-aminophenol on carbon graphite surface: Electric and morphologic properties. **Materials Chemistry and Physics**, v. 107, p. 404–409, 2008.

FREIRE, R.S et al. Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. **Química Nova**, v. 26, p.381-389, 2003.

GALUS, Z. **Fundamentals of Electrochemical Analysis**, Ellis Horwood Press, New York, 313, 1976.

GAMACHE, P., RYAN, E., ACWORTH, I.N. Analysis of phenolic and flavonoid compounds in juice beverages using high-performance liquid chromatography with coulometric array detection. **Journal of Chromatography**, v.635, p.143-150, 1993.

GHISELLI, A. et al .Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. **Free Radical Biol. Med.**, v. 29, p.1106-1114, 2000.

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

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radical in Biology and Medicine, 3rd ed., **Oxford University Press: Oxford**, 2002; 4th ed., 2007.

HASLAM, E. Shikimic acid: metabolism and metabolites. **John Wiley & Sons: New York**, 1993; p 331.

HERBSFOR. **Angelica sinensis**. Disponível em: www.herbsfor.net/dong-quai-angelica-sinensis.html. Acessado em 17/11/12.

HOLLMAN, P.C., KATAN, M.B. Bioavailability and health effects of dietary flavonoids in man. **Archives of Toxicology Supplement**, v. 20, p.237-248, 1998.

HOU, S.; ZHENG, N.; FENG, H.; LI, X. Determination of dopamine in the presence of ascorbic acid using poly(3,5-dihydroxy benzoic acid) film modified electrode. **Analytical Biochemistry**, v. 179, p.179–184, 2008.

HUANG, Z.; DOSTAL, L.; ROSAZZA, J. P.N. Mechanisms of Ferulic Acid Conversions to Vanillic Acid and Guaiacol by *Rhodotorula rubra*. **The Journal of Biological Chemistry** v. 268, no. 32, p. 23954-23958, 1993.

IVANOVA, A. et al. Transformation of cholanic acid derivatives into pharmacologically active esters of phenolic acids by heterogeneous Wittig reaction. **Zeitschrift fuer Naturforschung**, v.52, p. 516-521, 1997.

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

JAISWAL, P.V.; IJERI, V.S.;SRIVASTAVA,A.K. Effect of surfactants on the dissociation constants of ascorbic and maleic acids. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 46, p. 45–51, 2005.

KALIMUTHU, P.; JOHN,S.A. Electropolymerized film of functionalized thiadiazole on glassy carbon electrode for the simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine. **Bioelectrochemistry**, v. 77, p 13–18, 2009.

KARAKAYA, S.; Bioavailability of phenolic compounds. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 44, p. 453-464, 2004.

KARIM-NEZHAD, G. et al. Electro-oxidation of ascorbic acid catalyzed on cobalt hydroxide-modified glassy carbon electrode. **Journal of the Serbian. Chemical Society**, v. 74 (5), p. 581–593, 2009.

KERRY, N.L., ABBEY, M. Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation *in vitro*. **Atherosclerosis, Limerick**, v. 135, n. 1, p. 93-102, 1997.

KILBEY, G. et al. Laser etched carbon fibre composites: Disposable detectors for flow analysis applications. **Electrochem. Commun**, v. 8 , p. 1315-1320, 2006.

KIM, S.; KIM, M.; UM, J. The Beneficial Effect of Vanillic Acid on Ulcerative Colitis. **Molecules**, v. 15, p. 7208-7217, 2010.

LABAER, J. So, you want to look for biomarkers - (Introduction to the special biomarkers issue). **Journal of Proteome Research**, v. 4, p. 1053-1059, 2005.

LAFAY, S.; GIL-IZQUIERDO, A. Bioavailability of Phenolic acids . **Phytochem. Rev.**, v.7, p. 301-311, 2008.

LI, N.B.; REN, W.; LUO, H. Q. Caffeic Acid-Modified Glassy Carbon Electrode for the Simultaneous Determination of Epinephrine and Dopamine. **Electroanalysis**, v. 19, No.14, p. 1496 – 1502, 2007.

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

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

LIMA, P. R..Tese. Eletrodo Modificado à Base de 4-Nitroftalonnitrila: Sensor Amperométrico para Quantificação de Alguns Antioxidantes de Relevância Biológica. Universidade Estadual de Campinas, 2009.

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

LIMA, P.R. et al. An amperometric sensor based on electrochemically triggered reaction: Redox-active Ar–NO/Ar–NHOH from 4-nitrophthalonitrile-modified electrode for the low voltage cysteine detection. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 612, p. 87–96, 2008.

LIMA, P.R. et al. Modified Carbon Paste Electrode for Kinetic Investigation and Simultaneous Determination of Ascorbic and Uric Acids. **Electroanalysis**, v. 21, No. 21, p.2311 – 2320, 2009.

LIN, L. et al. Simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid at poly (Evans Blue) modified glassy carbon electrode. **Bioelectrochemistry**, v. 73, p. 11–17, 2008.

LIU, Y. et al. Simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid with electrospun carbon nanofibers modified electrode. **Electrochemistry Communications**, v.10, p. 1431–1434, 2008.

LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos- Revisão. **Química Nova**, v. 29, p. 1318-1325, 2006.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability . **Am. J. Clin. Nutr** , v. 79, p. 727-747, 2004.

MALINAUSKAS, A.; GARJONYTE, R. Electrochemical response of ascorbic acid at conducting and electrogenerated polymer modified electrodes for electroanalytical applications: a review. **Talanta**, v. 64, p. 121–129, 2004.

MALLESHA, M. et al. Functionalized-graphene modified graphite electrode for the selective determination of dopamine in presence of uric acid and ascorbic acid. **Bioelectrochemistry**, v. 81, p. 104–108, 2011.

MALLESHA, M.; R.MANJUNATHA, R.; NETHRAVATHI, C. Functionalized-graphene modified graphite electrode for the selective determination of dopamine in presence of uric acid and ascorbic acid. **Bioelectrochemistry**, v. 81, p. 104–108, 2011.

MANJUNATHA, M. et al. Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid using polystyrene sulfonate wrapped multiwalled carbon nanotubes bound to graphite electrode through layer-by-layer technique. **Sensors and Actuators B**, v. 145, p. 643–650, 2010.

MELLO, L.D. et al. Biosensors for antioxidant evaluation in biological systems. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v.16, p. 109-120, 2013.

MELLO, L.D.; KUBOTA, L.T. Biosensors as a tool for the antioxidant status evaluation. *Talanta*, v. 72(2), p. 335-348, 2007.

MICHALAK, A. Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 15, p. 523-530, 2006.

MORENO, G.; PARIENTE, F.; LORENZO, E. Electrocatalytic oxidation of ascorbate at glassy carbon electrodes modified with electrodeposited films derived from dihydroxybenzaldehyde isomers. **Analytica Chimica Acta**, v. 420 p. 29–37, 2000.

MOURTZINOS, I. et al. Thermal oxidation of vanillin affects its antioxidant and antimicrobial properties. **Food Chemistry**, v. 114, p. 791–797, 2009.

MURRAY R. W.; in *Electroanalytical Chemistry* (Eds.: A. J. Bard), Marcel Dekker, New York, vol.13, p. 191-368, 1984.

MURTHY, A.S.N.; SHARMA, J. Benzoquinone modified electrode for sensing NADH and ascorbic acid. **Talanta**, v. 45, p. 951–956, 1998.

NAGEN, T.J., ALBUQUERQUE, T.T.O., MIRANDA, L.C.G. Ácidos fenólicos em cultivares de soja: ação antioxidante. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 35, p.129-138, 1992.

NOROOZIFAR, M.; KHORASANI-MOTLAGH, M.; TAHERI, A. Preparation of silver hexacyanoferrate nanoparticles and its application for the simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid. **Talanta**, v. 80, p. 1657–1664, 2010.

O'DONNELL, P. Review article Dopamine gating of forebrain neural ensembles. **European Journal of Neuroscience**, v. 17, p. 429–435, 2003.

OLIVEIRA, A.C. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Quim. Nova*, v. 32, No. 3, p. 689-702, 2009.

OLIVEIRA, D. M.; BASTOS, D.H.M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Química Nova**, v. 34, p. 1051-1056, 2011.

OTERO, T.F.; MARTINEZ, J.G.; ARIAS-PARDILLA, J. Biomimetic electrochemistry from conducting polymers. A review Artificial muscles, smart membranes, smart drug delivery and computer/neuron interfaces. **Electrochimica Acta**, v. 84, p. 112–128, 2012.

PANDURANGACHAR, M. et al. Electrochemical deposition of 1-butyl-4-methylpyridinium tetrafluoroborate ionic liquid on carbon paste electrode and its application for the simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid. **Journal of Molecular Liquids**, v. 158, p. 13–17, 2011.

PANIZZA, M.; CERISOLA, G. Electrochemical degradation of gallic acid on a BDD anode. **Chemosphere**, v. 77, p. 1060–1064, 2009.

PELEG, H., BODINE, K.K., NOBLE, A.C. The influence of acid on adstringency of alum and phenolic compounds. **Chemical Senses**, Oxford, v.23, p.371-378, 1998.

PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. S. ; KUBOTA, L. T. . Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. **Química Nova (Impresso)**, revista, v. 25, n. 06, p. 1012-1021, 2002.

PRAKASH, S.; CHAKRABARTY, T. Polymer thin films embedded with metal nanoparticles for electrochemical biosensors applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 41, p. 43-53, 2013.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, p. 755-760, 2006.

RAI, R.P., MAURYA, M.S. Synthesis and evaluation of antibacterial activity of vanillin derivatives. **J. Sci. Technol.**, v. 4, p. 275–276, 1996.

REFSUM, H. et al. Homocysteine and cardiovascular disease **Annual Review of Medicine** , v.49, p. 31-62, 1998.

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

RIVAS, G. A. et al. Carbon Nanotubes Paste Electrodes. A New Alternative for the Development of Electrochemical Sensors. **Electroanalysis** , v. 19, p.823–831, 2007.

ROCHA, A.A.H et al. Preparation and electrochemical behavior of the CA/TiO₂/Sb₂O₅ composite electrode modified with p-benzoquinone. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 690, p. 74-82, 2012.

ROSATTO, S.S. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental .**Química Nova**, v. 24, p. 77-86, 2001.

RUSLING J. F.; in electroanalytical Electroanalytical Chemistry (Eds.: A. J. Bard), Marcel Dekker, New York, **1994**, pp. 1-88, vol.18.

SAFAVI, A. et al. Simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid, and uric acid using carbon ionic liquid electrode. **Analytical Biochemistry**, v. 359, p. 224–229, 2006.

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

SCHAFER, F.Q.; BUETTNER, G.R.. Redox state of the cell as viewed through the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radic Biol Med.**, v.30,p 1191-1212, 2001.

SEKLI-BELAIDI, F.; GALINIER, A.; GROS, P. Simultaneous Assay of Ascorbate and Urate Antioxidants in Human Blood Serum Using PEDOT- Based Electrochemical Microsensor. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v.16, p. 84-91, 2013.

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

SHENG, Q. et al. Sol–gel derived terbium hexacyanoferrate modified carbon ceramic electrode: Electrochemical behavior and its electrocatalytical oxidation of ascorbic acid. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 606, p. 39–46, 2007.

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

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

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

SILVA, T.A.R. et al. Poly(4-hydroxyphenylacetic acid): A New Material for Immobilization of Biomolecules. **Polymer Engineering Science**, v. 48, p. 1963–1970, 2008.

SILVA, W.C. Sensor Amperométrico a base de nanotubos de carbono e ácido ferúlico para detecção eletrocatalítica de NADH. Universidade Federal de Alagoas, 2011.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15 (1), p. 71-81, 2002.

SONG, W.; CHEN, Y.; XU, J. A selective voltammetric detection for dopamine using poly (gallic acid) film modified electrode. **Chinese Chemical Letters**, v. 21, p. 349–352, 2010.

SUZUKI, H. Advances in the microfabrication of electrochemical sensors and systems. **Electroanalysis**, v. 12, p.703-715, 2000.

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

- TRABELSI, S. et al. Electrochemical oxidation of ferulic acid in aqueous solutions at gold oxide and lead dioxide electrodes. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 35, p. 967–973, 2005.
- TSUDA, H. et al. Chemopreventive effects of beta-carotene, alpha-tocopherol and five naturally occurring antioxidants on initiation of hepatocarcinogenesis by 2-amino-3-methylimidazo quinoline in the rat. **Jpn. J. Cancer Res.**, v. 85, p. 1214–1219, 1994.
- VALKO, M. et al.,. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Mol. Cell. Biochem**, v. 266, p. 37–56, 2004.
- VASCONCELOS, S.M.L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quimica Nova**, v 30, p.1323-1338, 2007.
- VENKITASUBRAMANIAN, P. et al. Aldehyde oxidoreductase as a biocatalyst: Reductions of vanillic acid. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, p. 130–137, 2008.
- VENTON, B.J.; WIGHTMAN, R.M. Psychoanalytical electrochemistry: dopamine and behavior. **Analytical Chemistry**, v. 75, p. 414A-421A, 2003.
- WANG, Y.; BI, C. Simultaneous electrochemical determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid using poly (tyrosine)/functionalized multi-walled carbon nanotubes composite film modified electrode. **Journal of Molecular Liquids**, v. 117, p. 26-31, 2013.
- WIGHTMAN, R.M.; MAY, L.J.; MICHAEL, A.C. Detection of Dopamine Dynamics in the Brain. **Analytical Chemistry**, v. 60, p. 769-779, 1988.
- ZARE, H. R. et al. Electrochemical properties of a tetrabromo-p-benzoquinone modified carbon paste electrode. Application to the simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 577, p. 25–33, 2005.
- ZHANG, R. et al. Simultaneous electrochemical determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid using poly(acid chrome blue K) modified glassy carbon electrode. **Sensors and Actuators B**, v. 138, p. 174–181, 2009.
- ZHAO, Y.L.; STODDART, J.F. Noncovalent Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes **Acc. Chem. Res.**, v. 42, p. 1161–1171, 2009.
- ZWART, L.L. et al. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. **Free Radical Bio Med**, v. 26, p. 202-226, 1999.