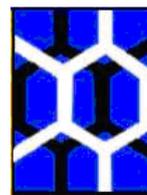


**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**  
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
*Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia*



# **Niclosamida: Um novo mediador para a Eletro-oxidação de NADH**

**Cleylton Bezerra Lopes**

Maceió  
2010

**CLEYLTON BEZERRA LOPES**

# **Niclosamida: Um novo mediador para a Eletro-oxidação de NADH**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dra. Marília Oliveira Fonseca Goulart

Co-orientador: Prof. Dr. Phabyanno Rodrigues Lima

Maceió

2010

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
**Bibliotecária: Janaina Xisto de Barros Lima**

L864n    Lopes, Cleyton Bezerra.  
          Niclosamida : um novo mediador para a eletro-oxidação de NADH / Cleyton  
          Bezerra Lopes, 2010.  
          95f. : il.

          Orientador: Marília Oliveira Fonseca Goulart.  
          Co-orientador: Phabyanno Rodrigues Lima.  
          Dissertação (mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de  
          Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2010.

          Bibliografia: f. 85-94.

          1. Eletroquímica. 2. Química orgânica. 3. Físico-química. 4. Niclosamida  
          5. **NADH** - Nicotinamida adenina dinucleotídeo. I. Título.

CDU: 544.6



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



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

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de **Cleyton Bezerra Lopes**, intitulada: “**Niclosamida: Um Novo Mediador para a Eletro-Oxidação de NADH**”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 12 de agosto de 2010, às 8h30min., na Sala de Aulas do PPGQB/UFAL.

COMISSÃO JULGADORA

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marília Oliveira Fonseca Goulart  
Orientadora – PPGQB/IQB/UFAL

Prof. Dr. Phabyanno Rodrigues Lima  
Co-orientador - PPGQB/IQB/UFAL

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Wilney de Jesus Rodrigues Santos  
Instituto de Química/ Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fabiane Caxico de Abreu Galdino  
PPGQB/IQB/UFAL

Prof. Dr. José Rui Machado Reys  
ESENFAR/UFAL

## **DEDICATÓRIA**

### ***A Deus, pelo dom da vida.***

*“... Se a saudade aperta ainda o teu coração e a estrada deserta não parece ter fim,  
hoje deixo contigo força e direção.*

*Olha pra ela e espera por mim. Não temas em recebê-la por mãe!*

*Será o teu consolo ...”.*

*(Walmir Alencar)*

### ***A minha família.***

*Minha mãe (Cleusa), meu pai (Jose Antônio) e meu irmão (Cleyton); pela presença e apoio incondicional em todos os momentos.*

## **AGRADECIMENTOS**

*A prof<sup>a</sup>. Marília Goulart, pela orientação, apoio e confiança;*

*Ao prof<sup>o</sup>. Phabyanno Lima, pela co-orientação, tantos ensinamentos;*

*Ao prof<sup>o</sup>. Lauro Tatsuo Kubota, pelo acolhimento e suporte durante as viagens à UNICAMP;*

*Aos amigos do Laboratório de Eletroquímica – Lequi; pelo excelente convívio e companheirismo no dia-a-dia;*

*A Zaira, pelo carinho e apoio em todas as horas;*

*Aos amigos Wilson, Roberta, Carmen, Claudemárcio e Aurenívia, pelo apoio e conselhos;*

*Aos amigos de graduação Beatriz, Francisco, Mikael e Tiago, por tantas emoções durante aquele tempo;*

*Aos técnicos e funcionários do Instituto de Química e Biotecnologia, pela contribuição logística;*

*A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia, pelo empenho e esforço em melhorar o nosso programa;*

*A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES – pela concessão de bolsa de estudos, a qual possibilitou a execução desta dissertação;*

*Enfim, a todos que de alguma maneira contribuíram para a execução desse trabalho, seja pela ajuda constante ou por uma palavra de amizade.*

*Muito Obrigado!*

## **PROCAD/CAPES**

*Ao PROCAD/CAPES, um importante programa de cooperação acadêmica entre as universidades UFAL e UNICAMP incentivadas pelo governo federal, sob orientação dos professores Lauro Tatsuo Kubota e Marília Oliveira Fonseca Goulart. Particularmente, durante o mestrado, foi possível realizar várias missões com resultados muito interessantes, além da troca de experiências entre as universidades envolvidas. Contamos com o apoio de forma especial dos novos amigos do LEEDS: Wilney Santos, Murilo Santhiago e Caio Nakavaki. Estes proporcionaram um ambiente salutar, divertido e proveitoso, facilitando, portanto, todo o andamento do trabalho.*

*Obrigado “povo” !!!*

*"Campeões não são feitos em academias.  
Campeões são feitos de algo que eles têm profundamente  
dentro de si — um desejo, um sonho, uma visão."*

Muhammad Ali

## RESUMO

Neste trabalho, descreve-se o desenvolvimento de uma plataforma nanoestruturada simples e eficiente à base de nanotubos de carbono de paredes múltiplas (do inglês, MWCNT) funcionalizados com niclosamida (NIC-NO<sub>2</sub>) na perspectiva de seu uso analítico na quantificação de NADH. A NIC-NO<sub>2</sub> foi ativada *in situ* (NIC<sub>ativada</sub>) sobre o MWCNT depositado em carbono vítreo, gerando, os pares redox hidroxilamina/nitroso (NIC-NHOH/NIC-NO,  $E^\circ = -0,09$  vs. Ag/AgCl), seguido de outro par redox ( $E^\circ = 0,15$  vs. Ag/AgCl) ambos estáveis na plataforma nanoestruturada. Apenas o par redox (NIC-NHOH/NIC-NO) apresentou atividade eletrocatalítica na oxidação de NADH e no segundo pico a corrente líquida não foi afetada na presença de NADH. 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 se obter maiores informações sobre os processos de oxidação entre a NADH e a plataforma funcionalizada. Assim, por meio de gráficos e equações de Cottrell foi possível obter os valores aparentes para o coeficiente de difusão ( $D_{\text{NADH}}$ ) e constante catalítica da reação ( $\kappa_{\text{cat}}$ ) para a NADH. Os valores do  $D_{\text{NADH}}$  e de  $\kappa_{\text{cat}}$ , determinados para a NADH, foram de  $2,5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ,  $8,1 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$ , respectivamente. O aumento na velocidade de reação para o NADH foi atribuído à eficiente transferência de elétrons entre esta espécie e o par redox (NIC-NHOH/NIC-NO) eletrogerado *in situ*. O sensor amperométrico apresentou em relação ao NADH uma faixa de resposta linear ( $0,1\text{-}3,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ), limite de detecção ( $0,029 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ), limite de quantificação ( $0,095 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ), sensibilidade ( $0,25 \text{ } \mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$ ), potencial de detecção ( $+0,065 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ ), tempo de resposta de detecção de  $0,2 \text{ s}$ . A partir do desempenho obtido, a plataforma nanoestruturada fundamentada em MWCNT e NIC<sub>ativada</sub>, novo mediador redox, torna-se um ambiente excelente para a configuração de novos biossensores que empregam enzimas NADH dependentes.

Palavras-chave: Eletroquímica, Química Orgânica, Físico-química, Niclosamida, Nanotubos de Carbono, NADH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo.

## ABSTRACT

In this work, the development of a simple and efficient nanostructured platform based on multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) modified with activated niclosamide (NIC-NO<sub>2</sub>). Towards electrocatalytic NADH oxidation is described. For this purpose, initially, NIC-NO<sub>2</sub> was activated *in situ* (NIC<sub>activated</sub>) on the MWCNT directly placed on glassy carbon electrode GCE surface, generating a stable redox-active nitroso/hydroxylamine system (NIC-NHOH/NIC-NO,  $E^\circ = -0.09$  vs. Ag/AgCl) followed by a second and reversible pair of peaks ( $E^\circ = +0.15$  vs. Ag/AgCl), both stable on the nanostructured platform. Only the redox couple (NIC-NHOH/NIC-NO) showed electrocatalytic activity for the oxidation of NADH and in the second peak, the net current was not affected in the presence of NADH. The techniques used in this work were cyclic voltammetry and chronoamperometry, used to study the behavior of the modified electrodes, for the attainment of the kinetic parameters and analytical characterization of the nanostructured platform. Chronoamperometric studies were carried out with the aim to get information on the reduction processes and oxidation of NADH, on the nanostructured platform. Through the Cottrell plots it was possible to obtain the values for the diffusion coefficient ( $D_{\text{NADH}}$ ) for the and catalytic constant of the reaction ( $\kappa_{\text{cat}}$ ) toward NADH. The values of the diffusion coefficient and  $\kappa_{\text{cat}}$ , determined for NADH were  $2.5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ,  $8.1 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$ , respectively. The increase of the reaction rate for NADH oxidation was attributed to the efficient electron transfer between the studied specie and immobilized electroactive species on the surface of the nanostructured platform. The sensor provided a linear response range ( $0.1\text{-}3.0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ), limit of detection (LOD) ( $0.029 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ), limit of quantification (LOQ) ( $0.095 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ), sensitivity ( $0.25 \text{ } \mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$ ), detection potential ( $+0.065 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ ) and response time of  $0.2 \text{ s}$  for NADH. From the performance achieved, the platform based on nanostructured MWCNT and NIC<sub>activated</sub>, a new redox catalyst, becomes an excellent environment for configuring new dehydrogenase-based biosensors.

Keywords: Electrochemistry, Organic Chemistry, Physical Chemistry, Niclosamide, Carbon Nanotubes, NADH – Nicotinamide Adenine Dinucleotide.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	<i>Modelo esquemático dos principais componentes de um sensor químico.</i>	22
<b>Figura 2</b>	<i>Número de publicações de artigos científicos em revistas com política editorial seletiva, usando como palavra-chave “sensor” ou “sensors” entre os anos de 2005 a 2010.</i>	23
<b>Figura 3</b>	<i>Modelo esquemático do SWCNT (A) e MWCNT (B).</i>	27
<b>Figura 4</b>	<i>Estrutura química do NADH e NAD(P)H.</i>	29
<b>Figura 5</b>	<i>Oxidação do NADH.</i>	30
<b>Figura 6</b>	<i>Modelo esquemático do uso de mediador para a eletro-oxidação de NADH, em eletrodo modificado com NTC.</i>	31
<b>Figura 7</b>	<i>Esquema da estratégia eletroquímica utilizada para formação do par redox reversível hidroxilamina/nitrosoa partir do grupo nitro.</i>	36
<b>Figura 8</b>	<i>Estrutura química da NICLOSAMIDA.</i>	37
<b>Figura 9</b>	<i>Fotografia de um Potenciostato modelo PGSTAT30Eco Chemie da AUTOLAB.</i>	42

<b>Figura 10</b>	<i>Fotografia do EDR da AUTOLAB.</i>	42
<b>Figura 11</b>	<i>Modelo esquemático da célula eletroquímica utilizada em todos os experimentos.</i>	43
<b>Figura 12</b>	<i>Modelo esquemático das etapas de construção da plataforma nanoestruturada a base de ECV/MWCNT/NIC-NO<sub>2</sub>.</i>	45
<b>Figura 13</b>	<i>Voltamogramas cíclicos obtidos nas 10 primeiras varreduras para um ECV/MWCNT/NIC-NO<sub>2</sub>, <math>\nu = 0,02 \text{ V s}^{-1}</math>. <math>E_{\text{inicial}} = 0,5 \text{ V}</math> e <math>E_{\lambda} = -0,8 \text{ V}</math>, varredura no sentido catódico. Condições empregadas: solução tampão fosfato <math>0,1 \text{ mol L}^{-1}</math>, pH 7,0.</i>	49
<b>Figura 14</b>	<i>Modelo proposto para a reação da niclosamida no ECV/MWCNT. <b>Etapa 1</b> Redução do grupo nitro, formação do par redox (NIC-NHOH/NIC-NO); <b>Etapa 2</b> Formação do dímero; <b>Etapa 3</b> Formação do polímero (*Não estequiométrico).</i>	50
<b>Figura 15</b>	<i>Rotas para polimerização de fenóis (Adaptado de EZERSKIS e JUSYS, 2001).</i>	51
<b>Figura 16</b>	<i>Par redox azoxi/azo eletrogerado a partir da reação intermolecular entre o NIC-NHOH e NIC-NO (ZHANG et al., 2008; ABREU et al., 2002).</i>	53

- Figura 17** Voltamogramas cíclicos obtidos nas 10 primeiras varreduras para um ECV/MWCNT/NIC-NO<sub>2</sub>,  $\nu = 0,02 \text{ V s}^{-1}$ .  $E_{\text{inicial}} = 0,3 \text{ V}$  e  $E_{\lambda} = -0,8 \text{ V}$ , varredura no sentido catódico. Condições empregadas: solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0. 55
- Figura 18** Voltamogramas cíclicos obtidos nas 10 primeiras varreduras para um ECV/MWCNT/NIC-NO<sub>2</sub>,  $\nu = 0,02 \text{ V s}^{-1}$ .  $E_{\text{inicial}} = 0,0 \text{ V}$  e  $E_{\lambda} = 1,0 \text{ V}$ , varredura no sentido anódico. Condições empregadas: solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0. 56
- Figura 19** Voltamogramas cíclicos em ECV/MWCNT/NIC<sub>ativada</sub> em solução de tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0 em diferentes velocidades de varredura ( $0,005\text{-}0,050 \text{ V s}^{-1}$ ),  $E_{\text{inicial}} = -0,4 \text{ V}$  e  $E_{\lambda} = 0,4 \text{ V}$ , varredura no sentido anódico. 58
- Figura 20** Dependência da corrente de pico anódico ( $I_{pa}$ ) e catódico ( $I_{pc}$ ) em função da velocidade de varredura em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0. 59
- Figura 21** Gráfico de Laviron,  $E_p$  vs.  $\log \nu$ . Condições empregadas: solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e pH 7,0. 60
- Figura 22** Representação do esquema redox do sistema (NIC-NHOH/NIC-NO) (**la/lc**) com indicação do  $\kappa_s$  – constante heterogênea de transferência de elétrons. 61
- Figura 23** Efeito do pH no comportamento redox do ECV/MWCNT/NIC<sub>ativada</sub>, voltamogramas obtidos em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e  $\nu = 0,005 \text{ V s}^{-1}$  64

- Figura 24** Potencial formal ( $E^0$ ) do ECV/MWCNT/NIC<sub>ativada</sub> em função do pH. Condições empregadas: solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> e  $v = 0,005 \text{ V s}^{-1}$ . 64
- Figura 25.** Voltamogramas cíclicos em ECV/MWCNT/NIC<sub>ativada</sub> em solução de tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,0,  $v = 0,050 \text{ V s}^{-1}$ .  $E_{inicial} = -0,4 \text{ V}$  e  $E_{\lambda} = 0,4 \text{ V}$ , varredura no sentido anódico. 66
- Figura 26** Voltamogramas cíclicos para o ECV (A), ECV com NIC<sub>ativada</sub> (B), ECV com MWCNT (C), ECV com NIC<sub>ativada</sub> e MWCNT (D) na ausência (a) e na presença de NADH (b). Velocidade de varredura ( $v$ ): 0,005 V s<sup>-1</sup>. Estudos realizados em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH 7,0. 68
- Figura 27** Variação da corrente de pico anódica  $I_{pla}$  vs.  $v^{1/2}$  no ECV/MWCNT/NIC<sub>ativada</sub> em solução contendo 0,4 mmol L<sup>-1</sup> de NADH. Medidas realizadas em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0 e  $v: 0,005-0,015 \text{ V s}^{-1}$ . 69
- Figura 28** Variação da corrente de pico anódica normalizada  $I_{pla}/v^{1/2}$  vs.  $v$  no ECV/MWCNT/NIC<sub>ativada</sub> em solução contendo 0,4 mmol L<sup>-1</sup> de NADH. Medidas realizadas em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0 e  $v: 0,005-0,015 \text{ V s}^{-1}$ . 70
- Figura 29** Modelo simplificado do mecanismo proposto para o processo de oxidação eletrocatalítica do NADH sobre a plataforma ECV/MWCNT/NIC<sub>ativada</sub>. 71

- Figura 30** Cronoamperogramas obtidos no ECV/MWCNT/NIC<sub>ativada</sub> em 73  
solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7 na ausência e  
presença de NADH,  $E_{inicial} = +0,065$  V e  $E_{final} = -0,050$  V vs.  
Ag/AgCl, respectivamente.
- Figura 31** Integração dos cronoamperogramas obtidos no 74  
ECV/MWCNT/NIC<sub>ativada</sub> em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>,  
pH 7 na ausência (a) e presença de NADH (a) 0,01; (b) 0,03;  
(c) 0,04; (d) 0,05 e (f) 0,07 mmol L<sup>-1</sup>,  $E_{inicial} = +0,065$  V e  $E_{final} =$   
 $-0,050$  V vs. Ag/AgCl, respectivamente.
- Figura 32** Gráfico de  $I$  vs.  $t^{-1/2}$  obtidos a partir dos cronoamperogramas da 75  
Figura 30 em ECV/MWCNT/NIC<sub>ativada</sub> em solução tampão  
fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7 na ausência e presença de NADH,  
 $E_{inicial} = +0,065$  V e  $E_{final} = -0,050$  V vs. Ag/AgCl,  
respectivamente.
- Figura 33** Gráfico de inclinação ( $I/t^{1/2}$ ) versus a concentração de NADH 76  
obtidos a partir da Figura 32 do ECV/MWCNT/NIC<sub>ativada</sub> em  
solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7 na ausência e  
presença de NADH,  $E_{inicial} = +0,065$  V e  $E_{final} = -0,050$  V vs.  
Ag/AgCl, respectivamente.
- Figura 34** Dependência de  $I_{cat}/I_{lim}$  vs.  $t^{1/2}$  derivado dos 77  
cronoamperogramas da Figura 30 em ECV/MWCNT/NIC<sub>ativada</sub>  
em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7 na ausência e  
presença de NADH,  $E_{inicial} = +0,065$  V e  $E_{final} = -0,050$  V vs.  
Ag/AgCl, respectivamente.

- Figura 35** Gráfico da inclinação de  $I_{cat}/I_L$  vs. concentração de NADH em 78  
ECV/MWCNT/NIC<sub>ativada</sub> em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ,  
pH 7 na ausência e presença de NADH,  $E_{inicial} = +0,065 \text{ V}$  e  
 $E_{final} = -0,050 \text{ V}$  vs. Ag/AgCl, respectivamente.
- Figura 36** Corrente em função do potencial aplicado para o 79  
ECV/MWCNT/NIC<sub>ativada</sub>, em presença de  $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  
NADH. Condições utilizadas, tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH  
7,0.
- Figura 37** Medidas cronoamperométricas para a eletrooxidação de 80  
NADH no ECV/MWCNT/NIC<sub>ativada</sub> obtidas em tampão fosfato  
 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em pH 7,0 e [NADH]: (1)0,1-(20)18,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .  
**Inserção:** Ampliação de degrau do amperograma  
correspondente a alíquota de número 9 de NADH, a qual foi  
usada para calcular o tempo de resposta do sensor.
- Figura 38** Curva analítica para a eletrooxidação de NADH no 81  
ECV/MWCNT/NIC<sub>ativada</sub> em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em pH  
7,0  $E_{aplicado} = +0,065 \text{ V}$  vs. Ag/AgCl. **Inserção:** Faixa linear de  
resposta do sensor.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	<i>Comparação do desempenho de alguns eletrodos modificados usados na eletrocatalise de NADH.</i>	33
<b>Tabela 2</b>	<i>Parâmetros eletroquímicos e cinéticos de alguns eletrodos modificados.</i>	62
<b>Tabela 3</b>	<i>Parâmetros eletroquímicos e analíticos de eletrodos modificados escolhidos.</i>	83

## LISTA DE ABREVIATURAS

DPR	Desvio padrão relativo
ECV	Eletrodo de carbono vítreo
EDR	Eletrodo de disco rotatório
EPC	Eletrodo de pasta de carbono
EQM	Eletrodo quimicamente modificado
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MED	Mediador
MWCNT	Nanotubos de carbono de paredes múltiplas
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
NAD(P)H	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NTC	Nanotubos de carbono
SWCNT	Nanotubos de carbono de paredes simples

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	Coeficiente de transferência de elétrons
$\Delta E_p$	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
$D$	Coeficiente de difusão
$E$	Potencial
$n$	Número de elétrons
$E^{\circ}$	Potencial formal
$E_{\lambda}$	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 <i>Faraday</i>
$I$	Corrente
$k_{cat}$	Constante de velocidade da reação
$N$	Número total de elétrons
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
NIC-NHOH	Hidroxilaminaniclosamida
NIC-NO <sub>2</sub>	Niclosamida
NIC-NO	Nitrosaniclosamida
NIC <sub>ativada</sub>	Niclosamida após redução do grupo nitro
$Q$	Carga
$R$	Constante universal dos gases
$R$	Coeficiente de correlação
$\sigma$	Desvio padrão
$T$	Temperatura
$\nu$	Velocidade de varredura de potencial

## **SUMÁRIO**

### **RESUMO**

### **ABSTRACT**

### **LISTA DE FIGURAS**

### **LISTA DE TABELAS**

### **LISTA DE ABREVIATURAS**

### **LISTA DE SÍMBOLOS**

## **INTRODUÇÃO**

I. Introdução	20
I.1 Considerações Gerais	20
I.2 Sensores Químicos	21
I.3 Modificação da superfície para o Desenvolvimento de Sensores	24
I.4 Sensores Eletroquímicos	25
I.5 Os Nanotubos de Carbono (NTC)	27
I.6 A Importância da Detecção de NADH	28
I.7 Mediadores Redox: Um Panorama Resumido	31
I.8 Niclosamida	37

## **OBJETIVOS**

II Objetivos	39
II.1 Geral	39
II.2 Específicos	39

## **PARTE EXPERIMENTAL**

III Parte Experimental	41
III.1 Reagentes	41
III.2 Equipamentos e Materiais	41
III.3 Métodos	43
III.3.1 Preparação de solução de Niclosamida	43

III.3.2	Preparação da dispersão de MWCNT	43
III.3.3	Limpeza do eletrodo de carbono vítreo (ECV)	44
III.3.4	Modificação do eletrodo de carbono vítreo com MWCNT e NIC-NO <sub>2</sub>	44
III.3.5	Processo de Ativação da NIC-NO <sub>2</sub> sobre a Plataforma Nanoestruturada Fundamentada em ECV e MWCNT	45
III.3.6	Estudo de Eletrocatalise do ECV/MWCNT/NIC <sub>ativada</sub> e NADH	46
III.3.7	Determinação da área ativa	46
III.3.8	Estudo da estabilidade e tempo de vida do sensor	46
III.3.9	Estudo de repetibilidade do preparo do sensor	47

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV	Resultados e Discussão	48
IV.1	Sensor Amperométrico à Base de ECV Modificado com MWCNT e NIC-NO <sub>2</sub>	48
IV.1.1	Ativação e Caracterização do Par Redox	48
IV.1.2	Mecanismo de Ativação do ECV/MWCNT/NIC-NO <sub>2</sub>	54
IV.1.3	Características Cinéticas do ECV/MWCNT/NIC <sub>ativada</sub>	57
IV.1.4	Estudos de Estabilidade da Plataforma ECV/MWCNT/NIC <sub>ativada</sub>	65
IV.1.5	Estudo da Eletrooxidação de NADH pelo ECV/MWCNT/NIC <sub>ativada</sub>	66
IV.1.6	Estudos Cronoamperométricos	72
IV.1.7	Detecção amperométrica de NADH	78

## CONCLUSÃO

V	Conclusões Gerais	84
---	-------------------	----

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VI	Referências Bibliográficas	85
----	----------------------------	----

## PERSPECTIVAS

VII	Perspectivas	95
-----	--------------	----

# I. INTRODUÇÃO

## I.1. Considerações Gerais

A eletroquímica estuda fundamentalmente sistemas interfaciais. Assim, é de suma importância o conhecimento dos fluxos de carga e massa através da interface eletrodo/solução no que tange ao entendimento molecular tanto da relação entre estrutura quanto no que diz respeito à natureza físico-química das espécies que participam da reação, bem como o fenômeno eletroquímico em si, tais como parâmetros que afetam a transferência de carga (VARELA *et al.*, 2000).

A Eletroquímica é uma área de desenvolvimento que vem conquistando espaço nos mais diversos campos de aplicações da ciência, devido ao seu baixo custo de operação, à extensa aplicabilidade analítica, com características vantajosas como a elevada sensibilidade das determinações e portabilidade (BRETT e BRETT, 1998; BARD e FAULKNER, 2001) bem como também a sua utilização como ferramenta de estudo nos inúmeros fenômenos envolvendo transferência de elétrons (PEREIRA *et al.*, 2003). Além disso, destaca-se pela facilidade de automação em virtude da medição de sinais elétricos, a possibilidade de proceder à especiação de íons metálicos em certos casos e a “compatibilidade ambiental”, pois o principal reagente empregado é o elétron, conferindo, aos métodos eletroanalíticos uma posição de destaque no contexto da Química Analítica.

Além disso, a sensibilidade das determinações não é comprometida pela redução do tamanho do sensor ou da célula, como é o caso dos métodos espectroscópicos, uma vez que a reação de interesse ocorre na região interfacial eletrodo/solução e, conseqüentemente, não depende do volume da amostra (SANTHIAGO *et al.*, 2009).

A presente dissertação relata de forma simples a construção de uma plataforma nanoestruturada simples para uso em finalidades eletroanalíticas. A seguir, são discutidos, resumidamente, os componentes principais dos sensores químicos.

## I.2. Sensores Químicos

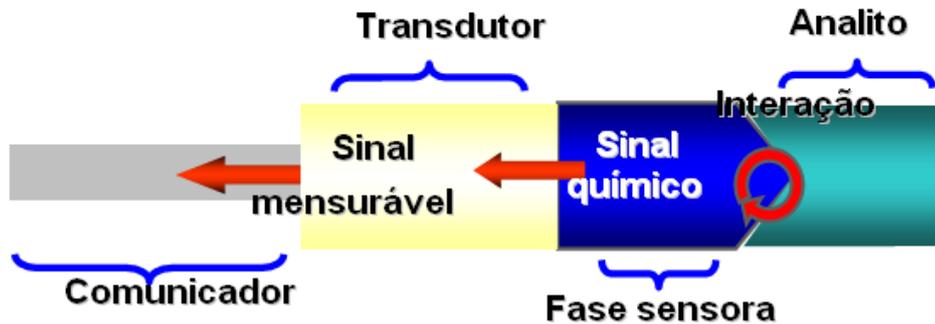
Sensor químico é um dispositivo que transforma informações químicas, como a concentração de um componente específico da amostra em relação a sua composição total, em um sinal analiticamente mensurável (WANG, 2000; THÉVENOT *et al.*, 2001).

São, portanto, dispositivos que apresentam uma interface (reconhedora) onde ocorrem fenômenos químicos, a qual está ligada ao transdutor físico-químico que transforma uma informação química, oriunda de um sistema (analito), em um sinal analítico útil.

A informação obtida no instrumento de medida pode estar relacionada a uma reação química ou mesmo a uma propriedade química do analito. Os sensores químicos apresentam três partes básicas: o receptor ou fase sensora, região reconhedora onde ocorre a reação química seletiva; o transdutor, que traduz o sinal químico gerado pela reação em um sinal mensurável e o condutor, que transporta o sinal para a instrumentação de medida.

A fase sensora pode ser um corante ácido/básico, um trocador iônico, uma substância redox, uma substância fluorescente, um anticorpo, etc (THÉVENOT *et al.*, 2001) enquanto que o transdutor pode ser classificado como: eletroquímico (corrente, condutividade, potencial), óptico (absorção, fluorescência, reflectância), calorimétricos (calor), piezométrico (alteração de massa). O transdutor, sensível a essas variações, converterá a energia do evento numa forma mensurável em um grande número de modalidades de energia.

A Figura 1 mostra um modelo esquemático dos principais componentes de um sensor químico, onde ocorre interação entre o analito e a fase sensora. Esta interação poderá causar uma variação na concentração, por exemplo, de prótons, íons específicos, transferência de elétrons, liberação ou absorção de gases (tais como:  $H_2$ ,  $O_2$ ,  $NH_3$ , etc.). Além disso, poderá através deste evento apresentar uma mudança de algum parâmetro óptico do sistema, como cor, índice de refração, por exemplo, que podem ser monitoradas tanto qualitativa quanto quantitativamente.

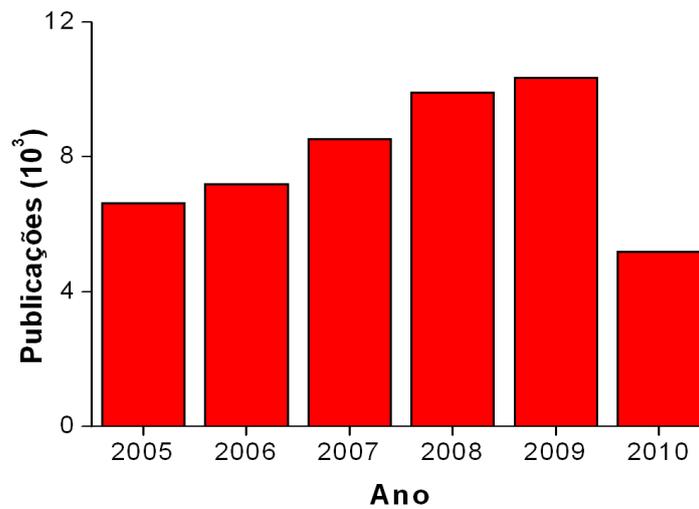


**Figura 1** Modelo esquemático dos principais componentes de um sensor químico.

Neste sentido, sensores químicos permitem a coleta de dados e a obtenção de informações com manipulação mínima do sistema estudado. Estes dispositivos possuem características particulares que os distinguem de métodos instrumentais de largo porte, os quais, por sua vez, são cada vez mais precisos, sensíveis e seletivos, mas não permitem a obtenção de informações *in situ* e em tempo real.

Nestas condições experimentais, dados são facilmente obtidos com sensores e, mesmo que as medidas não tenham precisão e exatidão comparáveis às dos métodos instrumentais, em muitas ocasiões têm-se elementos suficientes para diagnosticar o sistema em estudo. Características vantajosas também inerentes ao uso de sensores químicos referem-se à portabilidade, facilidade de automação, possibilidade de miniaturização e baixo custo.

Fica evidente, que dentre os sensores químicos, há várias classificações possíveis as quais podem se basear no tamanho, tipo de aplicação ou mecanismo de transdução da resposta. Assim, de acordo com o banco de dados do ISI Web of Knowledge<sup>SM</sup>, aproximadamente 50.000 artigos científicos foram publicados contendo a palavra-chave “sensor” ou “sensors”, entre os anos 2005 e 2010 (Figura 2). Estes trabalhos referem-se a investigações com sensores de diversos tipos e incluem transdução potenciométrica, amperométrica, piezelétrica, óptica, térmica, condutométrica, entre outras, ratificando mais uma vez a importância do campo de desenvolvimento de sensores.



**Figura 2** Número de publicações de artigos científicos em revistas com política editorial seletiva, usando como palavra-chave “sensor” ou “sensors” entre os anos de 2005 a 2010.

Diante do que foi colocado a respeito dos sensores químicos, verifica-se que o tópico é de alta complexidade e a área científica muito fértil, não sendo possível, nesse trabalho, o seu aprofundamento.

Nessa dissertação dar-se-á maior ênfase ao desenvolvimento de dispositivos que utilizam o transdutor eletroquímico (amperométrico e voltamétrico), particularmente, para a determinação de coenzimas, como por exemplo, a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), bem como as devidas justificativas para sua escolha.

### I.3. Modificação da superfície para o Desenvolvimento de Sensores

O uso de reagentes acoplados ao transdutor, processo denominado de imobilização, tem como objetivo pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo-solução, sendo, portanto, uma forma de adaptar e controlar sua reatividade e/ou seletividade, possibilitando o desenvolvimento de sensores químicos para vários propósitos e aplicações. Além dessas características, pode-se destacar a simplicidade de construção, degradação mínima do analito, entre outras, como citado anteriormente neste trabalho.

Deve-se ressaltar também, que o bom desempenho do sensor dependerá de vários fatores tanto a partir de uma eficiente imobilização do reagente, considerando suas características mecânicas e químicas (tais como: aderência ao suporte, fácil manuseio, tempo de preparo, estabilidade ao ambiente e durabilidade) quanto à técnica empregada, como por exemplo, eletroquímica, óptica, piezométrica, etc.

Várias metodologias para incorporação de reagentes têm sido propostas para o desenvolvimento de sensores, como adsorção (SILVA *et al.*, 2010), utilização de pasta de carbono (LIMA *et al.*, 2008b), formação de ligação covalente (SANTHIAGO *et al.*, 2009), formação de polímeros (YANG e LIU, 2009) e formação de monocamadas auto-organizadas (“SAM - *self assembled monolayers*”) (DANIEL *et al.*, 2007).

O desempenho do sensor está intimamente ligado à espécie a ser usada durante o processo de imobilização, melhorando assim, a reversibilidade de um processo, inerente aos sensores eletroquímicos, com o objetivo de aumentar a sensibilidade e seletividade, minimizar ou eliminar a interferência de espécies indesejáveis que possam alterar a resposta do dispositivo, válido para todos os tipos de sensores químicos.

Para justificar o uso de reagentes na interface transdutora é preciso que o sensor agregue essas características desejadas para que sua aplicação na determinação de espécies nos diferentes meios seja realizada com êxito. São mostrados a seguir o desenvolvimento e aplicações desses sensores químicos, particularmente, os eletroquímicos.

#### I.4. Sensores Eletroquímicos

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 para análises de amostras complexas, seja de origem biológica ou ambiental, o qual tem levado a uma crescente busca por sensores com melhores características (WANG, 2000).

Os sensores eletroquímicos fazem uso do eletrodo como dispositivo transdutor de sinal e baseiam-se em reações de transferência de carga (processos faradaicos), ou em fenômenos de migração de cargas (processos não faradáticos) (BARD e FAULKNER, 2001).

Apesar da grande versatilidade e perspectivas apresentadas pelos sensores eletroquímicos, a utilidade de um eletrodo é muitas vezes limitada devido a uma passivação gradual de sua superfície, que é consequência principalmente da adsorção dos produtos da própria reação de óxido-redução utilizada na detecção, ou ainda, dos sub-produtos destas reações que podem se polimerizar e se depositar sobre a superfície dos eletrodos (ROSATTO *et al.*, 2001).

A sensibilidade de muitos analitos importantes pode ser prejudicada em função da cinética de transferência de elétrons entre estes compostos e os materiais dos eletrodos ser excessivamente lenta. Outra limitação é a dificuldade de discriminar entre compostos alvos que possuam características redox similares (WANG, 1991).

Uma área que oferece grande potencial para minimizar os problemas acima descritos, e conseqüentemente permite aumentar a aplicabilidade e eficiência dos sensores eletroquímicos, é a que compreende os chamados eletrodos quimicamente modificados (EQM) (WANG, 1991). A habilidade para controlar e manipular deliberadamente as propriedades das superfícies dos eletrodos pode proporcionar uma variedade de efeitos atrativos, levando a superfície com características que podem contornar efetivamente muitos dos problemas apresentados pelos sensores eletroquímicos tradicionais.

A escolha do material para o eletrodo base, cuja superfície sofre modificação, é um aspecto muito importante da preparação de um EQM. Este substrato deve apresentar características eletroquímicas apropriadas e também ser adequado para o método de imobilização selecionado. Entre os materiais convencionais podemos citar ouro, platina, carbono, carbono vítreo, fibras de carbono e pasta de carbono.

Além disso, diversos materiais vêm sendo explorados para configurações de novas interfaces nanoestruturadas fundamentadas em nanotubos de carbono (NTC), o qual tem ganhado notoriedade pelas inovações obtidas, particularmente, no segmento de desenvolvimento de sensores químicos, agregando ótimo desempenho durante a empregabilidade destes dispositivos para finalidades práticas.

Uma das razões para escolha de nanotubos de carbono (NTC) para o desenvolvimento de dispositivos nanoestruturados, diz respeito à possibilidade de imobilização de substâncias com grupos funcionais dos mais variados, apresentando comportamento eletroquímico com ótimas características (ZENG *et al.*, 2002).

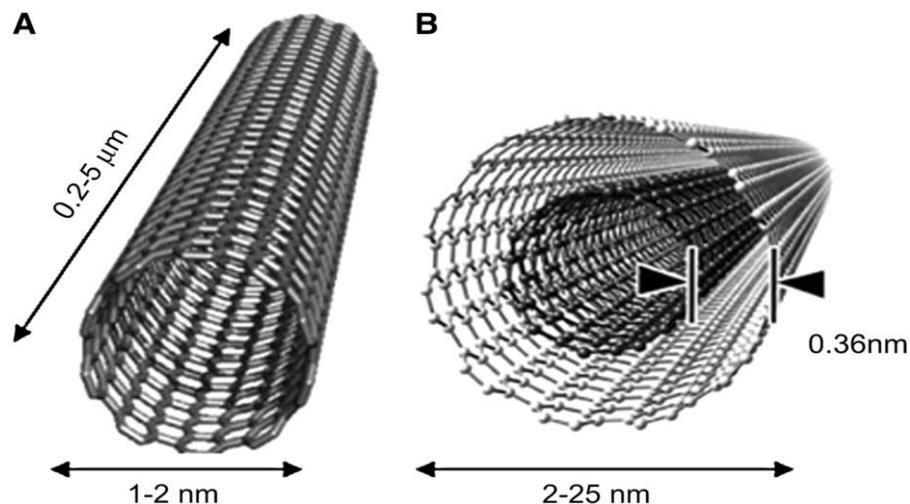
Neste sentido, é discutido, de forma pormenorizada, o estado da arte destes materiais, apontando as inovações.

## I.5 Os Nanotubos de Carbono (NTC)

Desde sua descoberta por Sumio Iijima (IJIMA, 1991) estes novos materiais de carbono nanoestruturados vêm despertando grande atenção pela comunidade científica, justificando suas inúmeras aplicações. Pode-se citar sua utilização como catalisadores, materiais compósitos, sensores, pontas para microscópio de força atômica, filmes condutores, materiais nano-biotecnológicos e dispositivos nanoeletrônicos (RUBIANES e RIVAS, 2005; WANG *et al.*, 2009).

Os NTC podem ser definidos como fios em escala molecular, sendo divididos em nanotubos de carbono de parede única (SWCNT, do inglês *single-wall carbon nanotubes*) de diâmetros de 1 a 2 nm e nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT, do inglês *multi-wall carbon nanotubes*) (NOSSOL, 2009) de diâmetro de 2 a 25 nm dependendo do número de camadas na parede dos nanotubos (KRIVENKO *et al.*, 2005), além de possuírem comprimentos de vários micrômetros.

Assim, os SWCNTs possuem uma nanoestrutura cilíndrica formada de uma única folha de grafeno enrolada na forma de um tubo. Por outro lado, os MWCNT são formados por várias camadas de cilindros de grafite que são concêntricamente alinhadas, na forma de um tronco de árvore como observado na Figura 3.



**Figura I.3.** Modelo esquemático do SWCNT (A) e MWCNT (B).

Os MWCNT's são produzidos com baixo custo para muitas aplicações. Devido às suas propriedades, tais como alta condutividade elétrica, excelente estabilidade química, apresentam um amplo potencial de aplicação como componentes eletrônicos moleculares (KRIVENKO *et al.*, 2005). Particularmente, a diminuição da resistência à transferência de carga (MINNIKANTI *et al.*, 2009; ZHOU *et al.*, 2008; XIANG *et al.*, 2008), a possibilidade de funcionalização devido a presença de grupos carboxílicos (XIA *et al.*, 2009) e aumento na área de superfície (SUNI, 2008) têm sido as principais razões para o emprego dos NTC com foco no desenvolvimento de sensores químicos.

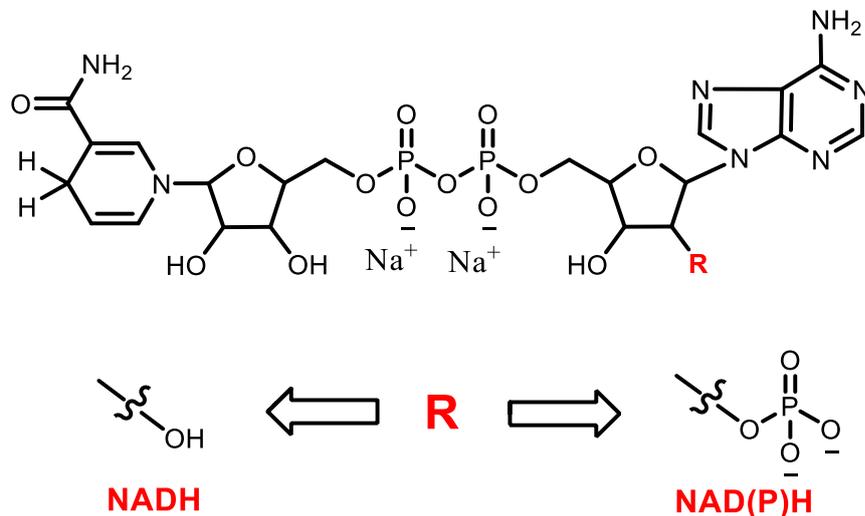
Estes novos materiais permitem a imobilização de mediadores tanto de origem biológica, quanto inorgânica ou orgânica, apresentando comportamento eletroquímico com ótimas características (SOTIROPOULOU *et al.*, 2003), bem como alta estabilidade, item imprescindível para um ótimo desempenho de sensores químicos a base destes materiais, garantindo, portanto, viabilidade operacional e confiabilidade dos resultados durante as análises.

Os NTC podem doar ou receber elétrons em uma ampla janela de potencial, de -1,0 V a 1,2 V vs. Ag/AgCl, em solução tampão fosfato (GHALKHANI e SHAHROKHIAN, 2010; GLIGOR *et al.*, 2009), viabilizando seu emprego também como mediadores em reações de transferência de elétrons. Assim, se o componente é inorgânico ou biológico, como por exemplo, enzima, coenzima, DNA, anticorpos, metaloporfirinas, puder ser imobilizado diretamente nos NTC, então a transdução e mediação podem ser alcançadas ao mesmo tempo, justificando a sua versatilidade.

## **I.6. A Importância da Detecção de NADH**

A nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e NAD(P)H (grupo fosfato substituindo o grupo hidroxila) são coenzimas essenciais em mais de 400 processos enzimáticos (250 dependentes do NADH e 150 do NAD(P)H). Estas coenzimas catalisam a oxidação de metabólitos, servem como aceptor/doador de elétrons e com isso, são cruciais no transporte de elétrons em sistemas biológicos (SANTHIAGO *et al.*, 2009; LIMA *et al.*, 2008a; SILVA *et al.*, 2010).

A compreensão das reações de transferência de elétrons entre as coenzimas e o eletrodo é complicada, uma vez que, devem ser levados em consideração, o tamanho, os diferentes tipos de interações e a orientação da enzima depositada sobre a superfície do eletrodo. Dessa forma, o estudo do comportamento eletroquímico das coenzimas, sem a presença de enzima, tanto em solução como imobilizados sobre diferentes materiais eletródicos é de fundamental importância para o desenvolvimento de biossensores NADH dependentes (SANTOS *et al.*, 2005ab; PEREIRA *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2005; ZHANG e GORSKI, 2005; VASANTHA e CHEN, 2006; NASSEF *et al.*, 2006; ZENG *et al.*, 2006; RAJ e CHAKRABORTY, 2007; LIU *et al.*, 2006; ZHAI *et al.*, 2006).

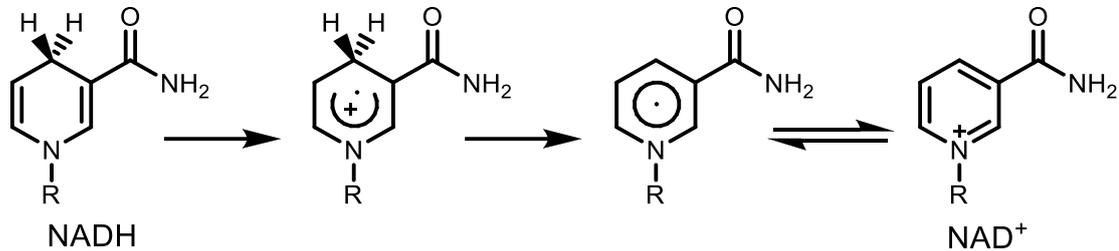


**Figura 4** Estrutura química do NADH e NAD(P)H.

A detecção do NADH em fluidos biológicos é particularmente importante porque permite a determinação indireta de várias substâncias não eletroativas presentes *in vivo*. Em virtude disso, um grande número de pesquisas visando o desenvolvimento de procedimentos analíticos para a determinação de NADH (Figura 4) tem sido realizado (BARTHUS *et al.*, 2005).

O NADH sofre oxidação para a produção de NAD<sup>+</sup> com perda de dois elétrons. O mecanismo desta oxidação é complexo, depende de potenciais elevados

e o produto da oxidação pode bloquear a superfície do eletrodo, Figura 5 (RADOI e COMPAGNONE, 2009).



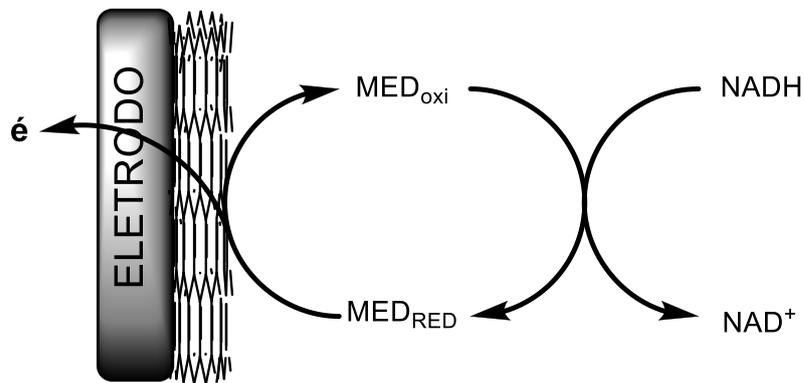
**Figura 5** Oxidação do NADH.

O potencial formal do par NAD<sup>+</sup>/NADH em eletrodos não modificados é de aproximadamente 1,0 V vs. Ag/AgCl e ocorre de forma irreversível, o que o torna pouco atraente para uso em desidrogenases para fins eletroanalíticos. Além disso, pode ocorrer a passivação do eletrodo causada pelos radicais intermediários produzidos na oxidação de NADH (FOTOUHI *et al.*, 2010).

Para tentar contornar esses problemas, vários estudos têm enfatizado o uso de mediadores redox de várias classes como quinonas (SILVA *et al.*, 2010), nitroaromáticos (MANO e KUHN, 2001a; LIMA *et al.*, 2008a; SANTHIAGO *et al.*, 2009), complexos de metais de transição (SANTOS *et al.*, 2002b; PEREIRA *et al.*, 2003), nanopartículas metálicas (DENG *et al.*, 2008a), corantes (SANTOS *et al.*, 2002a; ZHU *et al.*, 2007a), entre outros. As razões para o uso desses mediadores na interface são discutidas a seguir.

## I.7. Mediadores Redox: Um Panorama Resumido

Os mediadores redox podem ser definidos como qualquer tipo de substância que facilite a transferência de elétrons entre a espécie de interesse e a superfície do eletrodo. Servem como uma ponte, transferindo elétrons provenientes da oxidação do NADH para o eletrodo de forma mais rápida, além de possibilitar a diminuição do sobrepotencial requerido, e na maioria dos casos, aumentam a seletividade do eletrodo ao NADH. Uma representação esquemática dos eletrodos modificados para oxidação de NADH pode ser vista na Figura 6.



**Figura 6** Modelo esquemático do uso de mediador para a eletro-oxidação de NADH, em eletrodo modificado com NTC.

Entre as características básicas que o composto deve apresentar para ser empregado como mediador redox para eletrooxidação de NADH, pode-se destacar:

- (i) Rápida transferência de elétrons entre o mediador imobilizado e o eletrodo ( $\kappa_s$ ),
- (ii) Alto valor de constante da velocidade catalítica da reação ( $\kappa_{cat}$ ),
- (iii) Boa reversibilidade,
- (iv) Potencial formal em baixos sobrepotenciais para evitar a oxidação de possíveis espécies interferentes,

(v) Estável na forma oxidada e reduzida.

Várias aplicações recentes de eletrodos modificados com NTC são baseadas na utilização de um agente mediador redox que, em conjunto com os NTC, melhora as características da reação eletroquímica. O uso de mediadores redox nestes sensores fundamentados em NTC oferecem benefícios em termos de diminuição considerável do sobrepotencial de processos de eletrodo e uma melhoria notável no desempenho do sensor.

Assim, vários eletrodos foram modificados com esse intuito (LUZ *et al.*, 2008; SALIMI *et al.*, 2008; STEGE *et al.*, 2009). Alguns compostos como o ácido xanturênico (SILVA *et al.*, 2010) e complexos de níquel (ZHENG e SONG, 2008), entre outros foram usados como mediadores. A Tabela 1. traz uma revisão apurada da literatura onde é possível encontrar diversas plataformas nanoestruturadas fundamentadas em NTC ou não, com foco na detecção eletrocatalítica de NADH. Por outro lado, a partir de uma análise simples da Tabela 1., notam-se vários problemas com relação às plataformas desenvolvidas, por exemplo, o alto sobrepotencial aplicado para detecção de NADH (ZHANG *et al.*, 2004; VASANTHA e CHEN, 2006; ZHAI *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2007; AGUI *et al.*, 2007; DENG *et al.*, 2008b), originando problemas, principalmente de seletividade, além da baixa sensibilidade (LIU *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2007; HUANG *et al.*, 2007; DENG *et al.*, 2008a; YANG e LIU, 2009). Portanto, é de fundamental importância a busca contínua por novas plataformas à base de novos mediadores, as quais possam contornar tais problemas e garantir viabilidade operacional ao dispositivo desenvolvido.

É importante salientar que mesmo com um número expressivo de publicações na área de sensores, busca-se um sensor que trabalhe na faixa de pH fisiológico, entre 7,0 e 7,4; o  $E$  aplicado deve ser o menos positivo possível, a faixa linear ampla, atingindo concentrações similares às existentes em líquidos biológicos; além disso, busca-se também alta sensibilidade e seletividade, limite de detecção baixo e alta constante catalítica. Na Tabela 1 são destacados os sensores que apresentam as melhores características dentre os parâmetros já citados.

**Tabela 1** Comparação do desempenho de alguns eletrodos modificados usados na eletrocatalise de NADH.

Plataforma	pH	$E_{\text{aplicado}}$ (mV vs. Ag/AgCl)	Faixa linear ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Sensibilidade ( $\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$ )	LD ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Referência
EPC/SN/NA	7,0	45	10-750	0,05	-	(SANTOS <i>et al.</i> , 2002a)
EPC/SN/MB	7,0	<u>-155</u>	10-520	0,05	-	(SANTOS <i>et al.</i> , 2002b)
EPC/SN/RF	7,0	-5	40-800	0,02	7	(PEREIRA <i>et al.</i> , 2003)
ECV/QUIT/MWCNT	7,4	400	5-300	0,04	3	(ZHANG <i>et al.</i> , 2004)
ECV/MWCNT	6,8	0	20-1000	-	0,5	(CHEN <i>et al.</i> , 2004)
ECV/MWCNT/PA	7,2	200	5-1000	-	1	(LIU <i>et al.</i> , 2005)
ECV/QUIT/MWCNT/AZU	7,4	-100	0,5-350	0,01	0,5	(ZHANG e GORSKI, 2005)
ECV/PEDT	7,0	350	10-100	0,05	0,5	(VASANTHA e CHEN, 2006)
ECV/APh	7,0	150	1-10	0,01	0,15	(NASSEF <i>et al.</i> , 2006)
ECV/MWCNT/PTBO	7,0	45	2-4500	-	0,5	(ZENG <i>et al.</i> , 2006)
ECV/Nafion/MWCNT/DHB	7,2	-50	0,5-400	0,011	0,1	(RAJ <i>et al.</i> , 2006)
ECV/PAA-MWCNT	7,4	130	4-100	0,008	1	(LIU <i>et al.</i> , 2006)

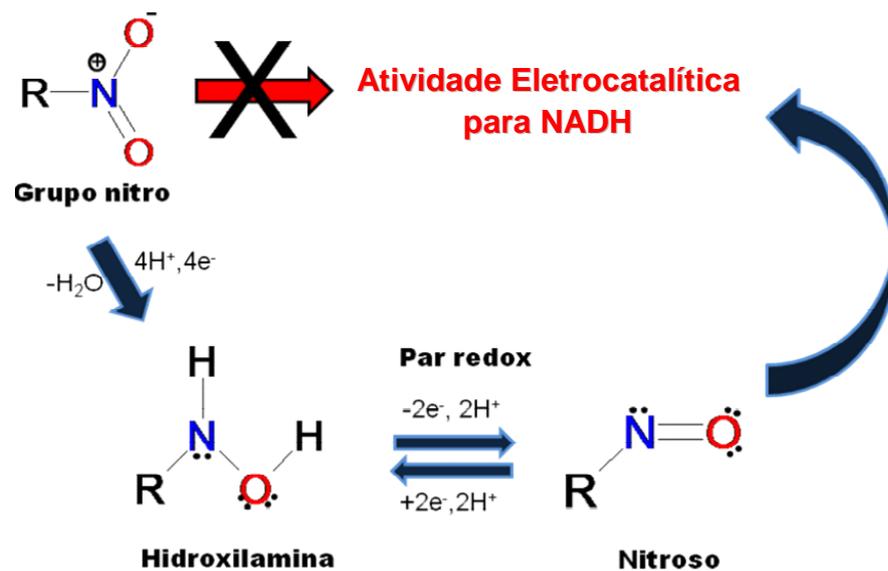
ECV/MWCNT/QUIT	7,0	400	0,8-1600	-	0,3	(ZHAI <i>et al.</i> , 2006)
EC/MWNTs/BMIM·BF <sub>4</sub> /QUIT	6,8	300	0,2-26	0,0844	0,06	(WANG <i>et al.</i> , 2007)
ECV/SWCNT/MB	6,85	-100	0-500	0,00052	0,048	(ZHU <i>et al.</i> , 2007a)
ECV/PABS	6,4	200	10-300	-	1	(KUMAR E CHEN, 2007)
ECV/MWCNT/PDAB	7,0	70	<u>2-4000</u>	-	0,5	(ZENG <i>et al.</i> , 2007)
ECV/MWCNT/T/Nafion	7,0	-100	2-400	0,0047	1	(HUANG <i>et al.</i> , 2007)
ECV/MWCNT/PMT	7,0	300	0,5-20	-	0,17	(AGUI <i>et al.</i> , 2007)
ECV/MWCNT	7,2	-140	0-80	0,13	0,5	(CHAKRABORTY E RAJ, 2007)
E Au/MWCNT/PDA	7,0	250	0-0,3	-	6,4x10 <sup>-3</sup>	(TU <i>et al.</i> , 2007)
EPC/MWCNT/TCBQ	7,5	150	0,5-2160	0,32	0,15	(LUZ <i>et al.</i> , 2008)
EPC/4-NPHN	7,0	100	0,8-8,5	<u>0,5</u>	0,25	(LIMA <i>et al.</i> , 2008a)
ITO/MWCNT/Au/T	7,5	200	0,5-237	17x10 <sup>-3</sup>	0,1	(DENG <i>et al.</i> , 2008a)
ECV/MWCNT/B	7,0	300	0-1405	0,017	0,05	(DENG <i>et al.</i> , 2008b)
ECV/MWCNT/3,5-DNBA	7,0	15	4-42	71x10 <sup>-3</sup>	1,2	(SANTHIAGO <i>et al.</i> , 2009)
ECV/SWCNT/BC	7,5	45	3-104,2	9,88x10 <sup>-3</sup>	1	(YANG E LIU, 2009)

EAu/ MWCNT/QUIT/DA	7,0	295	0,1-600	$9,93 \times 10^{-3}$	$12 \times 10^{-3}$	(GE <i>et al.</i> , 2009)
ECV/BPhM	7,0	245	0-100	1,82	2	(GLIGOR <i>et al.</i> , 2009)
EPC/MWCNT/DDF	7,5	0,22	0,01-0,08	0,011	<u><math>0,7 \times 10^{-3}</math></u>	(FOTOUHI <i>et al.</i> , 2010)
ECV/MWCNT/XA	7,0	100	0,5-10	0,22	0,10	(SILVA <i>et al.</i> , 2010)

APh: o-aminofenol; Au: Ouro; AZU: Corante azul; B: Boro; BC: Brilhante cresol; BMIM-BF<sub>4</sub>: (1-butil-3-metilimidazol tetrafluoroborato,); BPhM: Bis-fenoltiazin-3-il metano; DA: Dopamina DAB: 1,2-diaminobenzeno; DDF: 6,7-diidroxi-3-metil-9-tia-4,4a-diazofluoren-2-ona; DHB: 5,5-diidroxi-4,4-bitriptamina; 3,5-DNBA: ácido 3,5-dinitrobenzóico; EAu: Eletrodo de ouro; ECV: eletrodo de carbon vítreo; EPC: Eletrodo de pasta de carbono; ITO: Óxido de índio dopado com estanho; MB: Azul de meldola (8-dimetilamino-2,3-benzofenoxazina); MWCNT: Nanotubos de carbono de paredes multiplas; NA: Azul do Nilo; 4-NPHN: Nitroftalonitrila; PA: Polianilina; PAA: ácido poliacrílico; PABS: Ácido Poli(*p*-aminobenzeno sulfônico); PDA: o-fenildiamina; PDAB: Poli(1,2-diaminobenzeno); PEDT: Poli(3,4-etilenodioxitiofeno); PMT: Poli(metil tiofeno); PTBO: Poli(toluidina azul); QUIT: Quitosana; RF: Riboflavina; SN: Sílica modificada com oxido de nióbio; SWCNT: Nanotubos de carbono de paredes simples; T: Tionina; TCBQ: 2,3,5,6-tetracloro-1,4-benzoquinona; XA: Ácido xanturênico.

No entanto, substâncias que apresentam o grupo funcional nitro ( $R-NO_2$ ) têm se destacado bastante nos últimos anos como modelos para a formação de pares redox que se enquadram nas características desejáveis para um mediador (LIMA *et al.*, 2008a, SANTIAGO *et al.*, 2009).

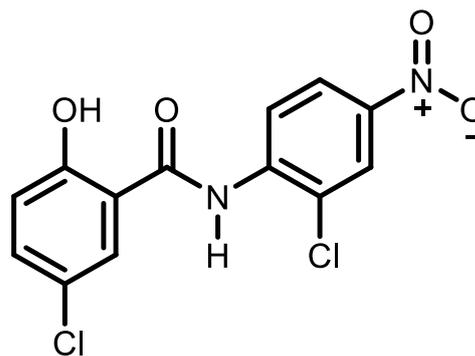
O grupo nitro, no seu estado oxidado e confinado na superfície eletródica, não tem atividade eletrocatalítica para a oxidação de NADH. Por outro lado, quando reduzido eletroquimicamente *in situ*, o grupo nitro é transformado no grupo hidroxilamina ( $R-NHOH$ ). A hidroxilamina formada pode, assim, ser oxidada para nitroso (par  $R-NO/R-NHOH$ ), através de um processo redox envolvendo  $2e^-/2H^+$ , resultando em um par redox estável confinado na superfície do eletrodo, Figura 7. A presente dissertação descreve o uso da niclosamida, um composto nitro aromático como um novo mediador redox para oxidação eletrocatalítica de NADH. A razão para sua escolha centra-se na sua versatilidade estrutural como é descrito a seguir.



**Figura 7** Esquema da estratégia eletroquímica utilizada para formação do par redox reversível hidroxilamina/nitroso a partir do grupo nitro.

## I.8. A Niclosamida

Niclosamida, etanolamina de 5,2'-dicloro-4'-nitrosalicilamida (Figura 8), é um princípio ativo, especialmente desenvolvido para controle dos moluscos (gasteropodos) *Biomphalaria*, de água doce que atuam como hospedeiros intermediários de organismos causadores da esquistossomose (*Schistosoma mansoni*), fasciolose e outras afecções causados por trematodos. Também é indicado para uso humano para controle de teníase (*Taenia solium* e *saginata*) e da himenolepíase (*Hymenolepis nana* e *diminuta*). Causa inibição da fosforilação oxidativa mitocondrial dos cestódios (GOLDSMITH, 1984).



**Figura 8** Estrutura química da NICLOSAMIDA.

A utilização da niclosamida como mediador redox não foi registrada na literatura. Além disso, diferentemente dos nitro compostos reportados na literatura e na perspectiva de desenvolver plataformas altamente estáveis e sensíveis frente ao NADH, a niclosamida apresenta estrategicamente, além do grupo nitro (i), (ii) grupo aromático, que pode interagir fortemente com os NTC, devido à grande área superficial constituída por um sistema de elétrons deslocalizados e com caráter hidrofóbico, sendo portanto, superfícies ideais para interações não covalentes com moléculas via interações de Van der Waals,  $\pi$ - $\pi$  ou hidrofóbicas, (iii) grupo fenol, passível de oxidação, com formação de dímeros e/ou polímeros fortemente aderidos na superfície dos NTC, aumentando a estabilidade do mediador sobre a plataforma,

(iv) grupo amida na posição *para*, a qual se apresenta como um bom grupo eletrorretirador, conferindo, portanto, um caráter mais eletrofílico ao grupo –NO eletrogerado a partir da redução irreversível do grupo nitro, que, por sua vez, sofre ataque nucleofílico do NADH mais eficientemente, aumentando conseqüentemente a eficiência catalítica do sistema. Por ser um composto pouco solúvel em água, há também menor possibilidade de lixiviação, em soluções aquosas.

## II. OBJETIVOS

### II.1. Geral

Este trabalho visa o desenvolvimento de uma nova plataforma nanoestruturada fundamentada em nanotubos de carbono e niclosamida com alta sensibilidade e estabilidade para a detecção eletroquímica de NADH, visando seu emprego na construção de novos biossensores NADH dependentes.

### II.2. Específicos

- i) Estudar o comportamento eletroquímico da plataforma nanoestruturada a base de ECV/MWCNT/NIC<sub>ativada</sub> na ausência de NADH;
- ii) Calcular os parâmetros cinéticos da NIC<sub>ativada</sub> sobre ECV/MWCNT na ausência de NADH;
- iii) Estudar a dependência dos sítios redox em relação ao pH do meio, na ausência de NADH;
- iv) Estudar o comportamento eletrocatalítico da plataforma nanoestruturada a base de ECV/MWCNT/NIC<sub>ativada</sub> no tocante à detecção de NADH;
- v) Investigar os mecanismos das reações eletroquímicas entre os sítios ativos (NIC-NHOH/NIC-NO) da plataforma nanoestruturada e a NADH;
- vi) Calcular os parâmetros cinéticos ( $k_{cat}$ ) da reação entre os sítios ativos (NIC-NHOH/NIC-NO) e NADH;
- vii) Obter uma curva analítica de detecção de NADH sobre a plataforma nanoestruturada;

- viii) Determinar os parâmetros analíticos tais como o LD, LQ, sensibilidade e faixa linear de resposta frente à detecção de NADH sobre a plataforma nanoestruturada;
- ix) Verificar a estabilidade, tempo de vida útil e repetibilidade das medidas e no preparo do sensor;
- x) Comparar os resultados obtidos com outros sensores químicos descritos na literatura.

### III. PARTE EXPERIMENTAL

#### III.1 REAGENTES

Os seguintes reagentes foram obtidos dos seus respectivos fornecedores e utilizados sem qualquer tratamento prévio: niclosamida (etanolamina de 5,2'-dicloro-4'-nitrosalicilanida) ( $326 \text{ g mol}^{-1}$ ) e  $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma reduzida (NADH) foram obtidas 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 *N,N*-dimetilformamida (DMF) foram obtidos da Vetec, nanotubos de carbono de paredes múltiplas (do inglês *multi-walled carbon nanotube*, *MWCNT*) foram obtidos da Sigma.

#### III.2 EQUIPAMENTOS E MATERIAIS

Um potenciostato modelo PGSTAT30 Eco Chemie da AUTOLAB (Utrecht, The Netherlands), interfaceado a um microcomputador (software: GPES 4.9), foi empregado para as medidas eletroquímicas (Figura 9). Além disso, nos estudos amperométricos para obtenção da curva analítica foi empregado um eletrodo de disco rotatório (EDR) (Figura 10), com uma velocidade de rotação otimizada (500 rpm).



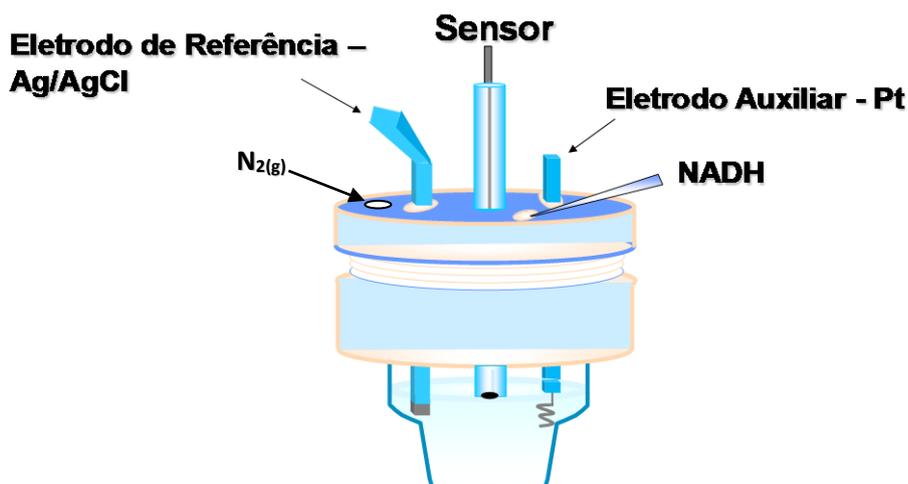
**Figura 9** – Fotografia de um Potenciostato modelo PGSTAT30 Eco Chemie da AUTOLAB.



**Figura 10** – Fotografia do EDR da AUTOLAB.

Uma célula eletroquímica com três eletrodos foi usada, sendo o eletrodo de referência um Ag/AgCl (KCl saturado), um fio de platina como eletrodo auxiliar e um eletrodo de carbono vítreo ( $\phi = 0,3$  mm) com a superfície modificada ou não como eletrodo de trabalho. Estes foram usados para todas as medidas (Figura 11).

As medidas foram realizadas usando 5,0 mL de solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0. A eliminação de oxigênio dissolvido foi feita pelo borbulhamento de um fluxo de nitrogênio (N<sub>2(g)</sub>) nas soluções durante 10 minutos antes das análises.



**Figura 11** - Modelo esquemático da célula eletroquímica utilizada em todos os experimentos.

### III.3 MÉTODOS

#### III.3.1 Preparação de solução de Niclosamida

Em um eppendorf, foi pesado 1,0 mg de niclosamida ( $3,0 \mu\text{mol}$ ) e adicionado 1,0 mL de DMF. Esta solução foi preparada antes das análises e foi utilizada durante até quinze dias. Esta solução foi armazenada em temperatura ambiente.

#### III.3.2 Preparação da dispersão de MWCNT

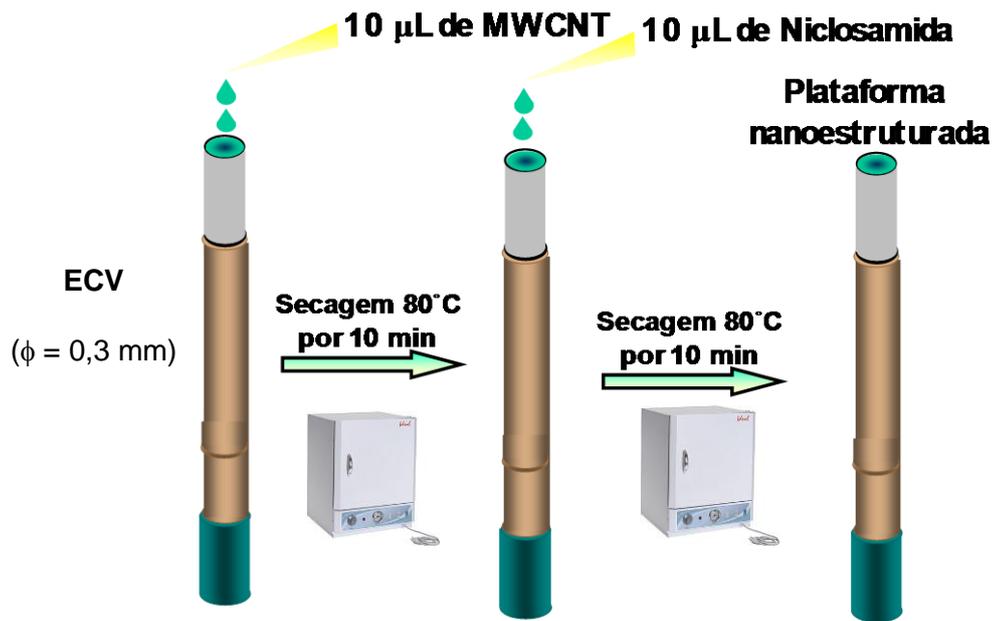
Em um eppendorf, foi pesado 1,0 mg de MWCNT e adicionado 1,0 mL de DMF. Esta solução foi preparada antes das análises e pode ser utilizada durante um mês. Esta dispersão pode ser armazenada em temperatura ambiente e utilizada em outros experimentos.

### III.3.3 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 ferrocianeto de potássio,  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$   $1 \text{ mmol L}^{-1}$  em  $\text{KCl } 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , um sistema reversível, em potenciais adequados. Em seguida, o ECV foi lavado com água milli-Q e secado a temperatura ambiente.

### III.3.4 Modificação do eletrodo de carbono vítreo com MWCNT e NIC-NO<sub>2</sub>

O eppendorf com MWCNT e DMF ficou sob agitação no ultrassom por 2 horas para uma melhor dispersão. Uma alíquota de  $10 \mu\text{L}$  da dispersão de MWCNT foi, então, depositada sobre o ECV. Essa foi secada em estufa a  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 10 min. Em seguida, foi depositada na mesma plataforma uma alíquota de  $10 \mu\text{L}$  da solução de NIC-NO<sub>2</sub>, a qual também foi secada do mesmo modo. O modelo esquemático do processo de montagem da plataforma nanoestruturada é mostrado na Figura 12.



**Figura 12** - Modelo esquemático das etapas de construção da plataforma nanoestruturada à base de ECV/MWCNT/NIC-NO<sub>2</sub>.

### III.3.5 Processo de Ativação da NIC-NO<sub>2</sub> sobre a Plataforma Nanoestruturada Fundamentada em ECV e MWCNT

Após preparação do ECV/MWCNT/NIC-NO<sub>2</sub>, o mesmo foi lavado com água milli-Q e colocado em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0 e ativado (NIC<sub>ativada</sub>), utilizando voltametria cíclica na faixa de potencial entre -0,8 a 0,5 V vs. Ag/AgCl,  $\nu = 0,020 \text{ V s}^{-1}$ , 10 ciclos, no sentido catódico. Após esse procedimento, o eletrodo foi removido da solução, lavado com água milli-Q e colocado em uma nova solução tampão fosfato, pH 7,0.

### III.3.6 Estudo de Eletrocatalise do ECV/MWCNT/NIC<sub>ativada</sub> e NADH

O eletrodo modificado ECV/MWCNT/NIC<sub>ativada</sub> foi imerso em uma solução de tampão fosfato pH 7,0, sob atmosfera de nitrogênio. Em seguida, foram adicionadas alíquotas de NADH em diferentes concentrações e o sinal destas foi comparado com o sinal do branco. Nestes experimentos, foi selecionada uma faixa de potencial entre -0,4 a 0,4 V vs. Ag/AgCl, por voltametria cíclica no sentido catódico, a uma velocidade de varredura 0,005 V s<sup>-1</sup>.

### III.3.7 Determinação da área ativa

A área ativa do ECV/MWCNT/NIC<sub>ativada</sub> foi calculada, utilizando ferricianeto de potássio como sonda eletroquímica e a equação de Randles-Sevcik (Equação III.1):

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

Sendo  $D$  e  $C_o$  o coeficiente de difusão e concentração do ferricianeto de potássio no seio da solução, respectivamente. Experimentos de voltametria cíclica em diferentes velocidades de varredura foram realizados no ECV/MWCNT/NIC<sub>ativada</sub> em uma solução de 1 mmol L<sup>-1</sup> K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] em KCl 0,05 mol L<sup>-1</sup>. A partir das inclinações de  $I_p$  vs.  $\nu^{1/2}$  e utilizando  $D = 7,6 \times 10^{-6}$  cm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>,  $n = 1$  a área ativa foi então obtida, a qual apresentou um valor de 0,13 cm<sup>2</sup> (SANTHIAGO *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2010).

### III.3.8 Estudo da estabilidade e tempo de vida do sensor

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

como 100%. Já para o tempo de vida do eletrodo foram realizadas medidas com o eletrodo modificado por vários meses. Durante o período de avaliação do tempo de vida do sensor, o mesmo foi armazenado a seco, em temperatura ambiente.

### **III.3.9 Estudo de repetibilidade do preparo do sensor**

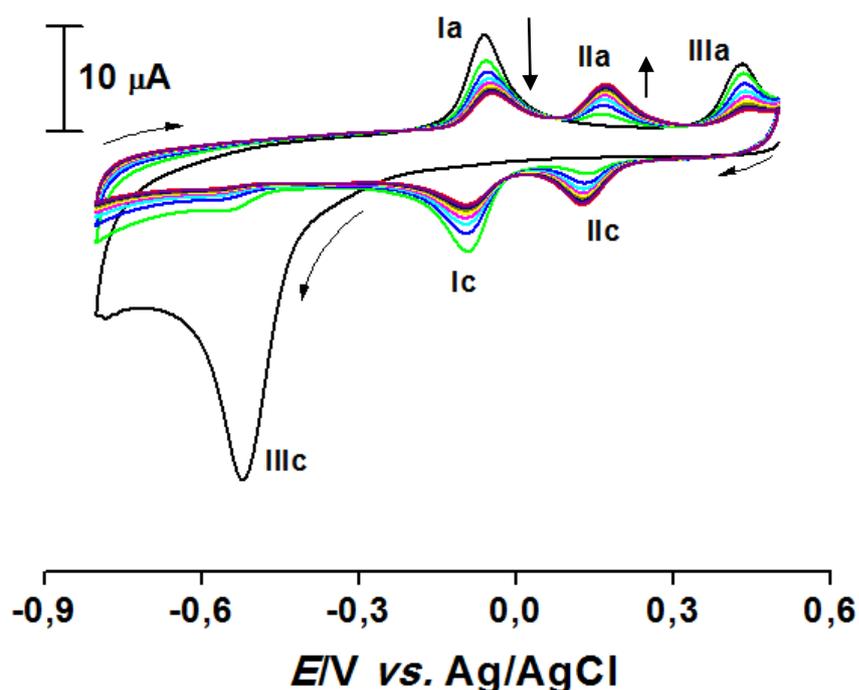
A repetibilidade do preparo do sensor foi investigada através da construção de 10 sensores em dias diferentes e, em seguida, o desvio padrão relativo (DPR) foi calculado para as medidas obtidas com os sensores.

## IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### IV.1. Sensor Amperométrico à Base de ECV Modificado com MWCNT e NIC-NO<sub>2</sub>

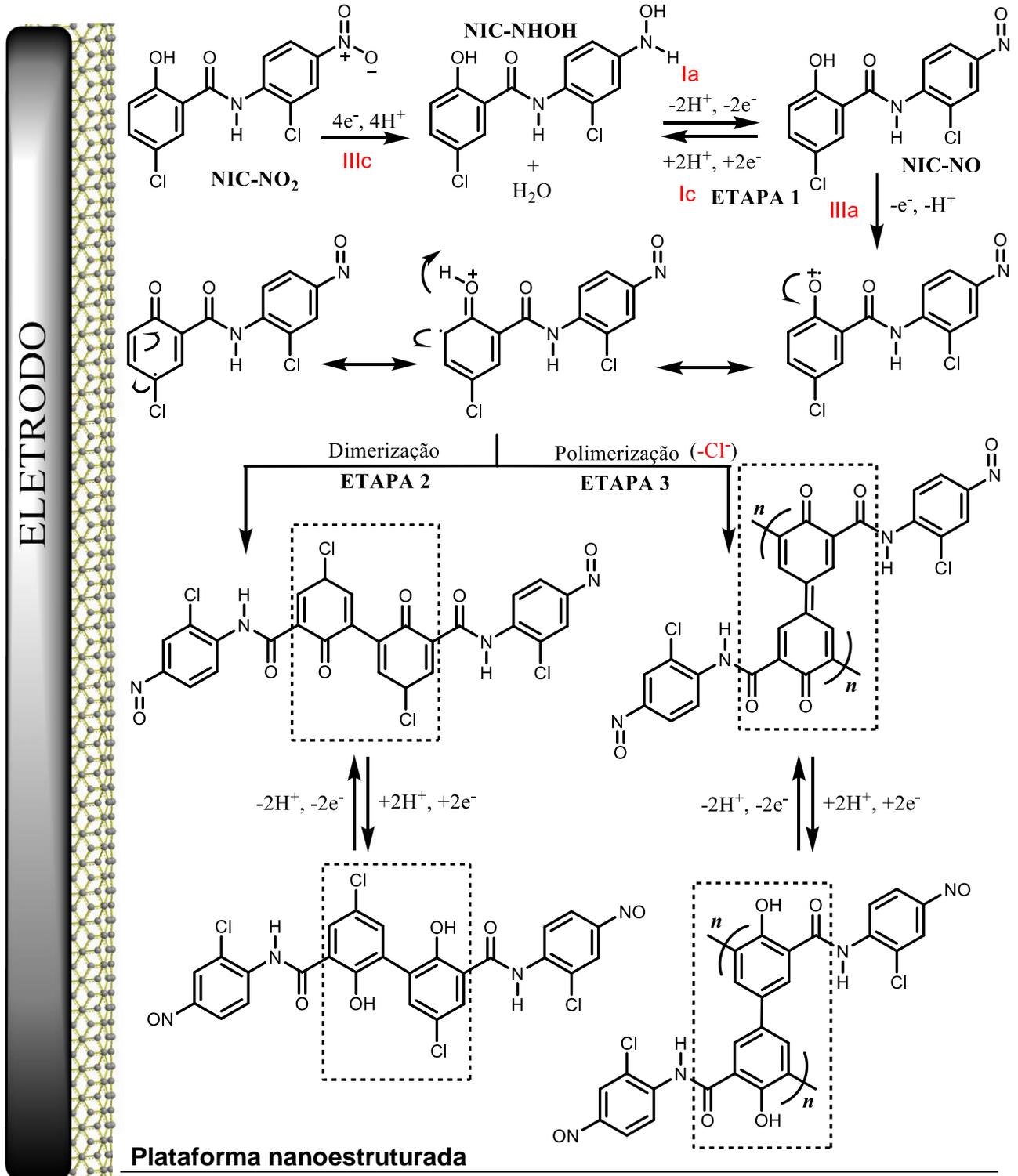
#### IV.1.1. Ativação e Caracterização do Par Redox

Inicialmente, vários estudos foram realizados com o intuito de verificar as propriedades eletroquímicas do ECV/MWCNT/NIC-NO<sub>2</sub>. Assim, a espécie eletroativa, a hidroxilaminaniclosamida (NIC-NHOH), foi eletrogerada *in situ*, diretamente na superfície do ECV modificado com nanotubos de carbono funcionalizados com niclosamida, a partir da redução do grupo nitro da NIC-NO<sub>2</sub>, após varredura na faixa de potencial de 0,5 V a -0,8 V vs. Ag/AgCl (0,1 mol L<sup>-1</sup>), em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0) e velocidade de varredura de potencial ( $v$ ) de 0,02 V s<sup>-1</sup> (Figura 13).



**Figura 13** Voltamogramas cíclicos obtidos nas 10 primeiras varreduras para um ECV/MWCNT/NIC-NO<sub>2</sub>,  $\nu = 0,02 \text{ V s}^{-1}$ .  $E_{\text{inicial}} = 0,5 \text{ V}$  e  $E_{\lambda} = -0,8 \text{ V}$  vs. Ag/AgCl, varredura no sentido catódico. Condições empregadas: solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0.

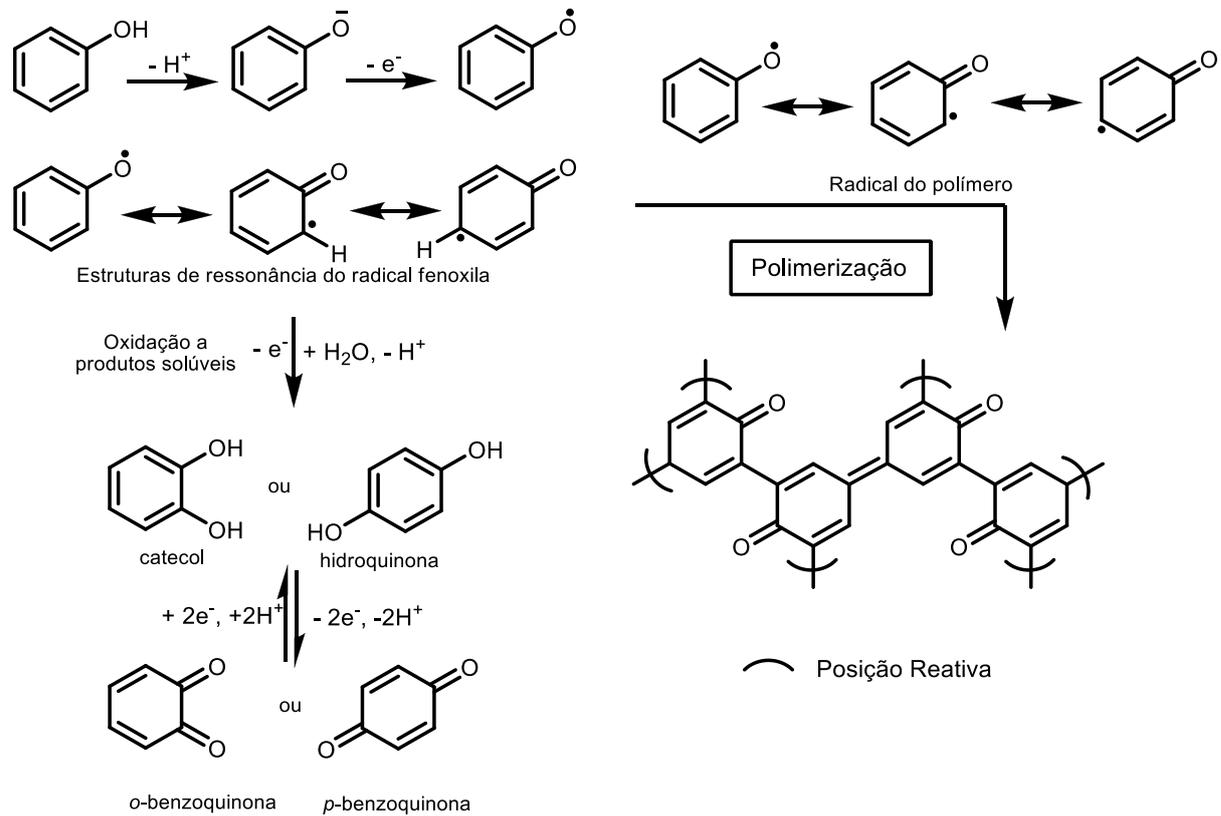
A eletrorredução irreversível do grupo nitro via quatro elétrons e quatro prótons do mediador confinado na superfície, em meio neutro, leva à formação da NIC-NHOH (**IIIc**), que pode ser oxidada reversivelmente ao nitrosoniclosamida (NIC-NO) correspondente, gerando o par redox hidroxilamina/nitroso(**Ia/Ic**) (Figura 14, Etapa 1), em comportamento similar ao que ocorre em solução (Abreu *et al.*, 2002). Além disto, esse tipo de reação de ativação *in situ* foi descrito anteriormente para alguns compostos tais como nitroflurenona (MANO e KUHN, 2001a; MUNTEANU *et al.*, 2004; MANO e KUHN, 2001b), 4-nitroftalonitrila (LIMA *et al.*, 2008a; LIMA *et al.*, 2008b), ácido 3,5-dinitrobenzóico (SANTHIAGO *et al.*, 2009), e para o ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico), na formação de monocamadas auto-organizadas (“SAM - self assembled monolayers”) (RADOI e COMPAGNONE, 2009; SANTHIAGO *et al.*, 2009).



**Figura 14** Modelo proposto para a reação da niclosamida no ECV/MWCNT. **Etapa 1**, Redução do grupo nitro, formação do par redox (NIC-NHOH/NIC-NO); **Etapa 2**, Formação do dímero; **Etapa 3**, Formação do polímero (\*Não estequiométrico).

Observa-se também, na mesma varredura de potencial (1° ciclo), um pico **IIIa** correspondente à oxidação do fenol ( $E_p = 0,43 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ ) presente na estrutura molecular da niclosamida como reportado por Abreu *et al.* (2002). Segundo Abreu, este tipo de reação pode formar filmes não condutores aderentes à superfície eletródica, e, portanto, levar a sua passivação.

Um aumento na concentração do composto fenólico propicia a formação de uma grande quantidade de radicais fenoxila, os quais estão envolvidos no processo de eletropolimerização, causando uma rápida desativação do eletrodo como observado na Figura 15 (EZERSKIS e JUSYS, 2001).



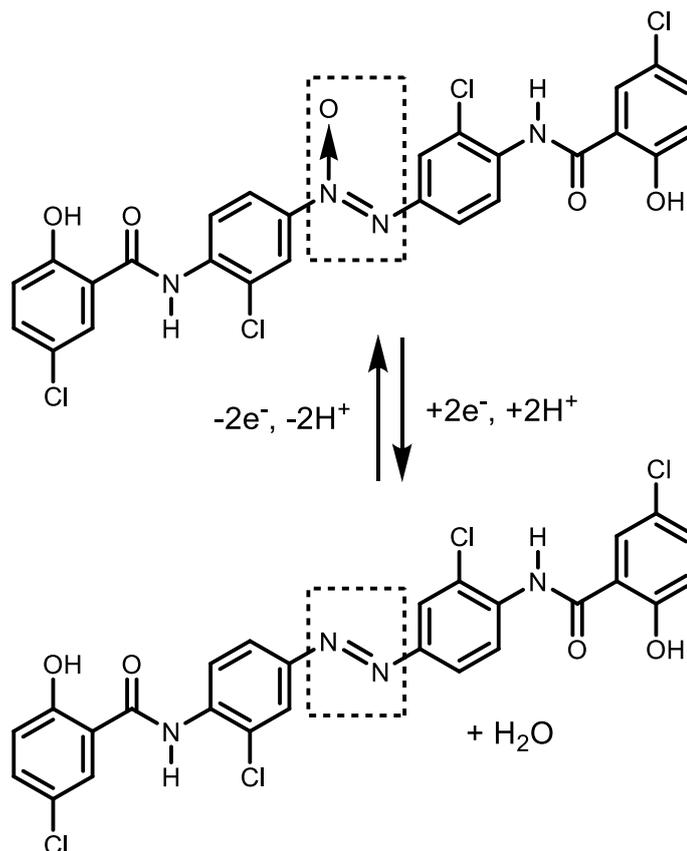
**Figura 15** Rotas para polimerização de fenóis (Adaptado de EZERSKIS e JUSYS, 2001).

Por outro lado, o trabalho reportado por SILVA *et al.* (2010) demonstra que a oxidação de fenóis em posições estratégicas na arquitetura molecular pode formar dímeros/polímeros fortemente adsorvidos na superfície, mas na presença de nanotubos de carbono não ocorre o bloqueio da superfície como reportado por ABREU *et al.* (2002). A explicação para este fato é que o radical formado é estabilizado por ressonância nestas posições. No caso da polimerização, a rota mais favorecida energeticamente para acoplamento é uma estrutura do tipo sandwich, ligando-se pelos carbonos nas posições *para-para* e *orto-orto* (Figura 14, Etapa 2 e/ou 3).

Além disso, há um efeito sinérgico obtido quando esses derivados de fenóis são oxidados sobre plataformas nanoestruturadas a base de nanotubos de carbono, garantindo tanto uma maior estabilidade quanto um ganho considerável de deslocamento para potenciais menos positivos na oxidação de NADH promovido pelos grupos eletroativos (quinona/hidroquinona) presentes como reportado por SILVA *et al.* (2010). Assim sendo, no trabalho de SILVA *et al.* (2010) foi desenvolvida uma plataforma nanoestruturada a base de nanotubos de carbono de paredes múltiplas funcionalizados com poli-ácido xanturênico, a qual foi aplicada para detecção e quantificação de NADH (pH 7,0) em 0,1 V vs. Ag/AgCl.

Na varredura de potencial reversa (2º ciclo, Figura IV.1), observa-se um par de picos redox **IIa/IIc** com  $E^0 = 0,15$  V vs. Ag/AgCl correspondente, provavelmente, a formação de um sistema quinona eletrogerado a partir da oxidação do fenol da niclosamida. Neste contexto, alguns estudos corroboram com esta possibilidade de formação de grupos eletroativos (quinona/hidroquinona) como no trabalho reportado recentemente por SILVA *et al.* (2010).

Por outro lado, vários estudos sobre a eletroquímica de niclosamida em meio prótico, demonstram que a origem possível do par redox **IIa/IIc** é devido a reação intermolecular entre a hidroxilamina e o nitroso eletrogerado a partir do grupo nitro da niclosamida, formando, portanto, derivados do Azoxi (Figura IV.1), como observado na Figura 16 (ABREU *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2008; GHALKHANI *et al.*, 2010).



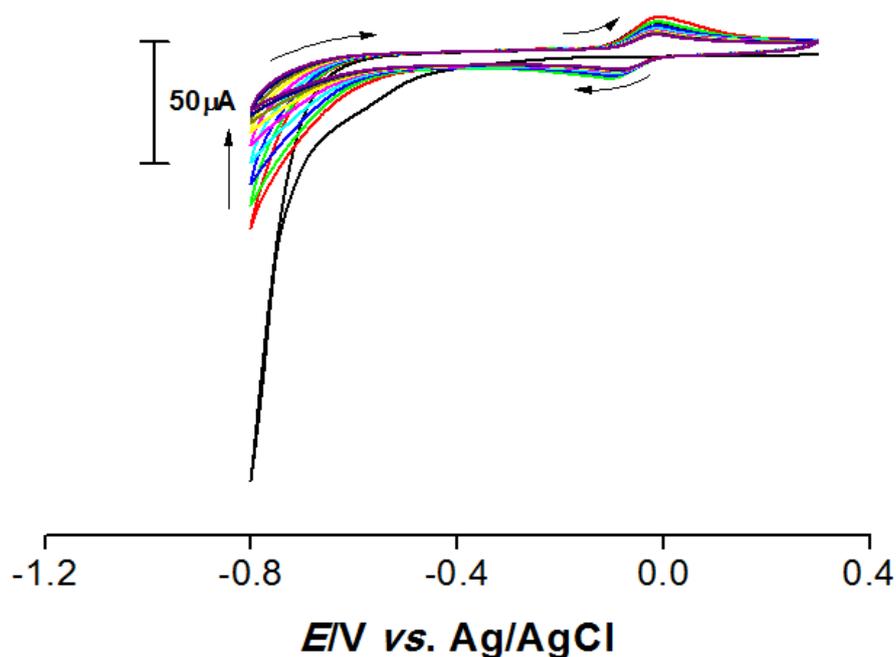
**Figura 16** Par redox azoxi/azo eletrogerado a partir da reação intermolecular entre o NIC-NHOH e NIC-NO (ZHANG *et al.*, 2008; ABREU *et al.*, 2002).

Com o fim de racionalização do mecanismo eletroquímico, particularmente do par redox IIa/IIc, alguns experimentos eletroquímicos foram conduzidos, nos quais foram selecionadas faixas de potencial estratégicas para formação ou não desses sistemas redox como discutido a seguir.

#### IV.1.2. Mecanismo de Ativação do ECV/MWCNT/NIC-NO<sub>2</sub>

Estudos foram realizados no intuito de se obter uma faixa de ativação estratégica na tentativa de explicar se o par redox **Ila/Ilc** é oriundo da interação química entre o nitroso/hidroxilamina formando o par redox azoxi/azo ou o sistema (quinonametídeo/bisfenol) eletrogerado a partir da oxidação irreversível do fenol, bem como justificar se há necessidade de selecionar a faixa de potencial para formação de todos os pares redox (**Ia/Ic** e **Ila/Ilc**).

Por essa razão, foram selecionadas duas faixas de potencial tanto no sentido catódico quanto no sentido anódico para diagnosticar quais os grupos são responsáveis por essa eletroatividade. Foram selecionadas os seguintes tratamentos: (1) ativação no sentido catódico na faixa de potencial de 0,3 V a -0,8 V vs. Ag/AgCl, em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0) e velocidade de varredura de potencial ( $v$ ) de 0,02 V s<sup>-1</sup> (Figura 17). Esta faixa foi escolhida pelo fato da oxidação do grupo fenol (varredura reversa) ocorrer fora desses limites como pode ser observado na Figura IV.1 (página 35) ( $E_p = 0,43$  V vs. Ag/AgCl).



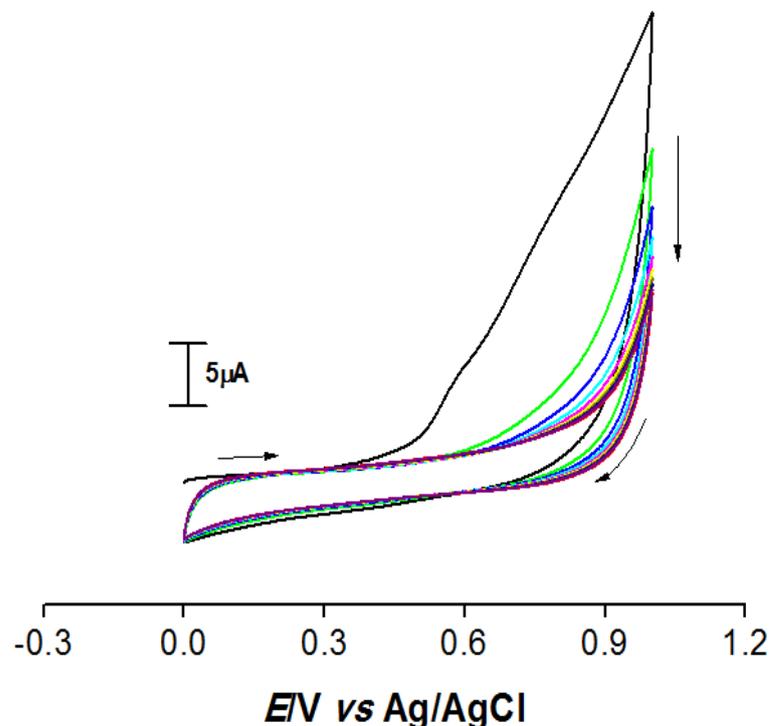
**Figura 17** Voltamogramas cíclicos obtidos nas 10 primeiras varreduras para um ECV/MWCNT/NIC-NO<sub>2</sub>,  $\nu = 0,02 \text{ V s}^{-1}$ .  $E_{\text{inicial}} = 0,3 \text{ V}$  e  $E_{\lambda} = -0,8 \text{ V}$ , varredura no sentido catódico. Condições empregadas: solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0.

Entretanto, após a formação da hidroxilaminaniclosamida a partir da redução irreversível do grupo nitro via  $4e^-/4H^+$ , foi possível observar a formação do primeiro par redox hidroxilamina/nitroso (**Ia/Ic**) com  $E^0 = 0 \text{ V}$  como pode ser observado na Figura 17. Não há evidências do segundo par redox (**Ila/Ilc**) correspondente ao azoxi/azo formado da reação intermolecular entre o nitroso e hidroxilamina eletrogerados a partir da ativação *in situ* da niclosamida (**IIlc**), como observado na Figura IV.1 na faixa de potencial selecionada. Os resultados obtidos em solução da niclosamida sugerem a formação de um pico em  $+0,420 \text{ V vs. SCE}$ , o qual pode ser proveniente da condensação de produtos de redução diferentes obtidos após a redução irreversível do grupo nitro em meio prótico (pH 4,5) da niclosamida (ABREU *et al.*, 2002;). A partir de outros nitroaromaticos, resultados similares foram obtidos (ADHIKARI, A., 2004; ZHANG, 2008; OLIVEIRA-BRETT *et al.*, 1997; FIJALEK *et al.*, 1993; LUND, 2001).

Estes resultados podem ser justificados pela complexidade dos processos de transferência heterogênea de elétrons na matriz de nanotubo de carbono modificados com niclosamida. GHALKHANI e SHAHROKHIAN (2010) utilizam uma plataforma nanoestruturada a base de nanopartículas de carbono e quitosana e não fazem alusão sobre a formação do par redox Azoxi/Azo durante o processo de redução de niclosamida, corroborando, que o processo de redução depende da matriz usada.

A seguir, foi selecionada outra faixa de potencial no sentido anódico na tentativa de explicar se de fato a formação do par redox **Ila/Ilc** é dependente da oxidação irreversível do grupo fenólico. Neste sentido, a opção (2) foi selecionar uma faixa de potencial entre 0 V a 1,0 V vs. Ag/AgCl, em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0) e velocidade de varredura de potencial ( $\nu$ ) de 0,02 V s<sup>-1</sup> (Figura 18).

O par redox **Ila/Ilc** está ausente (Figura V.6), o que evidencia que este sistema é dependente tanto da redução do grupo nitro quanto da oxidação do fenol. Propõe-se, portanto, o seguinte mecanismo para os picos **Ila/Ilc**. (Figura 14)



**Figura 18** Voltamogramas cíclicos obtidos nas 10 primeiras varreduras para um ECV/MWCNT/NIC-NO<sub>2</sub>,  $\nu = 0,02 \text{ V s}^{-1}$ .  $E_{\text{inicial}} = 0,0 \text{ V}$  e  $E_{\lambda} = 1,0 \text{ V}$ , varredura no sentido anódico. Condições empregadas: solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0.

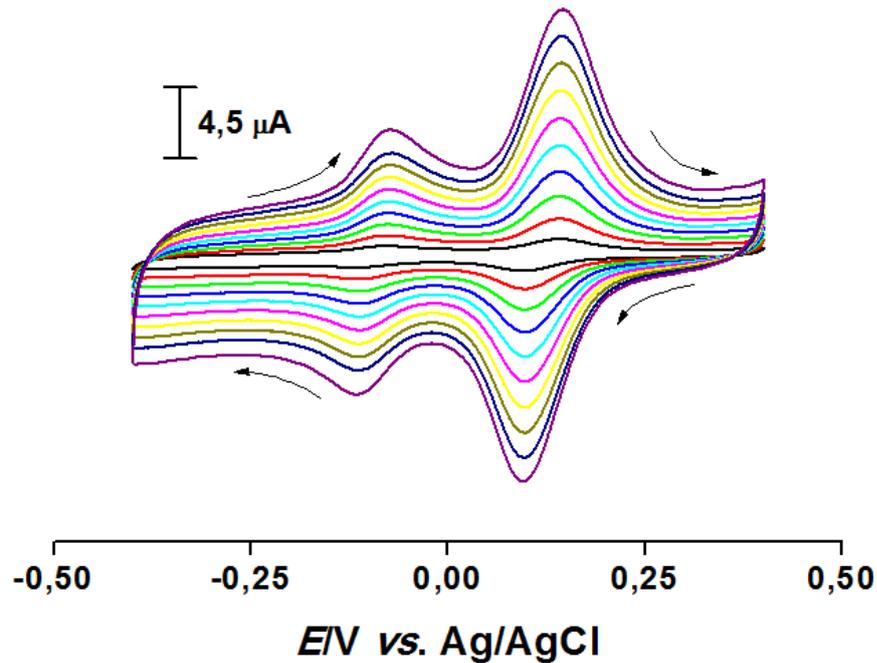
A caracterização inequívoca da natureza do par redox em questão ainda não foi realizada. Uma vez que a matriz usada é complexa, justificando, há necessidade de utilização de outras técnicas (UV/VIS, IR, MEV, AFM entre outras.) ou técnicas combinadas, tais como espectroeletrólítica, por exemplo, para explicar a origem do par redox **Ila/Ilc**.

Há necessidade, para a estabilidade do eletrodo modificado, que a faixa de varredura seja de -0,8 a 0,5 V. Quando não se utiliza a faixa de varredura completa, há lixiviação da niclosamida e conseqüentemente diagnósticos imprecisos são obtidos, prejudicando seu uso para finalidades práticas no tocante à detecção de espécies nos mais diferentes meios. Assim, em todos os experimentos, exceto os já discutidos, foi selecionada a faixa de potencial completa para a formação de todos os pares redox, bem como, e não menos importante, permitir a oxidação do fenol para assegurar maior estabilidade da fase sensora. A seguir são realizados alguns estudos referentes ao processo cinético da plataforma desenvolvida.

#### **IV.1.3. Características Cinéticas do ECV/MWCNT/NIC<sub>ativada</sub>**

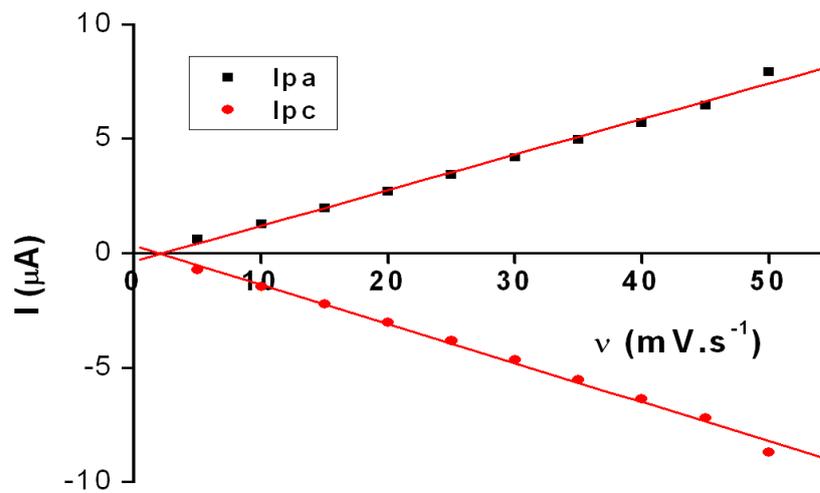
O sucesso do processo eletrocatalítico frente à detecção da NADH depende fundamentalmente da eficiência do mediador eletrodepositado na plataforma nanoestruturada. Assim, para garantir que a etapa limitante da reação química acoplada não seja a velocidade de formação dos estados de transição das espécies oxidada (NIC-NO) e reduzida (NIC-NHOH) do mediador, faz-se necessário o estudo prévio para calcular o valor da constante de velocidade de transferência heterogênea de elétrons ( $\kappa_s$ ), justificando, portanto, os estudos a seguir.

Após o processo de ativação *in situ*, uma faixa de potencial foi selecionada usando as mesmas condições do processo de ativação e assim, as características cinéticas do ECV/MWCNT/NIC<sub>ativada</sub> foram estudadas a partir do uso da voltametria cíclica, como pode ser observado na Figura 19.



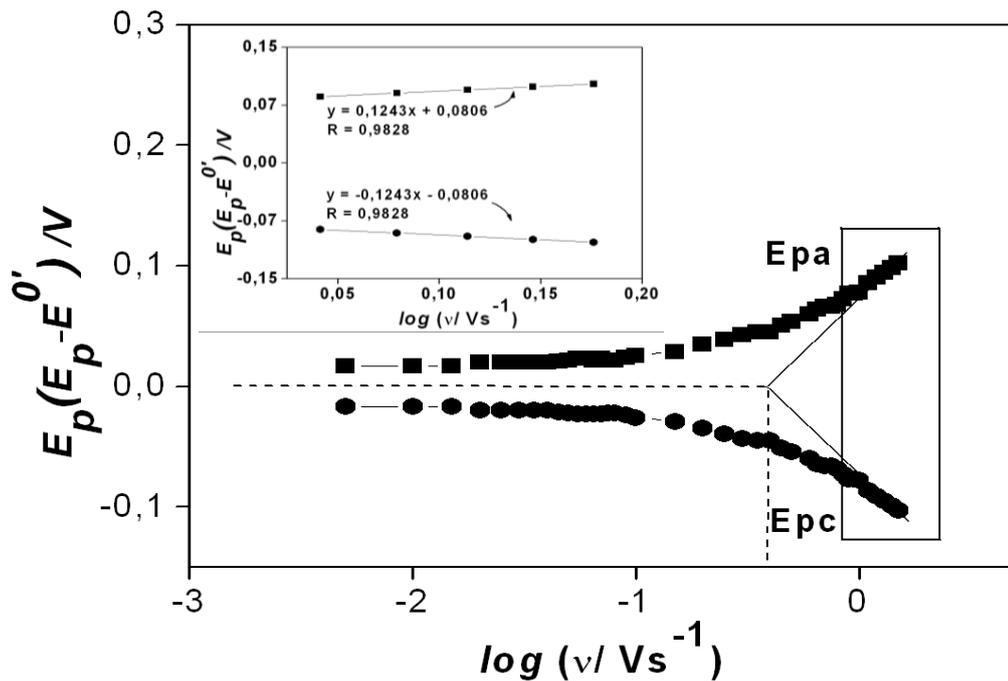
**Figura 19** Voltamogramas cíclicos em ECV/MWCNT/NIC<sub>ativada</sub> em solução de tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,0 em diferentes velocidades de varredura (0,005-0,050 V s<sup>-1</sup>),  $E_{inicial} = -0,4$  V e  $E_{\lambda} = 0,4$  V, varredura no sentido anódico.

Os voltamogramas cíclicos representativos obtidos para o ECV/MWCNT/NIC<sub>ativada</sub> são mostrados na Figura IV.7 para várias velocidades de varredura de potencial (0,005 - 0,050 V s<sup>-1</sup>). A observação de picos voltamétricos persistentes e bem definidos (Figura 20) indica que o processo redox do par (NIC-NHOH/NIC-NO) exibe características de espécies confinadas na plataforma nanoestruturada à base de nanotubos de carbono.



**Figura 20** Dependência da corrente de pico anódico ( $I_{pa}$ ) e catódico ( $I_{pc}$ ) em função da velocidade de varredura em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0.

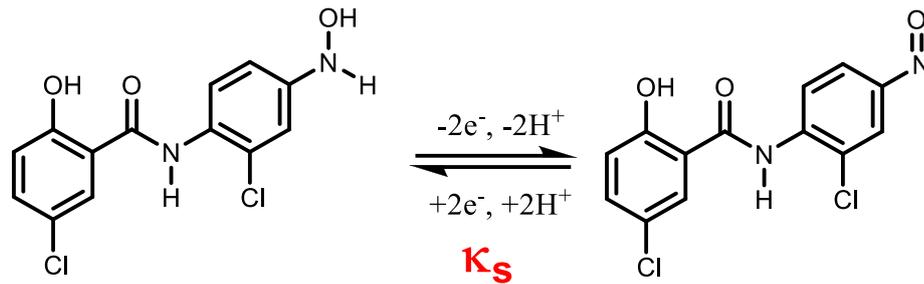
O potencial formal [ $E^0 = (E_{pa} + E_{pc})/2$ ] é praticamente independente da velocidade de varredura de potencial sugerindo, portanto, uma transferência de carga rápida na faixa de velocidade de varredura estudada  $5-900 \text{ mV s}^{-1}$  como observado na Figura 21



**Figura 21** Gráfico de Laviron,  $E_p$  vs.  $\log v$ . Condições empregadas: solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e pH 7,0.

Por outro lado, para velocidades de varredura de potencial acima de  $900 \text{ mV s}^{-1}$ , a separação dos picos começa a aumentar, indicando uma limitação de cinética de transferência de carga (Figura 21). A partir das expressões gerais derivadas por Laviron (LAVIRON, 1974), foi possível calcular o  $\kappa_s$  para as respostas voltamétricas de varredura de potencial para o caso de espécies eletroativas confinadas na superfície eletródica (LAVIRON, 1979).

A partir dessas expressões (Equação IV.1) e considerando  $n = 2e^-$  (NIC-NHOH/NIC-NO) (SANTHIAGO *et al.*, 2009; LIMA *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2010), foi possível determinar o coeficiente de transferência de carga ( $\alpha$ ), pela medida da variação do potencial de pico com a velocidade de varredura de potencial ( $v$ ), bem como a constante de velocidade de transferência de carga ( $\kappa_s$ ) para a transferência de elétrons entre o eletrodo e a camada eletrogerada *in situ* a partir da redução irreversível do grupo nitro confinado na plataforma nanoestruturada (Figura 22).



**Figura 22** Representação do esquema redox do sistema (NIC-NHOH/NIC-NO) (**la/lc**) com indicação do  $\kappa_s$  – constante heterogênea de transferência de elétrons.

Assim, a partir do gráfico de  $E_p = f(\log \nu)$ , verificam-se duas linhas retas com inclinações iguais a  $-2,3 RT/\alpha nF$  e  $2,3RT/(1-\alpha)nF$  para os picos catódico e anódico, respectivamente. Para velocidades de varredura acima de  $1100 \text{ mV s}^{-1}$ , os valores de  $\Delta E = (E_p - E^0)$  foram proporcionais ao logaritmo da velocidade de varredura como indicado por Laviron. Os gráficos são mostrados na inserção da Figura IV. 9. Usando o gráfico e a Equação IV.1, os valores de  $\alpha$  e  $\kappa_s$  foram 0,5 e  $15,7 \text{ s}^{-1}$ , respectivamente. O  $\kappa_s$  foi calculado a partir dos valores de  $\nu_a$  e  $\nu_b$  sendo  $E_p - E^0 = 0$  (LAVIRON, 1979):

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

O valor obtido para  $\kappa_s$  foi maior do que o registrado em muitos trabalhos na literatura, como listados na Tabela 2 Isto indica uma alta habilidade do par redox (NIC-NHOH/NIC-NO) em promover a transferência de elétrons na superfície do eletrodo modificado com nanotubos de carbono.

**Tabela 2** Parâmetros eletroquímicos de eletrodos modificados.

Plataforma	<i>n</i>	$\kappa_s(\text{s}^{-1})$	Referência
ECV/CA	2	8,6	ZARE <i>et al.</i> , 1999
ECV/PCV	-	5,3	GOLABI <i>et al.</i> , 2002
EPC/DDDP-ZF	2	1,1	MUNTEANU <i>et al.</i> , 2003
EPC/NF-ZF	-	4,5	MUNTEANU <i>et al.</i> , 2004
ECV/NE	2	3,8	ZARE <i>et al.</i> , 2005
ECV/MWCNT/MB	-	5,1	ZHU <i>et al.</i> , 2007a
ECV/Q	-	4,5	ARDAKANI <i>et al.</i> , 2007
ECV/MWCNT/RN	2	0,075	YOGESWARAN e CHEN, 2007
ECV/FeTsPc-FeT4MPyP	-	3,8	DUARTE <i>et al.</i> , 2008
NFE/PMMA– MWCNT(PDDA)/GOx	-	13,3	MANESH <i>et al.</i> , 2008
EPC/EMIMBF <sub>4</sub>	-	0,00458	SUN <i>et al.</i> , 2009
ECV/MWCNT/CM	-	2,21	ZHENG e SONG, 2009
E Au/ MWCNT/QUIT/DA	-	0,41	GE <i>et al.</i> , 2009
EPC/MWCNT/DDF	-	2,39	FOTOUHI <i>et al.</i> , 2010
EPC/MWCNT/4-NF	2,3	9,7	LIMA <i>et al.</i> , 2009
ECV/MWCNT/NIC <sub>ativada</sub>	-	15,7	ESTE TRABALHO

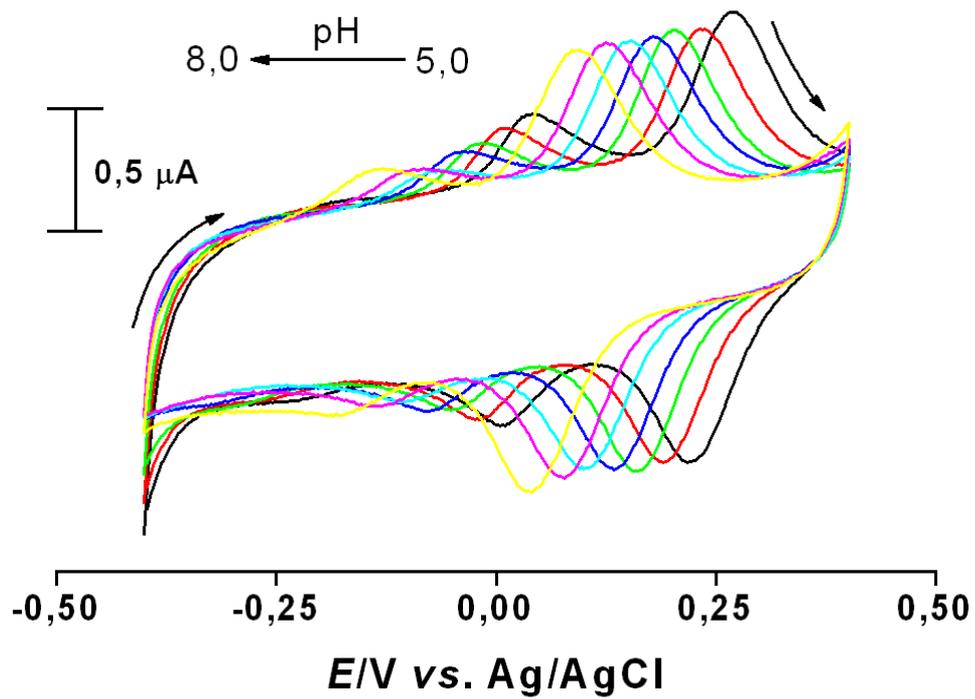
CA: Acido clorogênico; CM: Curcumina; DA: dopamina; DDDP: 16,18-dibenzo[c,1]-7,9-ditia-16,18-diazapentaceno; DDF: 6,7-diidroxí-3-metil-9-tia-4,4a-diazofluoren-2-ona; ECV: Eletrodo de carbono vítreo; EMIMBF<sub>4</sub>: 1-etil-3-metilimidazol tetrafluoroborato; EAu: Eletrodo de ouro; EPC: Eletrodo de pasta de carbono; FeTsPc: ftalocianina tetra sulfonada de ferro (II); FeT4MPyP: porfirina tetra-(*n*-metil-piridil) de ferro (III); GOx: Glicose Oxidase; MB: Azul de Meldola; MWCNT: Nanotubos de carbono de paredes múltiplas; NE: norepinefrina; NF: nitrofluorenona; NFE: Eletrodo de nanofibras; NIC: niclosamida; PCV: Violeta de Pirocatecol; PDDA: Poli cloreto de dialildimetil amônia; PMMA: polimetilmetacrilato; Q: Quinizarina; QUIT: Quitosana; RN: Vermelho neutro; ZF: fosfato de zircônio.

A influência do pH da solução na resposta eletroquímica na ausência de NADH usando solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e

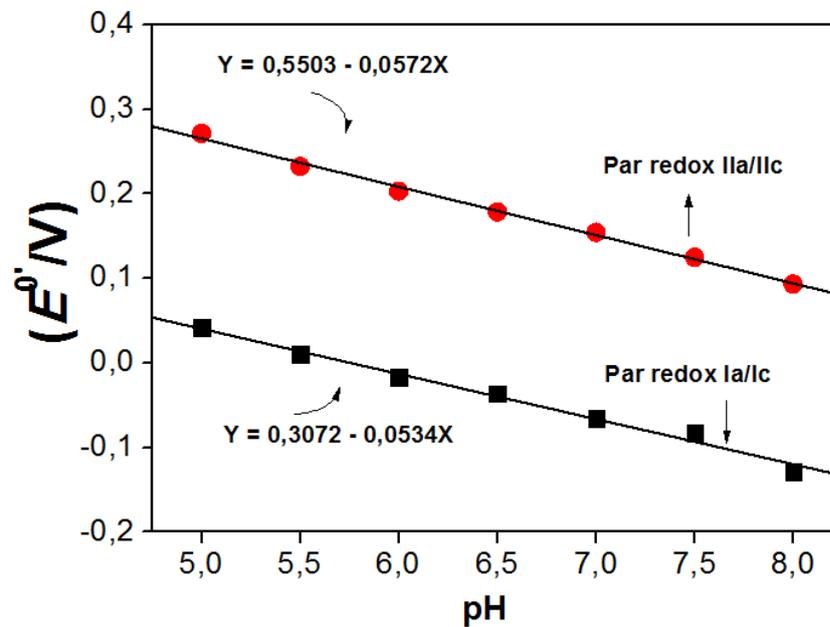
8,0 foi estudada (Figura 23). Portanto, a relação do  $E^0$  dos dois pares redox **Ia/Ic** e **IIa/IIc** em função do pH da solução foi avaliada na ausência do analito (Figura 24).

Assim, foi possível verificar que o coeficiente angular ( $E^0/\text{pH}$ ) é de aproximadamente 57,2 mV / unidade de pH e 53,4 mV / unidade de pH na faixa de pH de 5,0 a 8,0 para os pares redox, respectivamente (Figura 24). Estes coeficientes angulares são muito próximos para reações onde a razão  $e^-/H^+$  é igual a um ( $59,2 (n_p/n_{e^-})$ ) mV / pH, sendo  $n_p = n_{e^-}$  a 25 °C. Portanto, se considerarmos o número de elétrons igual 2,0 (SANTHIAGO *et al.*, 2009, LIMA *et al.*, 2008a) para o processo de interconversão (NIC-NHOH/NIC-NO), bem como considerando o comportamento do potencial formal par redox **Ia/Ic** em função do pH da solução, há somente uma possibilidade para o pH entre 5,0 e 8,0, ou seja, o número de prótons envolvidos neste processo deve ser também 2,0 como pode ser observado em alguns trabalhos reportados na literatura (YOGESWARAN e CHEN, 2007; SANTHIAGO *et al.*, 2009).

Além disso, apenas há uma diminuição discreta da corrente de pico de ambos os pares redox, com o aumento dos valores de pH da solução (Figura 23), justificando, independentemente do potencial hidrogeniônico do meio, uma alta estabilidade do mediador confinado na plataforma nanoestruturada fundamentada em nanotubos de carbono.



**Figura 23** Efeito do pH no comportamento redox do ECV/MWCNT/NIC<sub>ativada</sub>, voltamogramas obtidos em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> e  $\nu = 0,005$  V s<sup>-1</sup>.

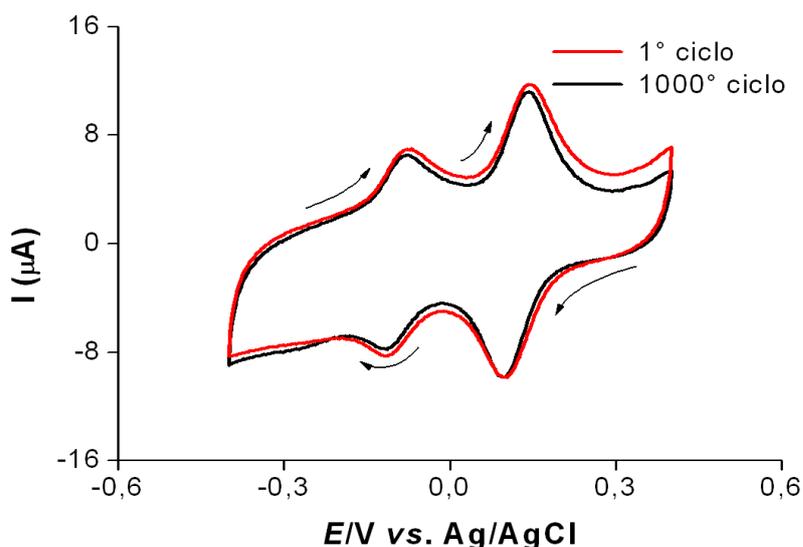


**Figura 24** Potencial formal ( $E^0$ ) do ECV/MWCNT/NIC<sub>ativada</sub> em função do pH. Condições empregadas: solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> e  $\nu = 0,005$  V s<sup>-1</sup>.

#### IV.1.4. Estudos de Estabilidade da Plataforma ECV/MWCNT/NIC<sub>ativada</sub>

Após o processo de ativação *in situ* da niclosamida, a estabilidade do par redox (NIC-NHOH/NIC-NO) 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.*, 2008a, LIMA *et al.*, 2009, SANTHIAGO *et al.*, 2009). Assim, após 1000 ciclos foi observado um DPR menor do que 5% (Figura 25), ou seja, nenhuma mudança significativa foi observada nas respostas voltamétricas, sugerindo uma excelente estabilidade da plataforma nanoestruturada à base de MWCNT e niclosamida ativada.

Quando o eletrodo modificado foi estocado a seco e na temperatura ambiente, nenhuma mudança significativa foi observada por três meses, indicando uma boa estabilidade e repetibilidade, provavelmente devido às interações  $\pi-\pi$  e propriedades lipofílicas que devem favorecer a adsorção na matriz, levando a uma boa estabilidade em suas respostas voltamétricas (SILVA *et al.*, 2010; SANTHIAGO *et al.*, 2009).



**Figura 25** Voltamogramas cíclicos em ECV/MWCNT/NIC<sub>ativada</sub> em solução de tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,0,  $\nu = 0,050 \text{ V s}^{-1}$ .  $E_{\text{inicial}} = -0,4 \text{ V}$  e  $E_{\lambda} = 0,4 \text{ V}$ , varredura no sentido anódico.

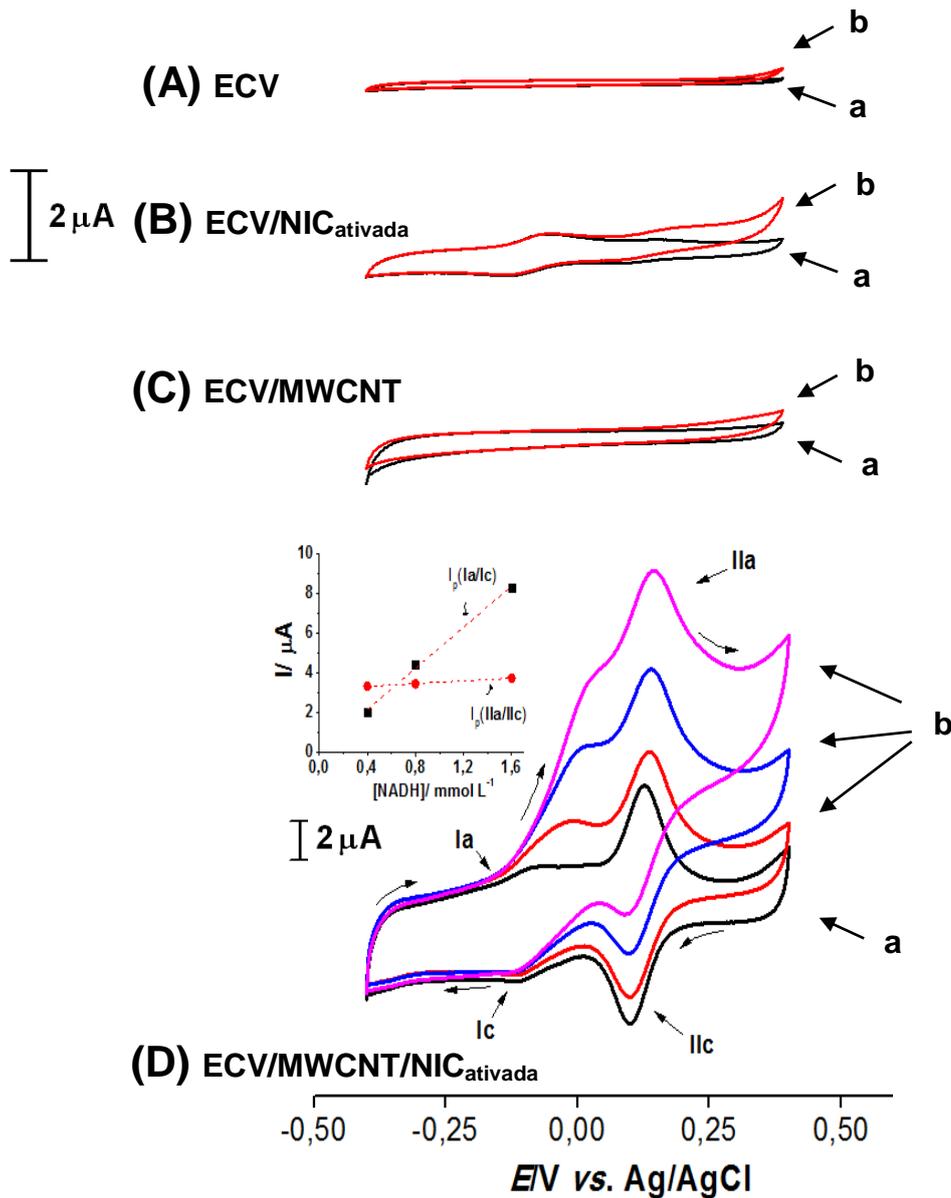
#### IV.1.5. Estudo da Eletrooxidação de NADH pelo ECV/MWCNT/NIC<sub>ativada</sub>

De maneira a verificar a atividade electrocatalítica tanto do par redox (NIC-NHOH/NIC-NO) quanto do par redox **Ila/Ilc** na presença de NADH, alguns ensaios foram realizados. Assim, a Figura 26 mostra os voltamogramas cíclicos para a plataforma nanoestruturada à base de ECV/MWCNT/NIC<sub>ativada</sub>, em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0), usando uma varredura anódica, com  $E_{\text{inicial}} = -0,4 \text{ V}$  e  $E_{\lambda} = 0,4 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ , na ausência e na presença de NADH.

Para fins de comparação, voltamogramas obtidos em ECV **(A)**, ECV/NIC **(B)**, ECV/MWCNT **(C)** na ausência (a) de e na presença de NADH (b) são também apresentados. Nestes voltamogramas (Figura 26 A, B e C), não há evidência de picos, indicando que a oxidação direta de NADH está fora destes limites ( $E_{\text{pa}} > 0,4 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ ). Na Figura IV.14 D, o sistema redox **Ia/Ic**, relativo (NIC-NHOH/NIC-NO) e **Ila/Ilc** relativo ao Azoxi/Azo ou Quinonametídeo/Bisfenol estão presentes em potenciais de  $E_{\text{pla}} = -0,07 \text{ V}$  e  $E_{\text{plc}} = -0,11 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  e  $E_{\text{plIa}} = +0,14 \text{ V}$  e  $E_{\text{plIc}} = +0,10 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ , respectivamente.

Após adição de NADH à solução (Figura IV.14 D), o pico de oxidação (**Ia**) aumenta significativamente e o pico de redução (**Ic**) do mediador desaparece completamente, na presença de altas concentrações de NADH, indicando, portanto, uma eletrocatalise bastante eficiente. Por outro lado, o pico de oxidação **Ila**, embora aparentemente aumente, a corrente líquida tende a não aumentar na presença de altas concentrações da coenzima como pode ser verificado na inserção da Figura 26.

Além disso, se for levada em consideração a faixa de potencial selecionada para efeito de comparação, o ganho de potencial para a oxidação eletrocatalítica de NADH é de aproximadamente 400 mV vs. Ag/AgCl em relação às plataformas não modificadas, ratificando, portanto, o efeito sinérgico da plataforma nanoestruturada desenvolvida e garantindo uma maior seletividade quando de seu uso em biossensores NADH dependentes.

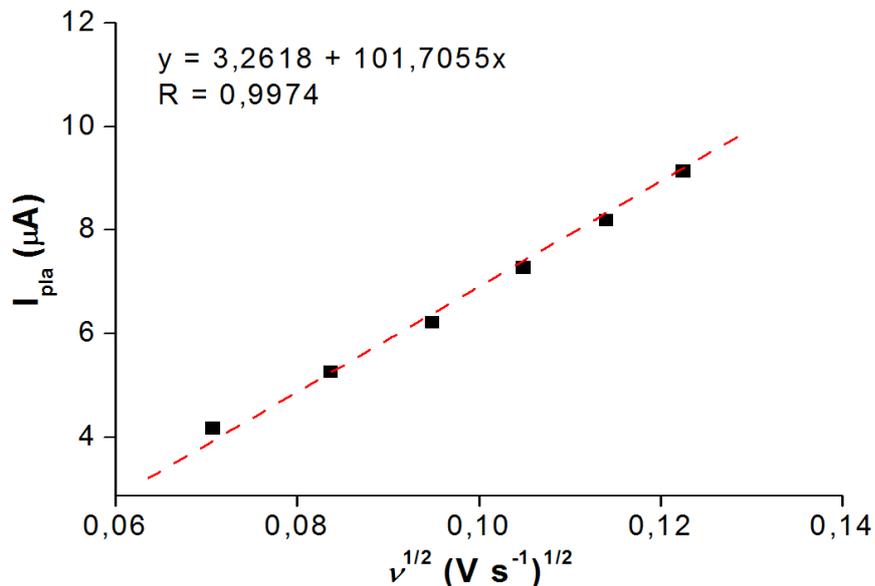


**Figura 26** Voltamogramas cíclicos para o ECV (A), ECV com NIC<sub>ativada</sub> (B), ECV com NTC (C), ECV com NIC<sub>ativada</sub> e MWCNT (D) na ausência (a) e na presença de NADH (b). Velocidade de varredura ( $v$ ): 0,005 V s<sup>-1</sup>. Estudos realizados em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, em pH 7,0.

Estudos mais detalhados a respeito da corrente de pico de oxidação da NADH na superfície do ECV/MWCNT/NIC<sub>ativada</sub> foram realizados por voltametria cíclica em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0). Para este propósito foi considerado apenas o par redox Ia/Ic, justificado pelo efeito catalítico discutido anteriormente.

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 o NADH. Por outro lado, um gráfico da corrente catalítica  $I_{pla}$  versus a raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial ( $v^{1/2}$ ) na faixa de velocidade de 0,005 a 0,015  $V s^{-1}$  foi construído e resultou numa dependência linear (Figura 27), expressa pela seguinte Equação IV. 2:

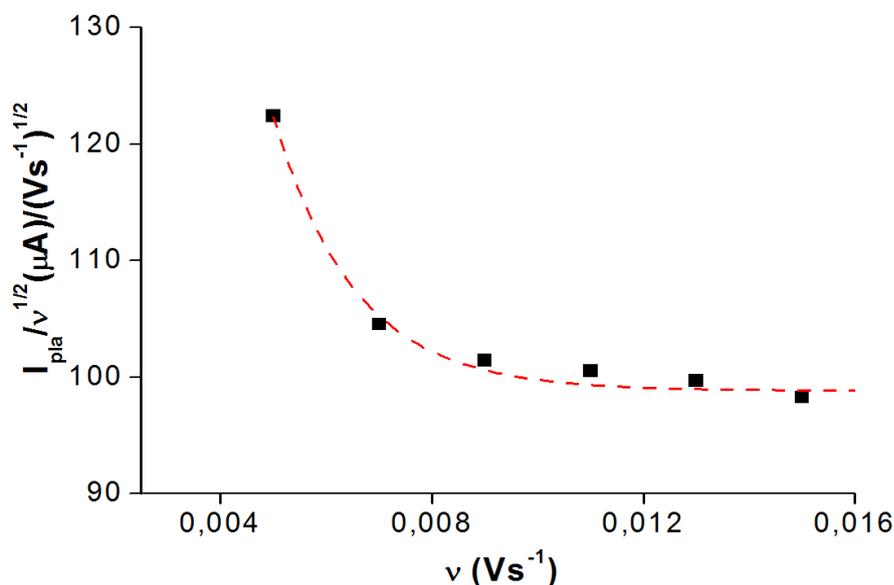
$$I_{pla}(\mu A) = 3,2618 + 101,7055 v^{1/2} (V s^{-1})^{1/2} \quad (\text{Equação IV.2})$$



**Figura 27** Variação da corrente de pico anódica  $I_{pla}$  vs.  $v^{1/2}$  no ECV/MWCNT/NIC<sub>ativada</sub> em solução contendo 0,4  $mmol L^{-1}$  de NADH. Medidas realizadas em solução tampão fosfato 0,1  $mol L^{-1}$ , pH 7,0 e  $v$ : 0,005-0,015  $V s^{-1}$ .

Assim, esta dependência linear com  $v^{1/2}$  sugere que o processo seja controlado por difusão, na faixa de velocidade de varredura de potencial estudada. Para ratificar que o processo de oxidação eletrocatalítica entre o NADH e o ECV/MWCNT/NIC<sub>ativada</sub> 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 ( $I_{pla}/v^{1/2}$ ) versus  $v$

(Figura 28) é possível observar um perfil característico de um típico processo eletroquímico-químico catalítico ( $EC_{cat}$ ) (BARD e FAULKNER, 2001).

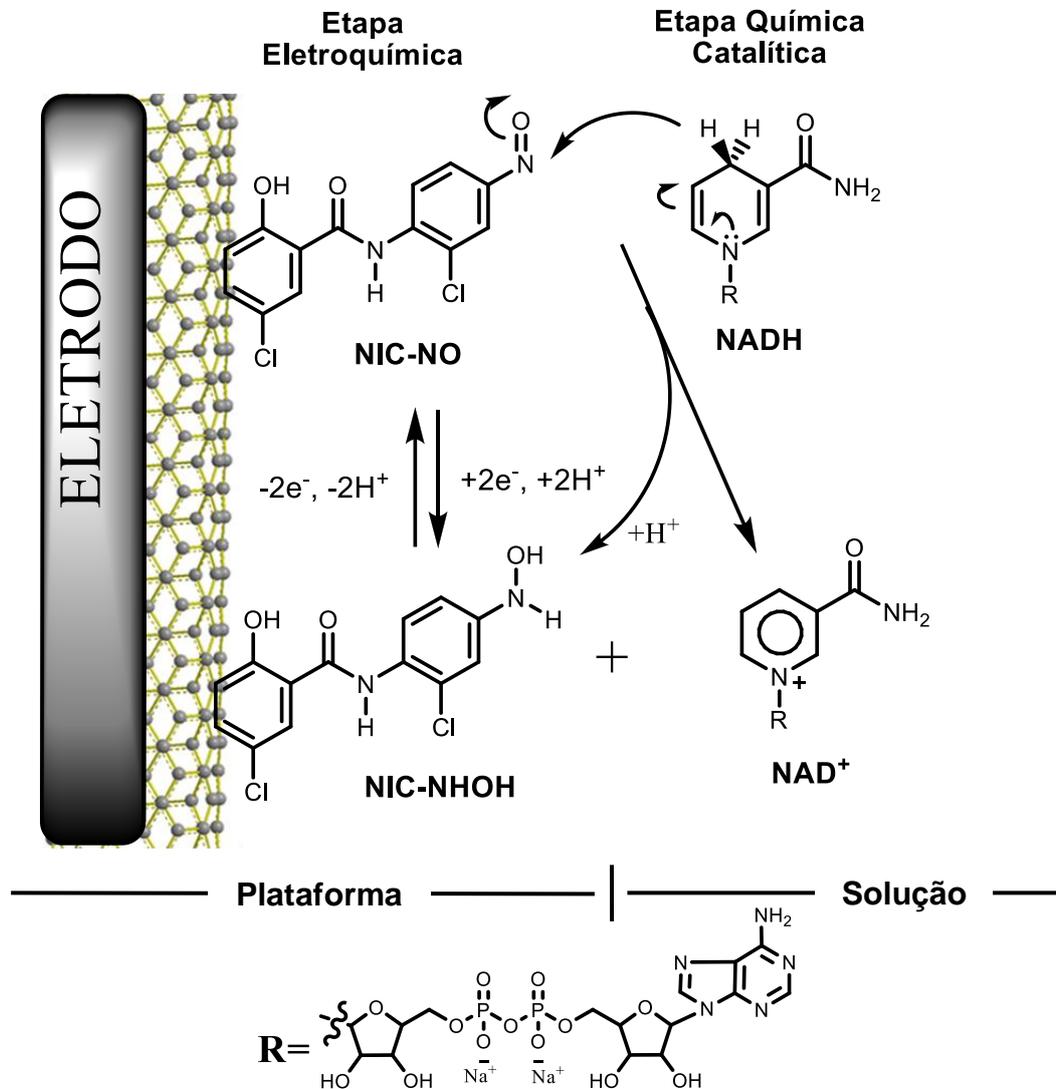


**Figura 28** Variação da corrente de pico anódica normalizada  $I_{pia}/v^{1/2}$  vs.  $v$  no ECV/MWCNT/NIC<sub>ativada</sub> em solução contendo  $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$  de NADH. Medidas realizadas em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 e  $v$ : 0,005-0,015  $V s^{-1}$ .

Como já mencionado, o substituinte nitro na NIC-NO<sub>2</sub> pode ser transformado totalmente no grupo hidroxilamina que, na varredura reversa, pode ser oxidada ao grupo nitroso por um processo de dois elétrons e dois prótons. Assim, o ciclo catalítico para a oxidação eletrocatalítica de NADH envolve o par redox (NIC-NHOH/NIC-NO), semelhante ao sistema bem conhecido e reportado na literatura (LIMA *et al.*, 2008a), como pode ser sugerido através da Figura 29.

Em geral, o grupo eletrogerado, NIC-NO, é hábil para se submeter a um processo de transferência de elétron-próton-elétron seqüencial ou a uma transferência de hidreto (CARLSON e MILLER, 1985). Para a niclosamida ativada (NIC-NHOH/NIC-NO), neste caso, a rota via hidreto deve ser preferida devido à presença de uma carga parcial positiva no nitrogênio do grupo NO, devido à deslocalização de elétrons. Após a transferência de hidreto para o grupo NIC-NO, o

complexo substrato-mediador dissocia-se, seguido pela rápida protonação do oxigênio como reportado na literatura (MANO e KUHN, 1999a,b; LIMA *et al.*, 2008a; LIMA, 2009; SILVA *et al.*, 2010).



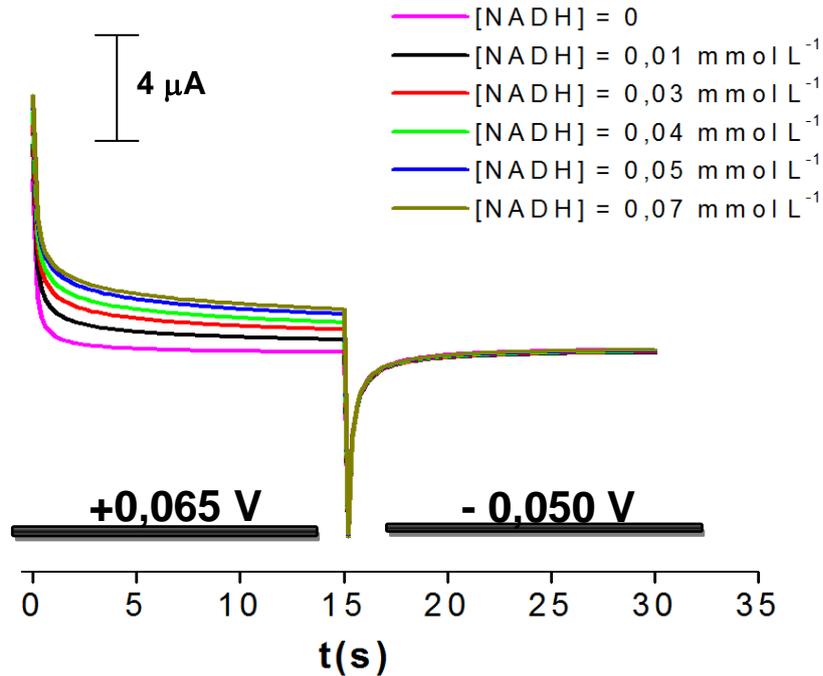
**Figura 29** Modelo simplificado do mecanismo proposto para o processo de oxidação eletrocatalítica do NADH sobre a plataforma ECV/MWCNT/NIC<sub>ativada</sub>.

#### IV.1.6. Estudos Cronoamperométricos

Para a avaliação quantitativa do comportamento eletrocatalítico da oxidação de NADH no ECV/MWCNT/NIC<sub>ativada</sub>, a cronoamperometria de duplo salto de potencial foi empregada para a obtenção de parâmetros eletroquímicos. A Figura 30 mostra as curvas de corrente *versus* tempo, obtidos com ECV/MWCNT/NIC<sub>ativada</sub>,  $E_{\text{inicial}} = +0,065 \text{ V}$  e  $E_{\text{final}} = -0,050 \text{ V}$  *versus* Ag/AgCl para várias concentrações de NADH em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e pH 7,0. Como pode ser verificado, não há corrente catódica líquida correspondente à redução do mediador na presença de NADH.

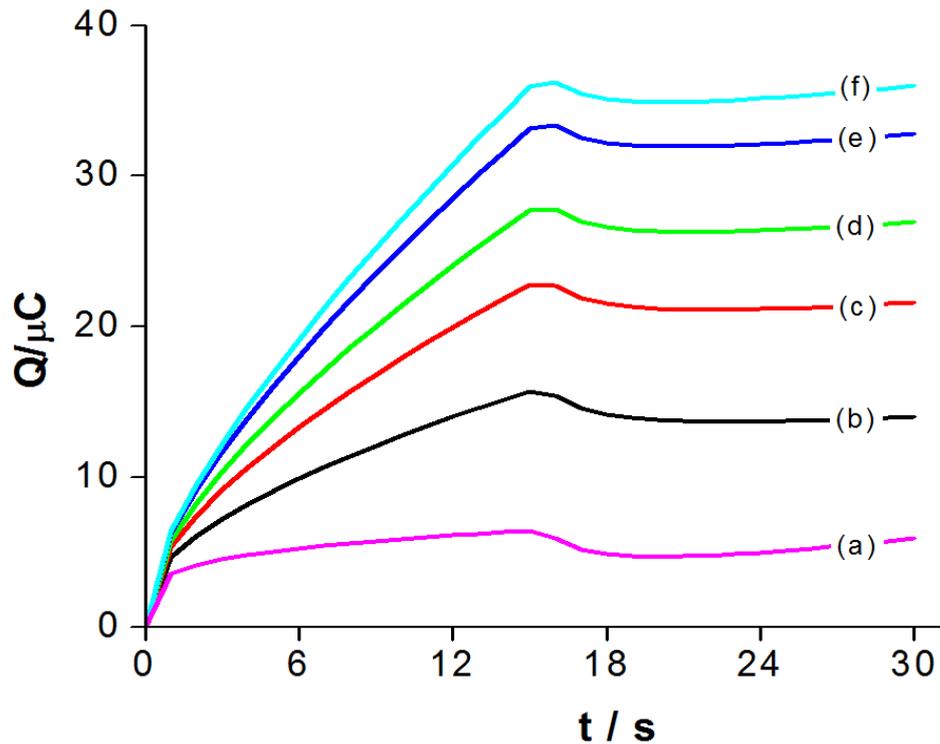
Neste contexto, experimentos foram realizados com o objetivo de estudar o mecanismo da reação, bem como avaliar as constantes de velocidade do referido processo eletrocatalítico. A escolha do pH 7 foi também racionalizada, uma vez que há uma grande quantidade de enzimas desidrogenases que dependem do processo redox do NADH e que são dependentes do pH, apresentando um pH ótimo em 7 (LIMA *et al.*, 2008a; LIMA *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2010). Além disso, é também neste pH, onde ambos NADH e NAD<sup>+</sup> mostram maiores estabilidades quando dissolvidos em solução aquosa (CHENAULT e WHITESIDES, 1987) e onde a maioria dos valores prévios de  $k_{\text{cat}}$  foram reportados na literatura (GORTON e DOMÍNGUEZ, 2002).

Assim sendo, os cronoamperogramas de duplo salto de potencial direto e reverso para o mediador na ausência de NADH mostraram-se simétricos com um consumo de carga igual para redução e oxidação do sistema redox eletrogerado na superfície do ECV/MWCNT/NIC<sub>ativada</sub>. Por outro lado, na presença de diferentes concentrações de NADH, os valores de corrente anódica associada aos amperogramas diretos são significativamente maiores do que aqueles observados para o processo reverso (Figura 30).



**Figura 30** Cronoamperogramas obtidos no ECV/MWCNT/NIC<sub>ativada</sub> em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7 na ausência e presença de NADH,  $E_{inicial} = +0,065$  V e  $E_{final} = -0,050$  V vs. Ag/AgCl, respectivamente.

A partir da integração dos cronoamperogramas é possível visualizar melhor a carga tanto do processo catódico quanto anódico. Nestes há um aumento significativo da carga do referido processo anódico e uma diminuição no processo catódico (Figura 31), indicando, portanto, que o grupo nitroso está sendo consumido pela etapa química acoplada como observado na Figura 31.



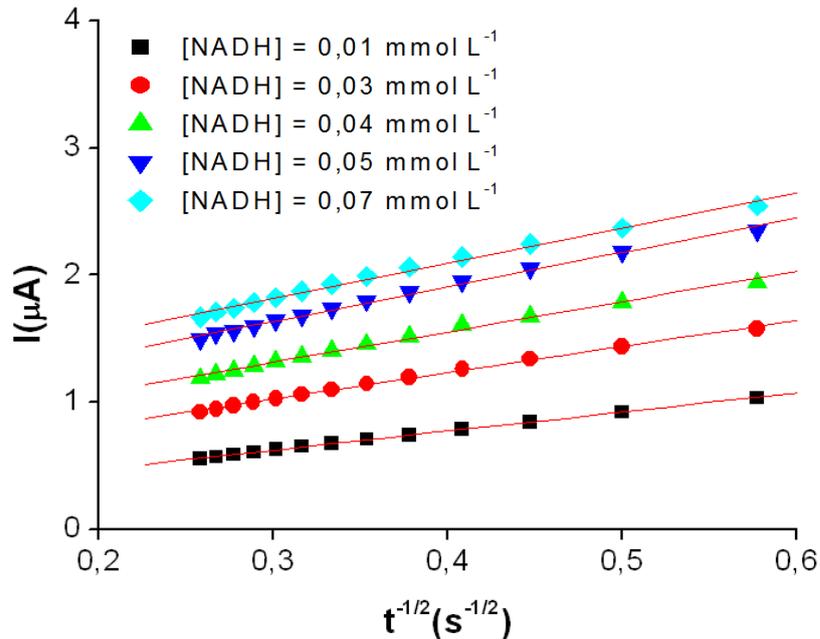
**Figura 31** Integração dos cronoamperogramas obtidos no ECV/MWCNT/NIC<sub>ativada</sub> em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7 na ausência (a) e presença de NADH (a) 0,01; (b) 0,03; (c) 0,04; (d) 0,05 e (f) 0,07 mmol L<sup>-1</sup>, E<sub>inicial</sub> = +0,065 V e E<sub>final</sub> = -0,050 V vs. Ag/AgCl, respectivamente.

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

$$I = nFAD_{NADH}^{1/2} C_0 \pi^{-1/2} t^{-1/2} \quad (\text{Equação IV.3})$$

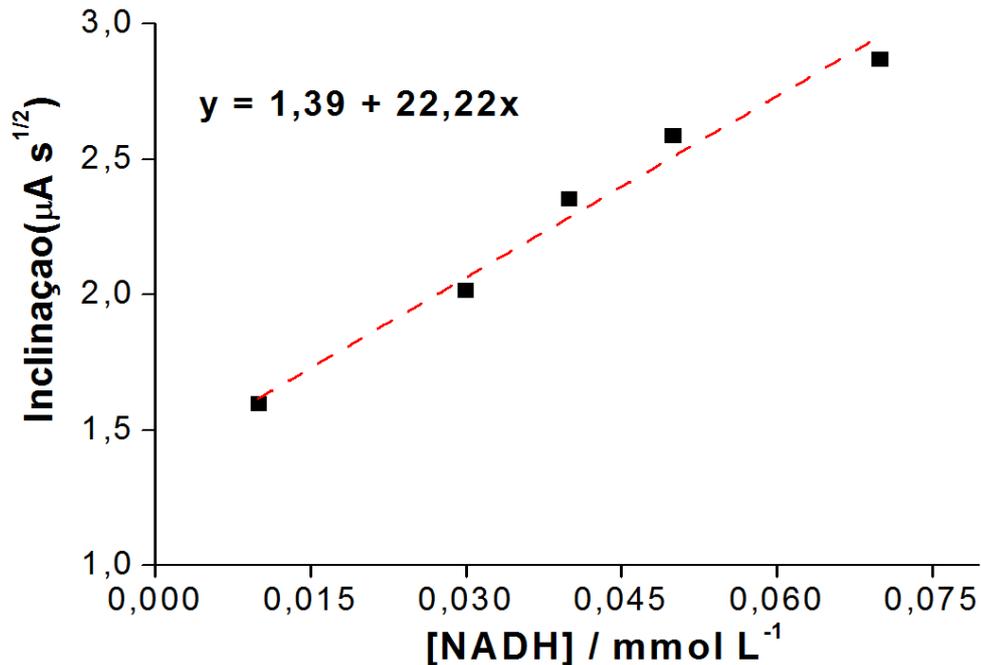
Sendo  $D_{NADH}$  e  $C_0$  o coeficiente de difusão (cm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>) e a concentração de NADH no seio da solução (mol L<sup>-1</sup>), respectivamente. A Figura 32 mostra os gráficos de  $I$  versus  $t^{1/2}$  com o melhor ajuste linear para diferentes concentrações de NADH, o

qual indica que a corrente observada deve ser controlada pela difusão de NADH em solução.



**Figura 32** Gráfico de  $I$  vs.  $t^{-1/2}$  obtidos a partir dos cronoamperogramas da Figura 30 em ECV/MWCNT/NIC<sub>ativada</sub> em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7 na ausência e presença de NADH,  $E_{inicial} = +0,065$  V e  $E_{final} = -0,050$  V vs. Ag/AgCl, respectivamente.

Um gráfico a partir das inclinações obtidas das linhas retas *versus* a concentração de NADH foi construído (Figura 33). A partir da inclinação da Figura 33 e usando a Equação de Cottrell (Equação IV.3), um coeficiente de difusão de  $2,5 \times 10^{-6}$  cm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> foi obtido para a faixa de concentração de NADH estudada. Este valor está próximo aos valores reportados na literatura (SANTHIAGO *et al.*, 2009; LIMA, 2009; SILVA *et al.*, 2010).

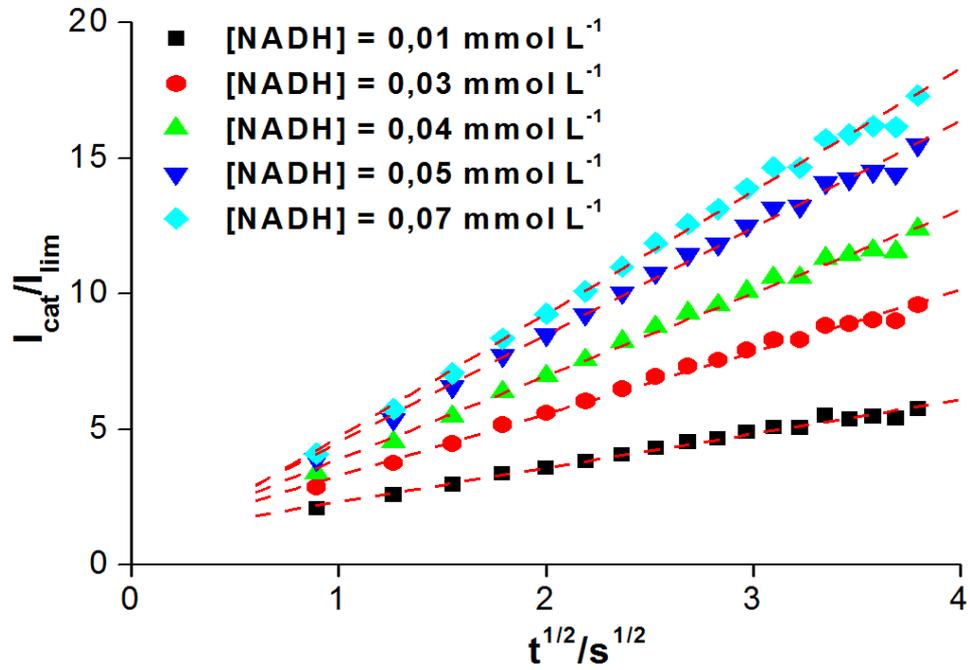


**Figura 33** Gráfico de inclinação ( $I/t^{1/2}$ ) versus a concentração de NADH obtidos a partir da Figura 32 do ECV/MWCNT/NIC<sub>ativada</sub> em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7 na ausência e presença de NADH,  $E_{inicial} = +0,065$  V e  $E_{final} = -0,050$  V vs. Ag/AgCl, respectivamente.

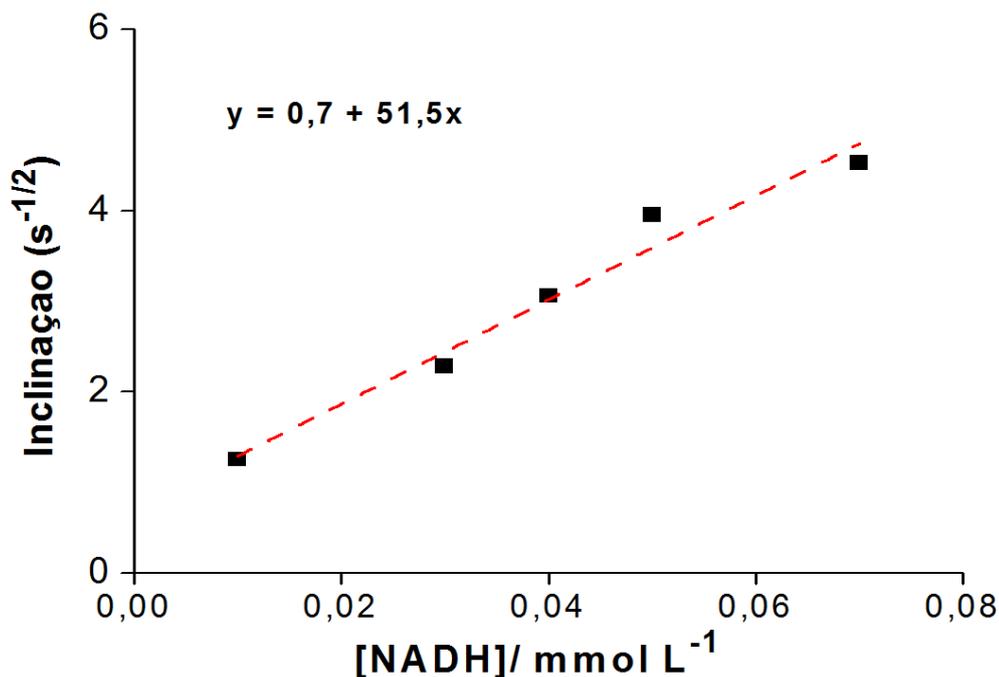
Além disso, a constante de velocidade,  $k_{cat}$ , para a reação química entre o NADH e os sítios redox confinados na superfície do eletrodo modificado pode ser avaliada pela cronoamperometria com base no método descrito na literatura (GALUS, 1976; LIMA *et al.*, 2008, SANTHIAGO *et al.*, 2009; SILVA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

$$I_{cat} / I_{Lim} = \pi^{1/2} (kC_s t)^{1/2} \quad (\text{Equação IV.4})$$

A partir das inclinações do gráfico  $I_{cat}/I_{Lim}$  versus  $t^{1/2}$  (Figura 34), foi possível obter o gráfico da Figura 35 (inclinações vs. [NADH]). Assim, usando o novo coeficiente angular da Figura 35 e a Equação IV.4, determinou-se de forma simples o valor de  $k_{cat}$ . Portanto, o valor calculado para  $k_{cat}$  nesta faixa de concentração apresentou um valor de  $8,1 \times 10^5$  L mol<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>.



**Figura 34** Dependência de  $I_{cat}/I_{lim}$  vs.  $t^{1/2}$  derivado dos cronoamperogramas da Figura 30 em ECV/MWCNT/NIC<sub>ativada</sub> em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7 na ausência e presença de NADH,  $E_{inicial} = +0,065$  V e  $E_{final} = -0,050$  V vs. Ag/AgCl, respectivamente.



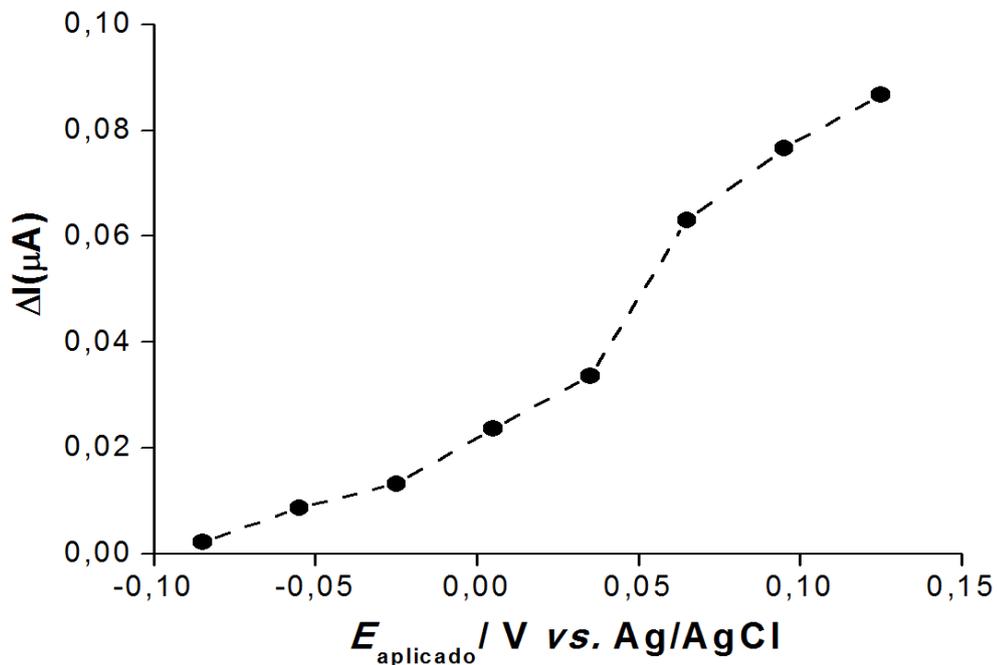
**Figura 35** Gráfico da inclinação de  $I_{cat}/I_{Lim}$  vs. concentração de NADH em ECV/MWCNT/NIC<sub>ativada</sub> em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7 na ausência e presença de NADH,  $E_{inicial} = +0,065$  V e  $E_{final} = -0,050$  V vs. Ag/AgCl, respectivamente.

#### IV.1.7. Detecção amperométrica de NADH

Para obter uma curva analítica para o sensor desenvolvido, amperogramas para a oxidação de NADH foram realizados em diferentes concentrações em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0).

Nas medidas amperométricas, um estudo inicial foi realizado com intuito de determinar o melhor potencial para aplicar no eletrodo para a oxidação de NADH. Assim, o potencial aplicado foi escolhido baseado nas medidas das intensidades da corrente catalítica provenientes da etapa química acoplada. Assim, foram selecionados alguns potenciais a partir dos voltamogramas obtidos, os quais variaram de -0,085 V até 0,125 V vs. Ag/AgCl com um variação de potencial de 30 mV para cada análise.

A partir da Figura 36, observa-se um discreto aumento da corrente do processo de oxidação de NADH para os potenciais entre -0,085 V e 0,035 V vs. Ag/AgCl, com um máximo em 0,065 V vs. Ag/AgCl. Para potenciais de oxidação maiores, a corrente tende a aumentar de forma menos acentuada. Portanto, o potencial aplicado de +0,065 V vs. Ag/AgCl foi selecionado para a oxidação de NADH. Além disso, em potenciais maiores há uma perda de seletividade no tocante a futuras aplicações destas plataformas nonaestruturadas como novos dispositivos nanoestruturadas, tais como biossensores NADH dependentes.

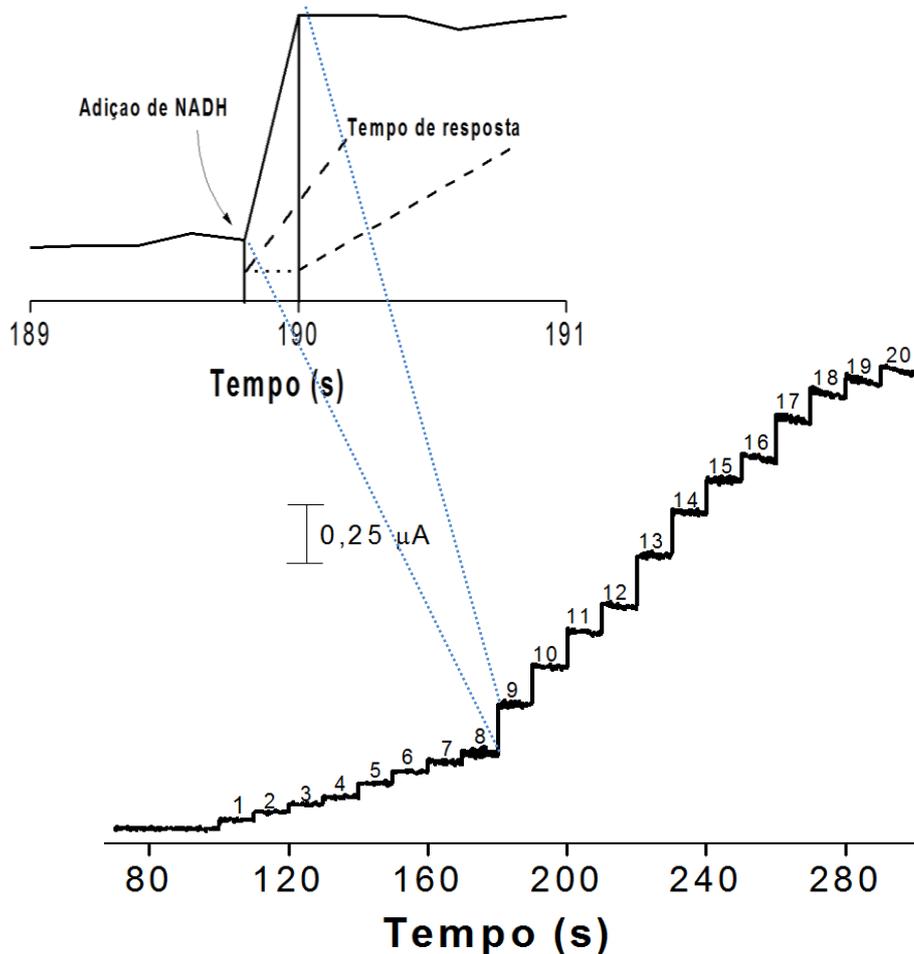


**Figura 36** Corrente em função do potencial aplicado para o ECV/MWCNT/NIC<sub>ativada</sub>, em presença de  $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$  de NADH. Condições utilizadas, tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0.

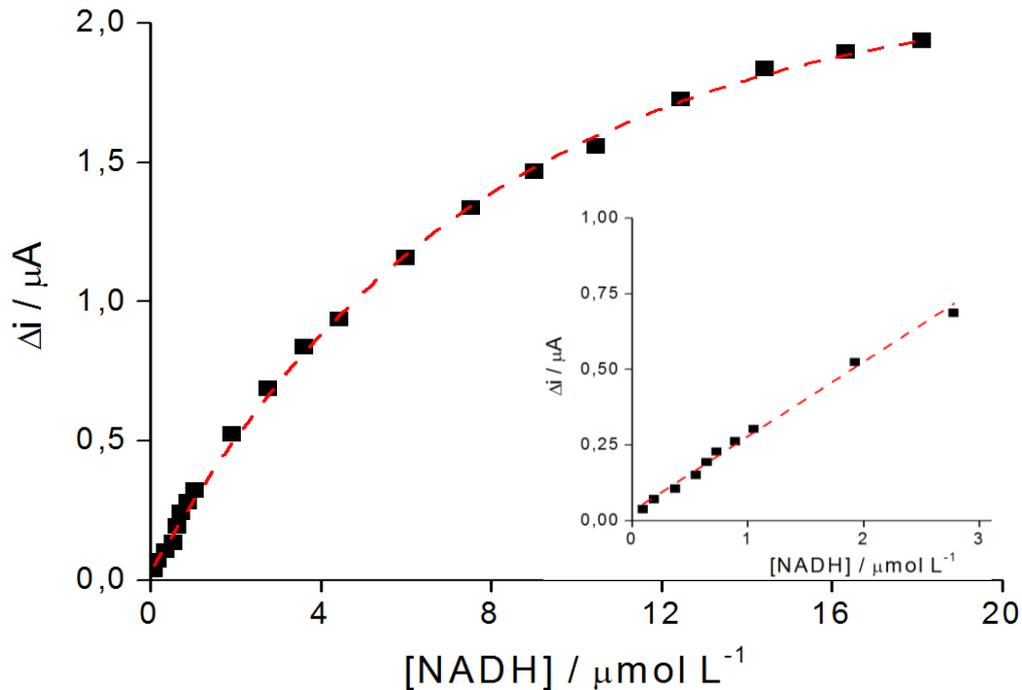
Para obter uma curva analítica para o sensor desenvolvido, amperogramas para a oxidação de NADH foram realizados em diferentes concentrações em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,0) e potencial aplicado de +0,065 V vs. Ag/AgCl (Figura 37). Assim, o sensor amperométrico proposto mostrou uma faixa linear de resposta de  $0,1$  a  $3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  (inserção da Figura 38) com um coeficiente de correlação de

0,999 para  $n = 10$  (Figura 37), que pode ser expressa de acordo com Equação IV.5 seguinte:

$$\Delta I/\mu A = 0,03 (\pm 0,01) + 0,25 (\pm 0,01)[NADH]/\mu mol L^{-1} \quad (\text{Equação IV.5})$$



**Figura 37** Medidas cronoamperométricas para a eletrooxidação de NADH no ECV/MWCNT/NIC<sub>ativada</sub> obtidas em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH 7,0 e [NADH]: (1)0,1-(20)18 μmol L<sup>-1</sup>. **Inserção:** ampliação de degrau do amperograma correspondente à alíquota 9 de NADH, a qual foi usada para calcular o tempo de resposta do sensor.



**Figura 38** Curva analítica para a eletrooxidação de NADH no ECV/MWCNT/NIC<sub>ativada</sub> em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> em pH 7,0 E<sub>aplicado</sub> = +0,065 V vs. Ag/AgCl. **Inserção:** Faixa linear de resposta do sensor.

Assim, esta sensibilidade de 0,25 μA L μmol<sup>-1</sup> pode ser atribuída à eficiência na transferência de elétrons entre a niclosamida ativada e o NADH. Um limite de detecção de 0,029 μmol L<sup>-1</sup> foi determinado usando um razão 3 σ/b e limite de quantificação de 0,095 μmol L<sup>-1</sup> usando 10 σ/b, sendo σ o desvio padrão do valor médio para dez amperogramas do branco e b o coeficiente angular da curva analítica, determinado de acordo com as recomendações da IUPAC (Analytical Methods Committee, 1987).

A resposta para este sensor foi rápida, alcançando um máximo em 0,2 s como pode ser observado na inserção da Figura 37. 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 influi no tempo de resposta. Provavelmente, o procedimento usado para construir o sensor fundamentado em MWCNT e niclosamida ativada *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.

A Tabela 1 (página 33) lista alguns trabalhos reportados na literatura, envolvendo eletrodos quimicamente modificados com vários mediadores para a detecção de NADH. Já, a Tabela IV.2 mostra eletrodos modificados com nitroaromaticos e/ou nanotubos de carbono para fins de comparação com os dados aqui registrados. O sensor construído a base de niclosamida e nanotubos de carbono apresentou valores semelhantes ou melhores do que alguns trabalhos reportados, obtendo assim um potencial de oxidação para NADH menos positivo, uma boa sensibilidade, e um limite de detecção pequeno. Além disso, o sensor é construído de forma simples e a matéria prima é disponível comercialmente.

**Tabela 3** Parâmetros eletroquímicos e analíticos de eletrodos modificados escolhidos.

Plataforma	pH	$E_{\text{aplicado}}$ (mV vs. Ag/AgCl)	Faixa linear ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Sensibilidade ( $\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$ )	LD ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Referência
1 ECV/NF	8,0	-50	5-2000	-	-	(MANO e KUHN, 1999)
2 EPC/ZP	7,0	250	5-120	$3,3 \times 10^{-3}$	0,4	(MUNTEANU <i>et al.</i> , 2004)
3 ECV/MWCNT	6,8	0	20-1000	-	0,5	(CHEN <i>et al.</i> , 2004)
4 EPC/4-NPHN	7,0	100	0,8-8,5	0,5	0,25	(LIMA <i>et al.</i> , 2008a)
5 ECV/MWCNT/3,5-DNBA	7,0	15	4-42	$71 \times 10^{-3}$	1,2	(SANTHIAGO <i>et al.</i> , 2009)
6 ECV/MWCNT/NIC <sub>ativada</sub>	7,0	65	0,1-3	0,25	0,029	ESTE TRABALHO

3,5-DNBA: ácido 3,5-dinitrobenzóico; ECV: eletrodo de carbon vítreo; EPC: Eletrodo de pasta de carbono; MWCNT: Nanotubos de carbono de paredes multiplas; NF: nitroflurenona; 4-NPHN: nitroftalonitrila; NIC<sub>ativada</sub>: Niclosamida ativada; ZP: Fosfato de zinco.

## V. CONCLUSÃO

### V. Conclusões Gerais

Este trabalho relata a construção de uma nova plataforma nanoestruturada simples, fundamentada em nanotubos de carbono de paredes múltiplas funcionalizados com niclosamida ativada *in situ*. Este processo de ativação promove a formação do par redox (NIC-NHOH/NIC-NO) a partir do grupo nitro, sendo uma alternativa viável para a determinação eletrocatalítica de NADH.

Os estudos eletrocatalíticos e cinéticos do NADH empregando a plataforma desenvolvida comprovaram a grande eficiência do mediador, a niclosamida ativada *in situ*, em mediar a transferência de elétrons, envolvendo a molécula de NADH.

Além disso, a plataforma nanoestruturada constitui-se em excelente ambiente para a elaboração de sensores capazes de promover a detecção de NADH, com ótima sensibilidade e estabilidade, bem como um tempo de resposta bastante baixo.

A partir dos sensores desenvolvidos, foi possível operar a célula eletroquímica durante a eletrooxidação do NADH, aplicando potencial de +0,065 V vs. Ag/AgCl para o sensor desenvolvido, o que amplia bastante a possibilidade de uso destes sensores em amostras complexas, pois, neste potencial, o sensor torna-se mais seletivo e muito menos sensível a possíveis interferentes.

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

## VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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**, 17, 913-919, 2002.

AGÜÍ, L. *et al.* Poly-(3-methylthiophene)/carbon nanotubes hybrid composite-modified electrodes. **Electrochim. Acta**, 52, 7946–7952, 2007.

AGÜÍ, L.; SEDEÑO, P. Y.; PINGARRÓM, J. M.. Role of carbon nanotubes in electroanalytical chemistry-Review. **Analytica Chimica Acta**, 622, 11-47, 2008.

Analytical Methods Committee. **Analyst**, 112, 199-204, 1987.

ANTIOCHIA, R.; LAVAGNINI, I.; MAGNO, F.. Electrocatalytic oxidation of NADH at single-wall carbon-nanotube-paste electrodes: kinetic considerations for use of a redox mediator in solution and dissolved in the paste. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 381, 1355-1361, 2005.

ARDAKANI, M. M. *et al.* Electrocatalytic oxidation of cysteine by quinizarine at glassy carbon electrode. **Sensors and Actuators B**, 123, 763-768, 2007.

ADHIKARI, A. PhD. Thesis. Conducting Polyaniline and Polypyrrole: Studies of their Catalytic Properties. University of Pune, 2004.

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

BARTHUS, R. C.; MAZO, L. H.; POPPI, R. J.. Determinação simultânea de NADH e ácido ascórbico usando voltametria de onda quadrada com eletrodo de carbono vítreo e calibração multivariada. **Eclética Química**, 30, 4, 51-58, 2005.

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

CANEVARI, T. C. *et al.* Desenvolvimento de um novo sensor para ácido ascórbico Development of a new ascorbic acid sensor. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, 27, 2, 129-138, jul./dez., 2006.

CARLSON, B.W.; MILLER, L. L.. Mechanism of the oxidation of NADH by quinones. Energetics of one-electron and hydride routes. **Journal of the American Chemical Society**, 107, 479-485, 1985.

CHAKRABORTY, S.; RAJ, C. R.. Mediated electrocatalytic oxidation of bioanalytes and biosensing of glutamate using functionalized multiwall carbon nanotubes-biopolymer nanocomposite. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 609, 155–162, 2007.

CHEN, J.. *et al.* Electrocatalytic oxidation of NADH at an ordered carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. **Analytica Chimica Acta**, 516, 29–34, 2004.

CHENAULT, H.K.; WHITESIDES, G.M.. Regeneration of nicotinamide cofactors for use in enzymatic synthesis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 14, 147-197, 1987.

DANIEL, S. *et al.* A review of DNA functionalized/grafted carbon nanotubes and their characterization. **Sensors and Actuators B**, 122, 672–682, 2007.

DENG, L. *et al.* A sensitive NADH and glucose biosensor tuned by visible light based on thionine bridged carbon nanotubes and gold nanoparticles multilayer. **Biosensors and Bioelectronics**, 24, 951–957, 2008a.

DENG, C. *et al.* Boron-doped carbon nanotubes modified electrode for electroanalysis of NADH. **Electrochemistry Communications**, 10, 907–909, 2008b.

DUARTE, J. C. *et al.* A highly sensitive amperometric sensor for oxygen based on iron(II) tetrasulfonated phthalocyanine and iron(III) tetra-(N-methyl-pyridyl)-porphyrin multilayers. **Analytica Chimica Acta**, 612, 29-36, 2008.

EZERSKIS, Z.; JUSYS, Z.. Electropolymerization of chlorinated phenols on a Pt electrode in alkaline solution Part – I A cyclic voltametry study. **Journal of Applied Electrochemistry**, 31, 1117-1124, 2001.

FIJALEK, Z.; PUGIA, M.; ZUMAN, P.. Polarographic and electrochemical studies of some aromatic nitro compounds: part VII. Polarographic, voltammetric, and controlled potential electrolytic reduction of meta- and para-nitrobenzaldehyde. **Electroanalysis**, 5, 65-78, 1993.

FOTOUHI, L. *et al.*. Electrocatalytic activity of 6,7-dihydroxy-3-methyl-9-thia-4,4a-diazafluoren-2-one / multi-wall carbon nanotubes immobilized on carbon paste electrode for NADH oxidation: Application to the trace determination of NADH. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 639, 15-20, 2010.

FREIRE, R. S.; PESSOA, C. A.; KUBOTA, L. T.. Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. **Química Nova**, 26, 3, 381-389, 2003.

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

GE, B. *et al.*. Preparation of chitosan–dopamine-multiwalled carbon nanotubes nanocomposite for electrocatalytic oxidation and sensitive electroanalysis of NADH. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 137, 547-554, 2009.

GHALKHANI, M.; SHAHROKHIAN, S.. Application of carbon nanoparticle/chitosan modified electrode for the square wave adsorptive anodic stripping voltammetric determination of Niclosamide. **Electrochemistry Communications**, 12, 66-69, 2010.

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

GOLABI, S.M.; ZARE, H.R.; HAMZEHLOO, M.. Electrochemistry and electrocatalytic activity of pyrocatechol violet (PCV) film on a glassy carbon electrode towards the oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide(NADH). **Electroanalysis**, 14, 611-618, 2002.

GOLDSMITH, R.S.. In: Katzung, B.G. (Ed.), Lange Medical, Los Angeles, 659–660, 1984.

GOPALAN, A. I. *et al.*. An electrochemical glucose biosensor exploiting a polyaniline grafted multiwalled carbon nanotube/perfluorosulfonate ionomer–silica nanocomposite. **Biomaterials**, 30, 5999-6005, 2009.

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

GUSTAVO A. R. *et al.*. Carbon nanotubes for electrochemical biosensing-Review. **Talanta**, 74, 291-307, 2007.

HU, C.G.; FENG, B.. Carbon nanotubes used in electroanalysis. **International Journal of Modern Physics B**, 19, 603-605, 2005.

HUANG, M. *et al.*. A simple route to incorporate redox mediator into carbon nanotubes/Nafion composite film and its application to determine NADH at low potential. **Talanta**, 74, 132–139, 2007.

IJIMA, S.. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, 354, 56-58, 1991.

JUNG, D.H. *et al.*. Covalent Attachment and Hybridization of DNA Oligonucleotides on Patterned Single-Walled Carbon Nanotube Films. **Langmuir**, 20, 8886-8891, 2004.

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

KORKUT, S.; KESKINLER, B.; ERHAN, E. An amperometric biosensor based on multiwalled carbon nanotube-poly(pyrrole)-horseradish peroxidase nanobiocomposite film for determination of phenol derivatives. **Talanta**, 76, 1147–1152, 2008.

KRIVENKO, G. *et al.*. Peculiarities of the electrochemical behavior of modified electrodes containing single-wall carbon nanotubes. **Electrochemistry Communications**, 7, 199-204, 2005.

KUMAR, S. A.; CHEN, S. M.. Electrochemically polymerized composites of conducting poly(p-ABSA) and flavins (FAD, FMN, RF) films and their use as electrochemical sensors: A new potent electroanalysis of NADH and NAD<sup>+</sup>. **Sensors and Actuators B**, 123, 964-977, 2007.

LANGER, J. D. *et al.*. Polyaniline biosensor for choline determination. **Surface Science**, 573, 140-145, 2004.

LEE, C. A.; TSAI, Y. C.. Preparation of multiwalled carbon nanotube-chitosan-alcohol dehydrogenase nanobiocomposite for amperometric detection of ethanol. **Sensors and Actuators B**, 138, 518–523, 2009.

LIMA, P. R. *et al.*. Electrochemical investigations of the reaction mechanism and kinetics between NADH and redox-active (NC)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>-NHOH/(NC)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>-NO from 4-nitrophthalonitrile-(NC)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>-NO<sub>2</sub>-modified electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, 24, 448-454, 2008a.

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

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

LIU, A. *et al.*. Effect of solution pH and ionic strength on the stability of poly(acrylic acid)-encapsulated multiwalled carbon nanotubes aqueous dispersion and its application for NADH sensor. **Biosensors and Bioelectronics**, 22, 694–699, 2006.

LIU, J.; TIAN, S.; KNOLL, W.. Properties of polyaniline/carbon nanotubes multilayer films in neutral solution and their application for stable low-potential detection of reduced b-nicotinamide dinucleotide. **Langmuir**, 21, 5596-5599, 2005.

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

LUND, H.. Cathodic reduction of nitro and related compounds. In: Lund, H., Hammerich, O. (Eds.), *Organic Electrochemistry*, fourth ed. (Chapter 9). Marcel Dekker, New York. 389-390, 2001.

LUZ, R. C. S.. *et al.*. Electrocatalytic activity of 2,3,5,6-tetrachloro-1,4-benzoquinone/multi-walled carbon nanotubes immobilized on edge plane pyrolytic graphite electrode for NADH oxidation. **Electrochimica Acta**, 53, 4706–4714, 2008.

MANESH, K. M. *et al.*. A novel glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase into multiwall carbon nanotubes–polyelectrolyte-loaded electrospun nanofibrous membrane. **Biosensors and Bioelectronics**, 23, 771–779, 2008.

MANO, N.; KUHN, A.. Electrodes modified with nitrofluorenone derivatives as a basis for new biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, 16, 653-600, 2001a.

MANO, N.; KUHN, A.. Cation induced amplification of the electrocatalytic oxidation of NADH immobilized by nitro-fluorenone derivatives. A.; **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 498, 58-66, 2001b.

MANO, N.; KUHN, A.. Immobilized nitro-fluorenone derivados as electrocatalysts for NADH oxidation. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 477, 79, 1999.

MARQUES, P. R. B. O.; YAMANAKA, H.. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. **Química Nova**, 31, 7, 1791-1799, 2008.

MIAO, Y. *et al.* Layer-by-layer assembled hybrid film of carbon nanotubes/iron oxide nanocrystals for reagentless electrochemical detection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **Sensors and Actuators B**, 138, 182–188, 2009.

MINNIKANTI, S., SKEATH, P., PEIXOTO, N.. Electrochemical characterization of multi-walled carbon nanotube coated electrodes for biological applications. **Carbon**, 47, 884-893, 2009.

MUNTEANU, F. D.; MANO, N.; KUHN, A.. NADH electrooxidation using carbon paste electrodes modified with nitro-fluorenone derivatives immobilized on zirconium phosphate. **Journal Electroanalytical Chemistry**, 564, 167-178, 2004.

MUNTEANU, F. D. *et al.* NADH Oxidation using carbonaceous electrodes modified with dibenzo-dithia-diazapentacene. **Electroanalysis**, 15, 383-391, 2003.

NASSEF, H. M.; RADI, A.E.; SULLIVAN, C. K. O.. Electrocatalytic sensing of NADH on a glassy carbon electrode modified with electrografted o-aminophenol film. **Electrochemistry Communications**, 8, 1719-1725, 2006.

PATEL, P. D.. (Bio)sensors for measurement of analytes implicated in food safety: a review. **Trends in Analytical Chemistry**, 21, 96-115, 2002.

PEREIRA, A.U.; SANTOS, A.D.; KUBOTA, L.T.. *O*-Phenylenediamine adsorbed onto silica gel modified with niobium oxide for electrocatalytic NADH oxidation. **Electrochimica Acta**, 48, 3541-3550, 2003.

RADOI, A.; COMPAGNONE, D.. Recent advances in NADH electrochemical sensing design. **Bioelectrochemistry**, 76, 126–134, 2009.

RAJ, C. R.; CHAKRABORTY, S.. Carbon nanotubes–polymer–redox mediator hybrid thin film for electrocatalytic sensing. **Biosensors and Bioelectronics**, 22, 700–706, 2006.

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

RUBIANES, M. D.; RIVAS, G. A.. Enzymatic Biosensors Based on Carbon Nanotubes Paste Electrodes. **Electroanalysis**, 17, 73-78, 2005.

SALIMI, A. *et al.*. Highly sensitive sensor for picomolar detection of insulin at physiological pH, using GC electrode modified with guanine and electrodeposited nickel oxide nanoparticles. **Biosensors and Bioelectronics**, 24, 792–798, 2008.

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

SANTOS, A. D.; GORTON, L.; KUBOTA, L. T.. Nile blue adsorbed onto silica gel modified with niobium oxide for electrocatalytic oxidation of NADH. **Electrochimica Acta**, 47, 3351-3360, 2002a.

SANTOS, A. D.; GORTON, L.; KUBOTA, L. T.. Electrocatalytic NADH Oxidation Using an Electrode Based on Meldola Blue Immobilized on Silica Coated with Niobium Oxide. **Electroanalysis**, 14, 805-812. 2002b.

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

SOTIROPOULOU, S. *et al.*. Novel carbon materials in biosensor systems. **Biosensors and Bioelectronics**, 18, 211-215, 2003.

STEGE, P.W. *et al.*. Determination of arylsulphatase and phosphatase enzyme activities in soil using screen-printed electrodes modified with multi-walled carbon nanotubes. **Soil Biology & Biochemistry**, 41, 2444–2452, 2009.

SUN, W. *et al.*. Electrochemical behaviors of metol on hydrophilic ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate-modified electrode. **Sensors and Actuators B**, 136, 419–424, 2009.

SUNI, I. I.. Impedance methods for electrochemical sensors using nanomaterials. **Trends in Analytical Chemistry**, 7, 604-611, 2008.

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

TU, X.; *et al.*. Synthesis and Characterization of Novel Quinone-Amine Polymer/Carbon Nanotubes Composite for Sensitive Electrocatalytic Detection of NADH. **Electroanalysis**, 19, 1815-1821, 2007.

VARELA, H. ; MALTA, M.; TORRESI, R. M.. Técnicas in situ de baixo custo em eletroquímica: a microbalança a cristal de quartzo. **Química Nova**, 23, 5, 664-679, 2000.

VASANTHA, V. S.; CHEN, S. M.. Synergistic effect of a catechin-immobilized poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-modified electrode on electrocatalysis of NADH in the presence of ascorbic acid and uric acid. **Electrochimica Acta**, 52, 665-674, 2006.

VASCONCELOS, E. A. *et al.*. Potential of a simplified measurement scheme and device structure for a low cost label-free point-of-care capacitive biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, 25, 870-876, 2009.

WANG, H. *et al.*. Room-temperature ionic liquids/multi-walled carbon nanotubes/chitosan composite electrode for electrochemical analysis of NADH. **Electrochimica Acta**, 52, 6630-6637, 2007.

WANG, J.. Modified electrodes for electrochemical sensors. **Electroanalysis**, 3, 255-259, 1991.

WANG, J.. Analytical Electrochemistry, 2nd ed., John Wiley & Sons, Inc.: New York, 2000.

WANG, Q.; DONG, D.; LI, N.. Electrochemical response of dopamine at a penicillamine self-assembled gold electrode. **Bioelectrochemistry**, 54, 169-175, 2001.

XIA, W. *et al.*. A highly efficient gas-phase route for the oxygen functionalization of carbon nanotubes based on nitric acid vapor. **Carbon**, 47, 919-922, 2009.

XIANG, C. *et al.*. Direct electron transfer of cytochrome c and its biosensor based on gold nanoparticles/room temperature ionic liquid/carbon nanotubes composite film. **Electrochemistry Communications**, 10, 38-41, 2008.

YANG, D-W.; LIU, H-H.. Poly(brilliant cresyl blue)-carbonnanotube modified electrodes for determination of NADH and fabrication of ethanol dehydrogenase-based biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, 25, 733-738, 2009.

YOGESWARAN, U.; CHEN, S-M.. Separation and concentration effect of f-MWCNTs on electrocatalytic responses of ascorbic acid, dopamine and uric acid at f-MWCNTs incorporated with poly (neutral red) composite films. **Electrochimica Acta**, 52, 5985–5996, 2007.

ZARE, H. R.; GOLABI, S. M.. Electrocatalytic oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) at a chlorogenic acid modified glassy carbon electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 464, 14-23, 1999.

ZARE, H.R. *et al.* Norepinephrine-modified glassy carbon electrode for the simultaneous determination of ascorbic acid and uric acid. **Electrochimica Acta**, 50, 3495-3502, 2005.

ZENG B.; DING, X.; ZHAO, F.. Voltammetric Response of Glutathione and 3-Mercaptopropionic Acid Self-Assembled Monolayer Modified Gold Electrodes to Cu(II). **Electroanalysis**, 14, 651-656, 2002.

ZENG, J. *et al.* Fabrication of poly(toluidine blue O)/carbon nanotube composite nanowires and its stable low-potential detection of NADH. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 595, 152-160, 2006.

ZENG, J. *et al.* Fabrication of carbon nanotubes/poly(1,2-diaminobenzene) nanoporous composite via multipulse chronoamperometric electropolymerization process and its electrocatalytic property toward oxidation of NADH. **Sensors Actuators B**, 120, 595–602, 2007.

ZHAI, X *et al.* Layer-by-Layer Assembled Film Based on Chitosan/Carbon Nanotubes, and its Application to Electrocatalytic Oxidation of NADH. **Microchimica Acta**, 154, 315-320, 2006.

ZHANG, M.; SMITH, A.; GORSKI, W.. Carbon nanotube-chitosan system for electrochemical sensing based on dehydrogenase enzymes. **Analytical Chemistry**, 76, 5045–5050, 2004.

ZHANG, M. e GORSKI, W.. Electrochemical Sensing Based on Redox Mediation at Carbon Nanotubes. **Analytical Chemistry**, 77, 3960-3965, 2005.

ZHANG, D. P. *et al.* Voltammetric Behavior of o-Nitrophenol and Damage to DNA. **International Journal of Molecular Sciences**, 9, 316-326, 2008.

ZHENG, L.; SONG, J-F.. Ni(II)–baicalein complex modified multi-wall carbon nanotube paste electrode toward electrocatalytic oxidation of hydrazine. **Talanta**, 79, 319–326, 2009.

ZHOU, H. *et al.*. Direct electrochemistry and electrocatalysis of catalase immobilized on multi-wall carbon nanotubes modified glassy carbon electrode and its application **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 612, 173-178, 2008.

ZHU, L. *et al.*. Electrocatalytic oxidation of NADH with Meldola's blue functionalized carbon nanotubes electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, 22, 2768-2773, 2007a.

ZHU, L.; *et al.*. Sol–gel derived carbon nanotubes ceramic composite electrodes for electrochemical sensing. **Sensors and Actuators B**, 125, 254-261, 2007b.

## VII. PERSPECTIVAS

Pretende-se dar continuidade aos estudos ora reportados no que tange ao esclarecimento do processo eletródico em ação no ECV/MWCNT/NIC<sub>ativado</sub>, na determinação das espécies eletrogeradas, no emprego do sensor na eletroanálise em matrizes biológicas de outras substâncias biologicamente ativas, na análise de possíveis interferentes, e no desenvolvimento de novas plataformas a base de outras matrizes tais como sílica gel modificada, visando o aumento do efeito catalítico, bem como utilizar novos compostos com grupo nitro, mostrando-se desta forma a potencialidade do material desenvolvido.

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