

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

SUÉLEN HARUMI TAKAHASHI

**Sensores eletroquímicos de óxido nítrico baseados
em polímeros condutores**

São Paulo

17/04/2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

SUÉLEN HARUMI TAKAHASHI

**Sensores eletroquímicos de óxido nítrico baseados
em polímeros condutores**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em
Química (Físico-Química)*

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Susana Inés Córdoba de Torresi

São Paulo

2009

Suélen Harumi Takahashi

Sensores eletroquímicos de óxido nítrico baseados em polímeros condutores

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em Físico-
Química*

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

***Dedico este trabalho aos meus pais Nelson e Lidia, às
minhas irmãs Érica e Karen e ao meu companheiro e
sempre amigo André por toda ajuda, amor e compreensão.***

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À Susana pela oportunidade e confiança (já que vim de outra cidade e de outro grupo de pesquisa), pela orientação, paciência, conselhos e amizade.

Ao Roberto pela convivência e ensinamentos.

À galera do LME (Laboratório de Materiais Eletroativos): Fernando, Kelly, Leo, Mariana, Marcelo, Tânia, Tati, Vinícius e Vitor pelas inúmeras caronas, conversas, bandejões, LME vai ao....., conselhos, amizade e ajuda no manuseio dos equipamentos.

À Simone por toda ajuda, amizade, pedidos atendidos, principalmente pelo nitrogênio.

Ao pessoal da ABEUNI (Aliança Beneficente Universitária de São Paulo) por me fazer andar de metrô sem conhecer São Paulo e sozinha (hehehe), pela confiança, amizade, paciência, pelas viagens e acima de tudo, por dar esperanças a mim e à população carente, de um mundo melhor.

À professora Silvia Serrano e ao professor Lúcio, pelo apoio e sugestões dadas a mim durante o meu exame de qualificação.

À professora Elizabeth por ceder um espaço em seu freezer para armazenar o citocromo c.

Ao Professor José Mauricio Rosolen e a sua aluna Elaine pela síntese e por disponibilizar os nanotubos de carbono.

Ao instituto de química da USP e à secretaria de pós-graduação pela oportunidade e apoio.

À central analítica por todo suporte.

À minha família, tios, tias, primos, primas, avôs e avós por todo apoio, ajuda e compreensão.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida.

RESUMO

Takahashi, S. H., **Sensores eletroquímicos de óxido nítrico baseados em polímeros condutores**. 2009. 74p. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Neste trabalho, foram desenvolvidos sensores eletroquímicos para a detecção amperométrica do óxido nítrico (NO) fundamentada na aplicação da ftalocianina tetrasulfonada de níquel (NiTsPc) e do poli(5-amino 1-naftol) (poli(5-NH₂ 1-NAP)). NiTsPc foi eletrodepositada por voltametria cíclica sobre o eletrodo de platina e caracterizada eletroquimicamente em diferentes pHs. A detecção amperométrica de NO foi bastante sensível, mas o eletrodo não apresenta seletividade suficiente, motivo pelo qual este material foi substituído pelo poli(5-NH₂ 1-NAP) modificado com citocromo c. A imobilização foi caracterizada por voltametria cíclica e microbalança a cristal de quartzo. As detecções amperométricas do NO foram efetuadas aplicando o potencial em -0,6 V e foi observado que a variação da corrente devido à adição do NO ocorreu somente no segundo dia após a imobilização da proteína, o que pode estar relacionado a mudanças de estrutura do citocromo c covalentemente ligado. O poli(5-NH₂ 1-NAP) foi também eletropolimerizado sobre nanotubos de carbono, obtendo assim um eletrodo nanoestruturado e o citocromo c foi imobilizado nessa estrutura. Assim como para os eletrodos maciços, ele não respondeu ao NO logo após a imobilização do citocromo c, respondendo somente no segundo dia e apresentou um melhor desempenho devido a sua maior área superficial.

Palavras-chave: Polímero condutor, sensor, óxido nítrico, ftalocianina tetrasulfonada de níquel, poli(5-amino 1-naftol), citocromo c

ABSTRACT

Takahashi, S. H. **Electrochemical nitric oxide sensor based on conducting polymers.** 2009. 74p. Masters Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

In this work, electrochemical sensors for nitric oxide (NO) amperometric detection were prepared. For this purpose nickel tetrasulfonated phthalocyanine (NiTsPc) and poly(5-amino 1-naphthol) (poly(5-NH₂ 1-NAP)) modified with cytochrome c were applied. NiTsPc was electropolymerized by cyclic voltammetry at platinum electrode and were electrochemically characterized in different pHs. NO amperometric detections were very sensitive, but the electrode does not present satisfactory selectivity, and because of this, the material was replaced by poly(5-NH₂ 1-NAP) modified with cytochrome c. The immobilization was characterized by cyclic voltammetry and electrochemical crystal microbalance. NO amperometric detection has been carried out by applying -0.6 V and it was observed that the current due the NO sensing was only observed at the second day after protein immobilization. This can be related with cytochrome c structural change. For nanostructuring the surface of Poly(5-NH₂ 1-NAP) it was electropolymerized on carbon nanotubes felt electrodes and cytochrome c was immobilized. As well as the bulk electrode, the nanostructured one did not sense NO immediately after the cytochrome c immobilization, being possible to observe current only after the second day displaying a much better performance due to its high superficial area.

Keywords: Conducting polymer, sensor, nitric oxide, nickel tetrasulfonated phthalocyanine, Poly (5-amino 1-naphthol), cytochrome

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CC	Cloreto cianúrico
cit c	Citocromo c
CV	Carbono vítreo
MECQ	Microbalança eletroquímica à cristal de quartzo
NiTsPc	Ftalocianina tetrasulfonada de níquel
NTC	Nanotubo de carbono
PBS	Solução tampão fosfato
poli(5-NH ₂ 1-NAP)	Poli(5-amino 1-naftol)
poli(5-NH ₂ 1-NAP)/CC	Cloreto cianúrico ligado covalentemente ao poli(5-NH ₂ 1-NAP)
poli(5-NH ₂ 1-NAP)/CC/cit c	Citocromo c ligado covalentemente ao poli(5-NH ₂ 1-NAP) tendo o cloreto cianúrico como ponte entre eles

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Sensores.....	12
1.2 Biossensores.....	13
1.2.1 Métodos de imobilização de moléculas biológicas.....	13
1.3 Polímeros condutores.....	17
1.3.1 Poli(5-amino 1-naftol).....	18
1.4 Ftalocianinas tetrasulfonada de níquel.....	21
1.5 Óxido Nítrico.....	22
1.5.1 Sensor para NO.....	24
1.6 Citocromo c.....	26
1.7 Nanotubos de carbono.....	27
2. OBJETIVOS.....	30
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	31
3.1 Reagentes.....	31
3.2 Instrumentação.....	32
3.2.1 Potenciostato.....	32
3.2.2 Microbalança eletroquímica a cristal de quartzo.....	32
3.2.3 Microscopia eletrônica de varredura.....	33
3.3 Metodologia.....	33

3.3.1 Síntese do óxido nítrico.....	33
3.3.2 NiTsPc.....	34
3.3.2.1 Eletrodeposição da NiTsPc.....	34
3.3.2.2 Caracterização.....	35
3.3.2.3 Detecção amperométrica do NO pelo NiTsPc.....	35
3.3.3 Citocromo c.....	37
3.3.3.1 Eletrodo maciço.....	37
3.3.3.1.1 Imobilização do citocromo c no eletrodo.....	37
3.3.3.1.2 Caracterização.....	39
3.3.3.1.3 Detecção amperométrica do NO pelo citocromo c ancorado.....	40
3.3.3.2 Nanoestruturação da matriz polimérica do poli(5-NH ₂ 1-NAP)..	40

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....43

4.1 NiTsPc.....	43
4.1.1 Eletrodeposição do NiTsPc.....	43
4.1.2 Caracterização.....	44
4.1.3 Detecção amperométrica do NO.....	46
4.2 Citocromo c.....	50
4.2.1 Eletropolimerização do poli(5-amino 1-naftol).....	50
4.2.2 Caracterização.....	51
4.2.3 Detecção amperométrica do NO pelo citocromo c.....	54
4.2.4 Nanoestruturação da matriz polimérica do poli(5-NH ₂ 1-NAP)	61

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	65
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
7. SÚMULA CURRICULAR.....	73

1. INTRODUÇÃO

1.1 Sensores

Sensor é um dispositivo analítico, que fornece, em tempo real, informação com relação à presença de um composto específico ou íons numa amostra. Geralmente o processo de reconhecimento é seguido pela conversão da informação química em um sinal elétrico ou óptico. Ele converte a atividade de um íon específico numa solução em um potencial elétrico.

Outras técnicas como UV-vis e espectrofotometria, espectrometria de absorção atômica, fluorometria etc. estão à disposição dos pesquisadores para determinar a presença e a concentração do composto em estudo (analito). Geralmente esses métodos fornecem resultados reprodutíveis, com grande sensibilidade e seletividade. Porém, todas essas técnicas requerem instrumentos sofisticados e manipulação da amostra antes das medidas serem realizadas, tornando-as inviáveis. Os sensores químicos, por outro lado, não possuem pré-requisitos. Eles fornecem resultados precisos, reprodutíveis, rápidos e podem determinar ao mesmo tempo, várias espécies químicas. Além disso, é uma técnica que pode não destruir a amostra e adaptável para soluções de pequeno volume e em espaços pequenos, possibilitando o monitoramento on-line e *in vivo*.

Os sensores são baseados na transformação da informação química em um sinal elétrico. Eles contêm duas unidades básicas de funcionamento; um deles é a parte receptora, que transforma a informação química em uma forma de energia, e a outra, é o transdutor que transforma a energia, que suporta a informação química, em um sinal mensurável.

1.2 Biossensores

Biossensor eletroquímico é um dispositivo analítico formado por uma molécula biológica imobilizada sobre a superfície de um transdutor, que juntos relacionam a concentração do analito, a uma resposta que pode ser medida.

A vantagem do uso da molécula biológica é que ela fornece a seletividade imprescindível na determinação do analito, e assim, o biossensor responde somente á substância de interesse (WALLACE; SMYTH; ZHAO, 1999). Por este motivo, a forma com que a biomolécula é imobilizada no transdutor, que neste caso é o eletrodo, é muito importante.

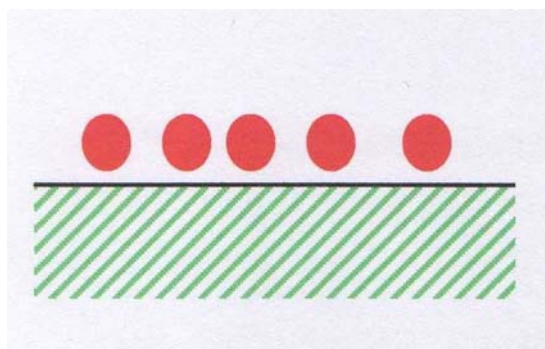
1.2.1 Métodos de imobilização de moléculas biológicas

Com o avanço no desenvolvimento de biossensores, surgiram problemas relacionados ao desempenho da proteína, causados pela sua difusão, ocorrendo a perda da macromolécula biológica do eletrodo (especialmente as mais custosas), baixa estabilidade da biomolécula e o tempo de vida do biossensor. Além disso, há a necessidade de reduzir o tempo que a proteína necessita para responder ao analito, tornar o sistema viável para uso comercial e ser facilmente aplicado em sistemas estacionário ou em fluxo (AMINE et al., 2006). Para superar esses desafios, várias formas de imobilizar a biomolécula têm sido estudadas. O processo de imobilização em superfícies condutoras é o procedimento chave para o desempenho do dispositivo eletroquímico. Para que a proteína seja adequadamente imobilizada, o procedimento deve satisfazer alguns pré-requisitos, que são:

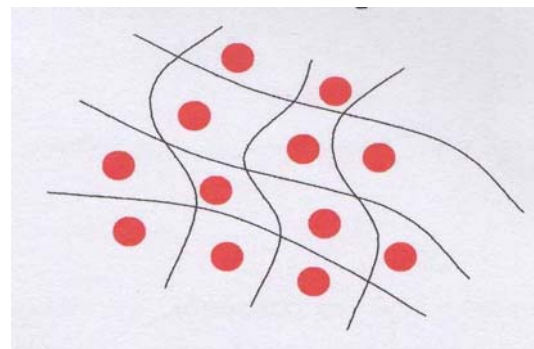
- a imobilização de macromoléculas biológicas na superfície do transdutor deve ser estável e eficiente,
- ele deve manter completamente as propriedades biológicas da enzima,

- o material deve ser compatível e quimicamente inerte em relação à estrutura hospedeira,
- o componente biológico deve ser acessível quando imobilizado (COSNIER, 2003).

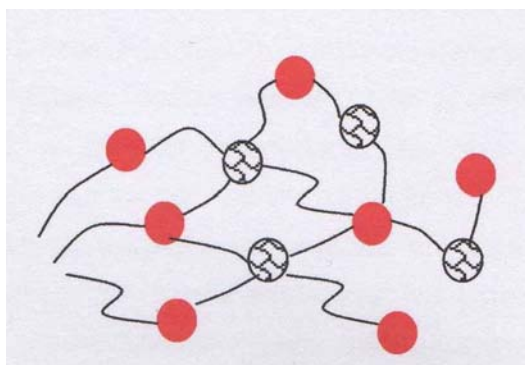
A imobilização de biomoléculas pode ocorrer de diversas maneiras, como a adsorção física, microencapsulação, aprisionamento, crosslinking e a ligação covalente. Para melhor visualização, alguns tipos de imobilização estão ilustrados na Figura 1.



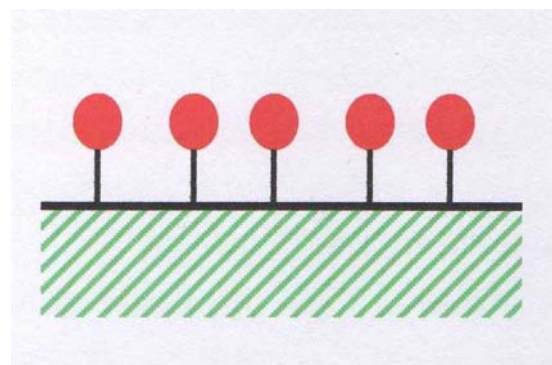
Adsorção física



Aprisionamento



Crosslinking



Ligação covalente

Figura 1: Representação de algumas formas de imobilização da proteína (círculo vermelho) no eletrodo.

Adsorção física:

No processo de adsorção física, a biomolécula é adsorvida na interface polímero/solução devido à interação eletrostática entre a matriz policatiônica do polímero oxidado e a carga negativa da enzima, quando o pH do meio é maior que o ponto isoelétrico da proteína (VIDAL; RUIZ; CASTILLO, 2003). Porém, esse processo possui algumas desvantagens como a atração eletrostática pode mudar com o pH, a adsorção é limitada à uma única camada sobre a superfície do polímero, conseqüentemente a quantidade de proteína incorporada é pequena (DICKS et al., 1993). Além disso, a biomolécula imobilizada é lixiviada para a solução durante os experimentos, o que diminui o tempo de vida e a estabilidade do eletrodo.

Microencapsulação

Neste método, uma membrana inerte é usada para prender o biomaterial no transdutor. Este método foi usado no primeiro biossensor para glicose.

As vantagens deste tipo de imobilização são: o biomaterial e o transdutor ficam bem próximos, o grau de especificidade da proteína é mantido, há uma grande estabilidade frente às mudanças de temperatura, pH e força iônica. A grande desvantagem desta forma de imobilização também é a lixiviação da biomolécula.

As membranas mais usadas são acetato de celulose, que exclui proteínas e diminui o transporte de interferentes; policarbonato, um material sintético que não é seletivo; colágeno, uma proteína natural; e náfon. Este último, tem sido aplicado sobre o polímero condutor depositado no eletrodo para diminuir o efeito dos interferentes.

Aprisionamento

Um gel polimérico é preparado numa solução contendo a proteína. A enzima é então aprisionada no interior da matriz do gel. O polímero mais comumente usado é a poliacrilamida. Ele é sintetizado pela co-polimerização da acrilamida com o N,N'-metilenobisacrilamida.

A perda da enzima pelos poros e a inibição da difusão do analito, que diminui a velocidade reação e assim, o tempo de resposta do sensor, são as limitações desse tipo de imobilização.

Crosslinking

Neste método, o agente bifuncional como, por exemplo, o glutaraldeído, é usado para ligar covalentemente o biomaterial ao material suporte. As desvantagens desse método são o difícil controle da reação de imobilização, a grande quantidade do biomaterial necessária para a reação e a baixa atividade da enzima após a imobilização.

Imobilização por ligação covalente

Para alcançar um aumento na estabilidade e tempo de vida da enzima no eletrodo, é necessária que a imobilização da biomolécula no material que compõe o eletrodo seja forte e eficiente, por isso, a ligação covalente da enzima com o transdutor é a forma mais adequada de imobilização. Este método envolve a ligação covalente entre um grupo funcional do biomaterial com a da matriz suporte.

A ligação covalente da biomolécula com o polímero condutor ocorre em duas etapas: síntese do polímero funcionalizado seguido pela imobilização covalente.

Algumas formas de ligar covalentemente a enzima no polímero condutor estão ilustradas na Figura 2 (EGGINS, 1996).

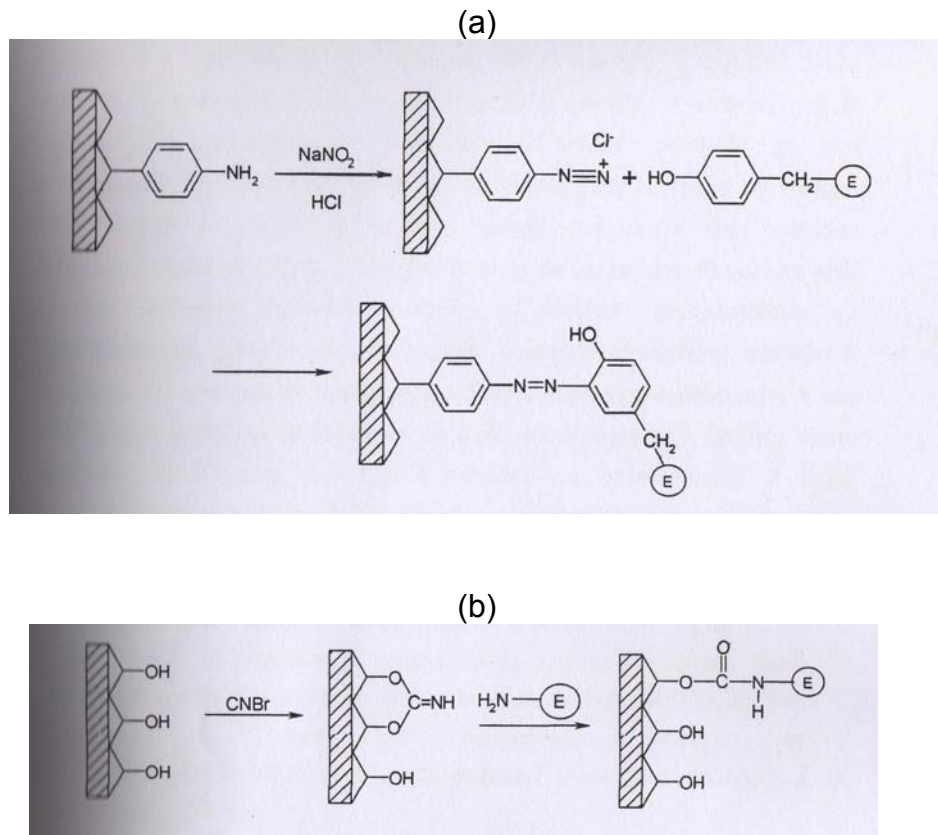


Figura 2: Algumas formas de imobilizar a molécula biológica. (a) Acoplamento de sais de diazônio, (b) imobilização usando cianobrometo.

1.3 Polímeros condutores

Polímeros condutores são materiais que foram descobertos há 20 anos e os pesquisadores possuem considerável interesse na sua propriedade condutora, química e bioquímica. Por isso, os polímeros condutores possuem numerosas aplicações na área (bio) analítica e tecnológica. Os polímeros condutores são facilmente sintetizados e depositados sobre a superfície condutora de um dado substrato a partir da solução de seu monômero por polimerização eletroquímica com controle na sua taxa de formação e espessura.

Os polímeros condutores pertencem a uma classe de polímeros que apresentam duplas ligações conjugadas e o aspecto mais importante, sob o ponto de vista

eletroquímico desse tipo de material é a capacidade de agir como um condutor eletrônico. Esta propriedade é controlada pela sua mudança no estado redox em função do potencial aplicado e é acompanhado pelo movimento de entrada e saída dos íons dopantes no material que, neste caso, depende da carga do polímero. A sua propriedade eletrônica permite a transferência de carga entre o biomaterial incorporado e o eletrodo produzindo um sinal analítico (WALLACE; SMYTH; ZHAO, 1999).

Inicialmente, os polímeros sintetizados quimicamente não são condutores (estado neutro) e é somente através da oxidação e menos frequentemente da redução que o transporte de cargas necessário para a condutividade é formado. O polímero no estado condutor (estado oxidado) é positivamente carregado, e para manter a sua neutralidade é necessária a presença de contra-íons (dopantes). Num outro extremo, pode-se reduzir o polímero, tornando-o neutro, transformando-o na sua forma isolante, o que exige a saída daqueles contra-íons da matriz polimérica.

1.3.1 Poli (5-amino 1-naftol)

O poli(5-amino 1-naftol) (poli(5-NH₂ 1-NAP)) é um polímero condutor que pode ser sintetizado a partir da eletropolimerização do monômero 5-amino 1-naftol (5-NH₂ 1-NAP) sobre eletrodo de carbono vítreo e platina. A particularidade deste monômero é que ele possui dois grupamentos funcionais –NH₂ e –OH (Figura 3 (a)), e ambos podem ser eletroquimicamente oxidados. Em meio básico, a polimerização ocorre pela oxidação do grupo –OH, formando uma estrutura poli(óxido naftaleno), enquanto que em meio ácido, a eletropolimerização seletiva ocorre pelo grupo –NH₂. O polímero resultante possui duas formas estruturais: uma resultante do acoplamento em *pára*, com relação ao substituinte –NH₂, com ocorrência majoritária

e formando estrutura do tipo polianilina (Figura 3 (b)); e outra resultante do acoplamento na posição *orto*, também com relação ao substituinte $-NH_2$, que leva a uma estrutura do tipo *ladder* (Figura 3 (c)) e, como podemos observar, o grupamento $-OH$ não é afetado durante a polimerização (CINTRA et al., 2003; CINTRA et al., 2004).

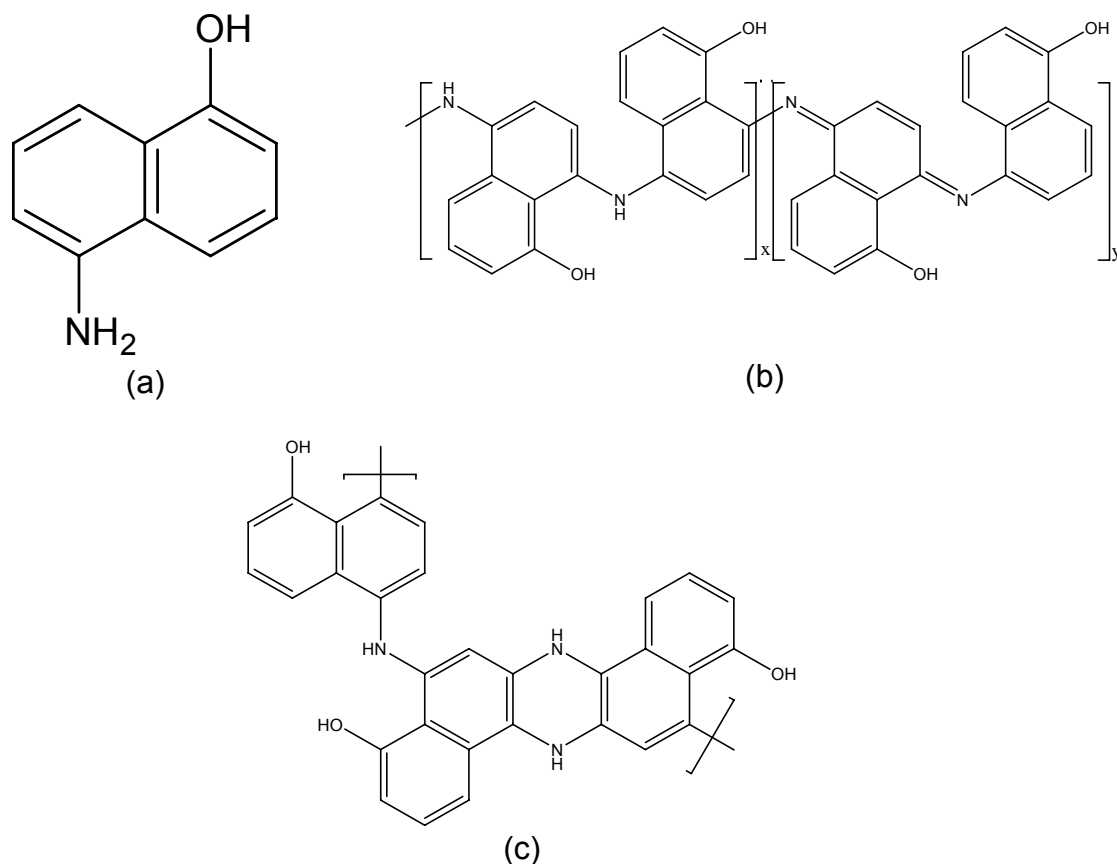


Figura 3: Estrutura do monômero 5-amino 1-naftol (a), e do polímero, (b) acoplamento em *pára* e formação da estrutura tipo polianilina, (c) acoplamento na posição *orto* e formação da estrutura do tipo *ladder*.

O polímero formado em meio ácido tem sido aplicado para a proteção à corrosão, já que ele possui uma estrutura muito parecida com a polianilina, que é conhecida pela sua propriedade passivadora com relação ao ferro e os grupos $-OH$ presentes no polímero possibilitam a sua reação com outras substâncias, protegendo o material da corrosão (MENEGUZZI et al., 1999). Além disso, alguns pesquisadores tem aplicado o poli(5- NH_2 1-NAP) em biossensores.

Murphy (MURPHY, 1998) estudou a habilidade de filmes de naftalenos substituídos na prevenção da oxidação de interferentes contidos no plasma como ascorbato e ácido úrico na detecção de peróxido pelo eletrodo de platina. Os filmes preparados a partir do 2,3-, 1,5- e 1,8-diaminonaftalenos e 5-amino 1-naftol foram comparados com os filmes preparados a partir do *o*-, *m*- e *p*- fenilenodiamina nos quesitos de permeabilidade seletividade e estabilidade. Os filmes apresentaram alta seletividade ao peróxido de hidrogênio. A mudança na seletividade desses filmes foi determinada por 21 dias e, enquanto os filmes *o*-, *m*- e *p*- fenilenodiamina apresentaram alguma deterioração, os outros filmes mantiveram a sua permeabilidade seletividade sem mudanças nos seus filmes por 21 dias.

Seguindo a mesma linha, Vidotti e colaboradores (VIDOTTI et al., 2004) estudaram métodos para reduzir o sinal dos interferentes causado pelo ácido ascórbico e úrico na detecção amperométrica da amônia. O eletrodo foi preparado pela deposição eletroquímica do polipirrol dopado com ânions dodecil benzeno sulfônico sobre o substrato de platina. O polipirrol foi então coberto com membranas de náfon, acetato de celulose e poli(5-NH₂ 1-NAP) com o intuito de obter diferentes meios de diminuir a resposta dos interferentes. Eles obtiveram que quando o polipirrol foi coberto pelo náfon, houve uma retenção efetiva dos interferentes, especialmente o ácido úrico. Não houve uma diminuição da resposta da detecção da amônia, nem a perda da linearidade e, neste caso, o mecanismo de eliminação de interferentes seria por atração eletrostática. Como o acetato de celulose obstrui fisicamente substâncias grandes, o ácido ascórbico e úrico não interferiu nos resultados, porém a resposta amperométrica da amônia diminuiu pois, apesar de ser menor que ascorbato e úrico, ela é impedida de chegar aos sítios de oxidação do polipirrol. No caso do poli(5-NH₂ 1-NAP), como ele foi eletropolimerizado em meio

ácido, os grupos –OH livres fornecem uma grande densidade eletrônica, protegendo os sítios de nitrogênios positivamente carregados presentes na cadeia polimérica do polipirrol. Como resultado, a penetração de ânions como o ascorbato e úrico foi bloqueada por esse filme polimérico. Além disso, houve um aumento na corrente amperométrica na detecção da amônia, resultando num aumento da sensibilidade.

Outra aplicação do poli(5-NH₂ 1-NAP) na detecção amperométrica foi como substrato para a imobilização de urease (MASSAFERA; CÓRDOBA DE TORRESI, 2009), já que quando polimerizado eletroquimicamente em meio ácido, ele possui grupamento –OH livres. Neste caso, os pesquisadores depositaram eletroquimicamente o polipirrol e em seguida o poli(5-NH₂ 1-NAP) e imobilizaram sobre essa estrutura a urease por adsorção física, aprisionamento em acetato de celulose, crosslinking com glutaraldeído e por ligação covalente. O eletrodo obtido foi aplicado na detecção indireta da uréia, via amônia. Dentre as quatro maneiras com que a urease foi imobilizada, a ligação covalente apresentou maior sensibilidade e maior tempo de vida na detecção amperométrica da uréia, devido ao aumento da estabilidade conferida pela ligação covalente.

1.4 Ftalocianina tetrasulfonada de níquel

Ftalocianina e seus derivados foram extensivamente usados como corantes e em tintas. Hoje, eles são comumente empregados na alta tecnologia, como em células foto voltaicas, eletrônica e sensores. As características mais importantes das ftalocianinas são a sua estabilidade térmica e química.

Ftalocianina tetrasulfonada tem sido facilmente depositada sobre diferentes tipos de material suporte, incluindo os eletrodos. A imobilização desses compostos no eletrodo pode modificar a sua superfície formando eletrodos modificados com

propriedades catalíticas. Mais de 70 tipos diferentes de íons metálicos podem formar complexos pela coordenação com o anel da ftalocianina. Por ser completamente plana, a estrutura do anel aromático permite que a ftalocianina seja depositada em camadas e, assim, a interação predominante entre as moléculas é a π -empilhada. A estrutura do anel aromático pode ser oxidada e/ou reduzida e se o metal central for um elemento de transição, ele pode sofrer oxidação ou redução em potenciais próximo ao do anel. Dentre as metalo ftalocianina tetrasulfonada, a ftalocianina tetrasulfonada de níquel (NiTsPc) é a que tem se destacado na detecção de óxido nítrico.

Filmes de NiTsPc obtidos deposição eletroquímica (voltametria cíclica e em solução básica) do monômero foram estudados por Ureta-Zañartu e colaboradores (URETA-ZAÑARTU et al., 2005). Eles obtiveram que o material obtido era rugoso, poroso e com alta condutividade iônica. A massa do eletrodo aumentou devido à eletrodeposição do NiTsPc.

1.5 Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é um radical livre altamente instável e em sistemas biológicos é sintetizado cataliticamente a partir da redução da L-arginina pelo óxido nítrico sintase formando a L-citrulina e NO.

Ele age como mensageiro fisiológico e agente citotóxico (IGNARRO et al., 1987; KOSHLAND, 1992). Em sistemas biológicos, o NO possui algumas propriedades interessantes como: é o mediador chave nas atividades antitumorais e antimicrobiais (LANGREHR et al., 1993; LINCOLN; HOYLE; BURNSTOYCK, 1997; NATHAN; HIBBIS, 1991), é um neurotransmissor em comunicações neurais (MURPHY et al., 1993; OHTA et al., 1993; RUGGIERO et al., 1996), participa no processo de cicatrização de feridas, é um anticoagulante e, além disso, modula a

adesão de plaquetas e a agregação de neutrófilos (HUGHES, 1999; LANCASTER, 1999; LIPTON et al., 1993). Porém, em concentrações elevadas o NO pode causar doença de Alzheimer e Parkinson (MONCADA; PALMER; HIGGIS, 1989; REES et al., 1990).

Devido a essas propriedades, por ter sido considerada a molécula do ano pela revista Science em 1992 (KOSHLAND, 1992) e, além disso, por ter dado aos pesquisadores R.F. Furchgott, L.J. Ignarro e F. Murad o Prêmio Nobel de medicina em 1998 pela descoberta da ação vasodilatadora do NO, nos últimos anos, o interesse na pesquisa envolvendo o NO aumentou de forma muito expressiva, principalmente na determinação da sua concentração *in vivo*.

Essa quantificação, porém, é um pouco difícil devido ao fato de que o seu tempo de meia vida ser curto, cerca de 5 segundos, e à sua alta reatividade com componentes biológicos como superóxido, oxigênio, tióis entre outros. Existem alguns métodos para medir a concentração de NO que são: quoluminescência (BECKMAN; CONGERT, 1995; ROBINSON; BOLLINGER; BIRKS, 1999), método de Griess (GREEN et al, 1982), espectrometria de ressonância paramagnética (WENMALM; LANNE, PETTERSON, 1990), espectrofotometria (BREDT; SNYDER, 1989) e bioensaio (WALLACE; WOODMAN, 1995). Cada uma dessas técnicas possui as suas vantagens, mas deixam a desejar na sensibilidade e necessitam de um arranjo experimental complexo e às vezes caro. Além disso, essas técnicas são limitadas já que não conseguem medir a concentração de NO continuamente (em tempo real) e o mais importante *in vivo*.

Até hoje, a detecção eletroquímica (amperométrica) de NO é a única técnica viável e que possui sensibilidade suficiente para determinar a concentração de NO em tempo real e *in vivo*, e para diminuir ou até eliminar o efeito de interferentes,

como o nitrito e nitrato, pode-se modificar a superfície do eletrodo empregado na detecção. Além disso, como os eletrodos podem ser fabricados em escala micro e nano, esta técnica é beneficiada por poder determinar a concentração de NO em sistemas vivos sem algum efeito significativo no paciente devido à inserção do eletrodo.

1.5.1 Sensores para NO

O primeiro eletrodo usado para a determinação eletroquímica do NO (sem intermediários) foi descrito em 1990 por Shibuki (SHIBUKI, 1990). Ele usou um eletrodo de platina, no qual o potencial de oxidação do NO por esse eletrodo foi de 0,8 ou 0,9 V (em relação a um fio de prata). Porém este eletrodo não respondeu linearmente para concentrações maiores que $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ e, além disso, outras substâncias foram oxidadas nesses potenciais.

Em 1992, foi descrito um eletrodo que consistiu numa membrana de metalo porfirina eletroquimicamente depositada sobre um eletrodo de carbono vítreo recoberto com uma fina camada de Náfion (MALINSK; TAHA, 1992). As medidas diretas de NO foram realizadas aplicando este eletrodo modificado e obtiveram resultados com alta sensibilidade e seletividade.

Um composto que tem substituído a metaloporfirina na detecção do NO é a metalofteralocianina, pois, elas possuem estruturas e propriedades semelhantes. Por este motivo, a metalofteralocianina pode oxidar ou reduzir o NO e, além disso, o seu filme é mais estável à degradação do que a da metaloporfirina. Dentre as metalofteralocianinas, a que tem sido extensivamente pesquisada na detecção do NO é a fteralocianina tetrasulfonada de níquel (NiTsPc).

Pontié e colaboradores (PONTIÉ et al., 2000) prepararam dois micro sensores aplicando duas combinações de filmes de NiTsPc, *o*-fenilenodiamina (*o*-PD) e náfion para modificar a superfície de eletrodos de carbono com 8 µm de diâmetro. Eles compararam o desempenho do eletrodo com a composição carbono/NiTsPc/náfion e carbono/náfion/*o*-PD e obtiveram que a sensibilidade do eletrodo ao NO diminuiu quando foi usado somente o náfion, e aumentou quando foi usado as duas combinações do filme. Além disso, o eletrodo modificado com filmes de espessura mais fina apresentou valores maiores de sensibilidade e, o eletrodo com o filme de carbono/NiTsPc/náfion pode detectar simultaneamente a dopamina, nitrito assim como ascorbato e NO.

Já Pereira-Rodrigues e colaboradores (PEREIRA-RODRIGUES et al., 2002) depositaram o NiTsPc sobre o eletrodo de platina e obtiveram que apesar da simultânea formação de óxido de platina, o NiTsPc depositado ofereceu uma interessante alternativa na elaboração de uma nova configuração do eletrodo e que além disso, foi capaz de detectar o NO com grande sensibilidade. Este eletrodo foi testado em amostras biológicas por Pailleret e colaboradores (PAILLERET et al., 2003) na qual eles conseguiram monitorar a liberação do NO pelas células endoteliais.

Outro polímero usado para detectar o NO foi a poli(tionina) polimerizada eletroquimicamente sobre o eletrodo de carbono vítreo e recoberto com uma camada de náfion (CHEN et al., 2006). Os pesquisadores obtiveram que o sensor para NO exibiu uma ampla faixa linear de resposta, limite de detecção baixa, resposta rápida ao analito e alta seletividade e sensibilidade. Além disso, o sensor apresentou uma determinação rápida e em tempo real do NO liberado pelo rim de um rato.

O citocromo c também foi utilizado na detecção do NO (KOH et al., 2008; LIU et al., 2007a; LIU et al., 2007b) e devido á sua especificidade, ele pode evitar a interferência de outras substâncias na detecção. Ao contrário do náfon, ele não diminui a resposta do eletrodo ao analito, já que o cit c possui sítio eletroativo (Ferro) que pode oxidar ou reduzir o NO, assim quanto mais cit c imobilizado, a resposta (seletividade, sensibilidade, faixa linear de resposta) do eletrodo ao NO poderá ser melhor.

1.6 Citocromo c

Citocromo c (cit c) é uma das proteínas transportadoras de elétrons mais importante e extensivamente estudado, particularmente devido à sua alta solubilidade em água. É uma hemeproteína, que na forma nativa, possui o ferro hexacoordenado, sendo que o quinto e sexto ligante é a histidina 18 e metionina 80, respectivamente. Como a metionina é um ligante de campo forte, o ferro do citocromo c se encontra, na sua forma nativa, no estado de baixo spin. Porém, alterações da condição do meio ou a presença de algum ligante, a ligação ferro-enxofre pode se tornar fraca e se quebrar (NANTES et al., 2001). E, como é de se esperar, a mudança na ligação do ferro pode afetar a estrutura e função do citocromo c.

Desde a descoberta da sua transferência direta de elétrons em 1977 (EDDOWES; HILL, 1977; YEH; KUWANA, 1977), seu comportamento eletroquímico tem sido descrito para vários eletrodos modificados e aplicado como biossensor principalmente na detecção de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico.

Propriedades redox do cit c adsorvido no eletrodo modificado pela técnica de camada automontada foram estudadas por Chen e colaboradores (CHEN et al.,

2002). Eles variaram a camada automontada obtida pelos alcanotióis tendo como grupo terminal o trimetil amônio (1), sulfonado (2), metil (3), amina (4), ácido carboxílico (5) e tiol aromático (6). O potencial de oxidação e redução do cit immobilizado em 1 e em 5 foram relativamente semelhantes ao potencial redox formal do cit nativo determinado em solução. Já os potenciais de oxidação/redução do cit c immobilizado em 3, 4 e 6 foram diferentes do valor do cit c nativo, indicando que o cit c muda a sua conformação na imobilização nessas superfícies.

Liu e colaboradores (LIU et al., 2007b) imobilizaram por voltametria cíclica o citocromo c no eletrodo de ouro modificado pela L-cisteína (imobilização da proteína por aprisionamento). O voltamograma do eletrodo modificado em solução tampão apresentou um comportamento quase reversível e uma excelente atividade electrocatalítica em relação á oxidação do NO, e a corrente catalítica foi diretamente proporcional à concentração do analito.

Outra forma de imobilizar o cit c no eletrodo foi estudada por Darain e colaboradores (DARAIN et al., 2007). Eles imobilizaram covalentemente o cit c por ligação covalente em um polímero condutor. Os potenciais de oxidação e redução foram similares com o valor do cit c nativo. Eles aplicaram o eletrodo na detecção de peróxido de hidrogênio e o potencial usado foi extremamente baixo, evitando que os interferentes interfiram na resposta do eletrodo.

1.7 Nanotubos de carbono

Desde a descoberta dos nanotubos de carbono (NTCs) em 1991 (IJIMA, 1991), houve um interesse crescente no uso dos NTCs nas áreas química e bioquímica e, além disso, em dispositivos eletrônicos em escala nanométrica devido a algumas propriedades como: alta condutividade, por ser quimicamente inerte, por

possuir uma área superficial grande. Além disso, a força da ligação covalente C-C dos NTCs, que é por natureza muito forte, torna o NTC um dos materiais mais rígidos e resistentes e ainda, por possuir uma estrutura oca e compacta, os NTCs podem suportar uma tensão sem apresentar uma deformação plástica resultante da ruptura das ligações.

Os NTCs possuem uma estrutura tubular com diâmetros em escala nanométrica e um valor alto na relação comprimento/diâmetro. Os NTCs são divididos em dois grupos: nanotubos de carbono de paredes únicas e de paredes múltiplas. Os nanotubos de carbono de paredes únicas são formados por uma única camada, como se fosse uma folha longa enrolada em forma cilíndrica numa certa direção. As propriedades desse nanotubo são impostas pela direção em que ele é empacotado e o seu diâmetro. Os nanotubos de carbono de paredes múltiplas possuem duas regiões separadas (a parte interna e externa) com propriedades físicas e químicas bem diferentes devido à suas estruturas. Os nanotubos da parte interna consistem em carbonos ordenados em forma hexagonal enquanto que os carbonos da região externa são ordenados em forma hexagonal e pentagonal.

Os NTCs são excelentes candidatos para serem usados como biossensores já que, os eletrodos de NTCs possuem condutividade maior do que o grafite (LI et al., 2002; VALENTINI et al., 2003). Seu desempenho é superior aos eletrodos de ouro, platina e outros eletrodos de carbono. Os NTCs podem imobilizar enzimas e proteínas na sua cavidade da parte central, sem que o material biológico perca a sua atividade. E, além disso, os NTCs melhoram a resposta eletroquímica de algumas biomoléculas (MUSAMEH et al., 2002; ZAO; GAN; ZHUANG, 2002) e promovem as reações de transferência de elétrons da proteína (WANG, 2005).

Li e colaboradores (LI et al., 2005) imobilizaram covalentemente a glicose oxidase nos NTCs de paredes múltiplas. Eles caracterizaram o produto final por espectroscopia infravermelho, microscopia de força atômica e de transmissão. Através dos experimentos de eletroquímica após a imobilização da enzima, eles obtiveram que a bioatividade da glicose oxidase foi mantida e pode catalisar especificamente a oxidação da glicose. A corrente de oxidação apresentou uma dependência linear com a concentração da enzima numa faixa de 0,5 a 40 mmol L⁻¹ com limite de detecção de 30 μmol L⁻¹ e a sensibilidade de 11,3 μA / mmol L⁻¹ cm⁻².

Outro trabalho envolvendo a imobilização da glicose oxidase nos NTCs foi realizado por Wu e colaboradores (WU et al., 2007). Eles usaram a amônia como precursora na modificação dos NTCs para aumentar a sua solubilidade e então imobilizar a enzima. E o resultado obtido foi que os NTCs modificados apresentaram uma excelente solubilidade em água e os voltamogramas sugeriram que o aumento na molhabilidade dos NTCs aumentou a velocidade de transferência de elétrons do eletrodo. A resposta da glicose oxidase imobilizada no NTC apresentou uma rápida resposta, grande seletividade e sensibilidade com a adição da glicose.

Já Kum e colaboradores (KUM et al., 2007) polimerizaram eletroquimicamente o polipirrol no NTCs e o citocromo c foi usado como dopante, imobilizando dessa forma o citocromo c no eletrodo. O desempenho do eletrodo como sensor para peróxido de hidrogênio foi melhor do que para o citocromo c aprisionado num filme fino de polipirrol.

2. OBJETIVO

Esta dissertação de mestrado tem como objetivo o desenvolvimento de sensores eletroquímicos para a detecção e quantificação amperométrica de óxido nítrico em solução.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes

Os reagentes usados durante o desenvolvimento da dissertação e a sua procedência estão agrupados em ordem alfabética na Tabela 1. Todos os reagentes foram usados sem prévia purificação.

Tabela 1: Reagentes usados.

Reagente	Fórmula	Procedência
Ácido clorídrico	HCl	Quimex
Ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄	Synth
5-amino 1-naftol	H ₂ NC ₁₀ H ₆ OH	Sigma-Aldrich
Cloreto cianúrico	C ₃ Cl ₃ N ₃	Sigma-Aldrich
Citocromo c	-	Sigma-Aldrich
Hidróxido de sódio	NaOH	Synth
Ftalocianina tetrasulfonada de níquel	C ₃₂ H ₁₂ N ₈ Na ₄ NiO ₁₂ S ₄	Sigma-Aldrich
Fosfato de sódio monobásico	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	Reagen
Nitrato de sódio	NaNO ₃	Synth
Nitrito de sódio	NaNO ₂	Synth
Nitrogênio gasoso	N ₂	Oxilúmen
Sódio fosfato bibásico heptahidratado	Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	Nuclear

A solução tampão fosfato (PBS) de pH 7,4 (0,1 mol L⁻¹) constituiu em uma solução de fosfato de sódio (Na₂HPO₄.7H₂O e NaH₂PO₄.H₂O) e o pH foi ajustado para 7,4 com a adição de NaOH.

3.2 Instrumentação

3.2.1 Potenciostato

Os experimentos de voltametria cíclica e cronoamperometria foram realizados usando um potenciostato da Eco Chemie, Autolab PGSTAT 30 com uma cela de três eletrodos, sendo que o eletrodo de referência e contra eletrodo foram respectivamente Ag/AgCl ($\text{NaCl } 3 \text{ mol L}^{-1}$) e uma placa de platina. O eletrodo de trabalho para a eletrodeposição de NiTsPc foi o eletrodo de platina (BAS) com $0,02 \text{ cm}^2$ de diâmetro. Já para a imobilização do citocromo c, o eletrodo usado foi de carbono vítreo (BAS) com $0,07 \text{ cm}^2$ de diâmetro.

3.2.2 Microbalança eletroquímica à cristal de quartzo (MECQ)

Os experimentos de microbalança eletroquímica a cristal de quartzo foram realizados usando um frequencímetro modelo SR620 da Standford Research Systems, conectado a uma fonte de tensão alternada modelo GP 322 da Dual e a um computador para aquisição dos dados. Os experimentos eletroquímicos realizados simultaneamente com o monitoramento da frequência foram realizados usando um potenciostato Omnimetra modelo PG3901 e uma cela de três eletrodos, onde o eletrodo de Ag/AgCl ($\text{NaCl } 3 \text{ mol L}^{-1}$) e uma placa de platina foram usados como eletrodo de referência e contra eletrodo, respectivamente. O eletrodo de trabalho utilizado para o acompanhamento da variação da frequência em ambos os casos foi o cristal de quartzo AT (Valper-Fisher), 6 MHz, com diâmetro de 25 mm e com uma área piezo ativa de $0,31 \text{ cm}^2$ (Figura 4). Uma camada de ouro foi previamente vaporizada sobre a camada de cromo nas duas faces do eletrodo para aumentar a sua aderência sobre o quartzo.

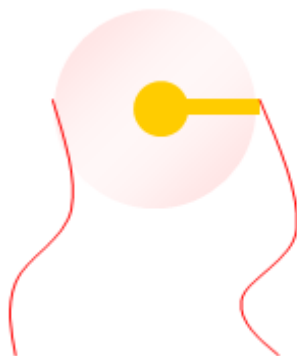


Figura 4: Cristal de quartzo com depósito de ouro.

A equação de Sauerbrey, $\Delta f = -K \Delta m$, foi usada para correlacionar a frequência de ressonância (Δf , em Hz) com a variação de massa por unidade de área (Δm , em g cm^{-2}). O valor de K de $6,45 \cdot 10^7 \text{ Hz g}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ usado para este experimento foi determinado pela calibração usando uma deposição de prata como descrito anteriormente (GABRIELLI; KEDDAM; TORRESI, 1991).

3.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens foram obtidas usando um microscópio FESEM, JSM-7401 da Jeol.

3.3 Metodologia

3.3.1 Síntese do óxido nítrico

O gás NO foi produzido através do gotejamento lento de uma solução 2 mol L^{-1} de ácido sulfúrico (H_2SO_4) em um frasco contendo solução saturada de nitrito de sódio (NaNO_2). O NaNO_2 , neste caso, poder gerar o NO através da reação de desprotonação, já que está em meio ácido (Equação 1) (COTTON; WILKINSON, 1988). O gás gerado (NO) foi borbulhado em uma solução de NaOH 30%(m/m) para a remoção de possíveis traços de NO_2 , resultante da oxidação do NO pelo gás oxigênio presente no ar atmosférico. Em seguida, o gás foi borbulhado em água destilada, obtendo-se assim uma solução saturada de NO de concentração $1,8 \text{ mmol}$

L⁻¹ a 20° C (BUTLER; WILLIAMS, 1993). Antes de realizar a síntese do NO, o gás nitrogênio (N₂) foi borbulhado em todas as soluções a fim de retirar todo o gás oxigênio e elas foram mantidas sob atmosfera de N₂ durante todo o experimento. As soluções padrões de NO usadas nos experimentos de detecção foram obtidas pela diluição dessa solução saturada de NO. A representação da síntese do NO está ilustrada na Figura 5.

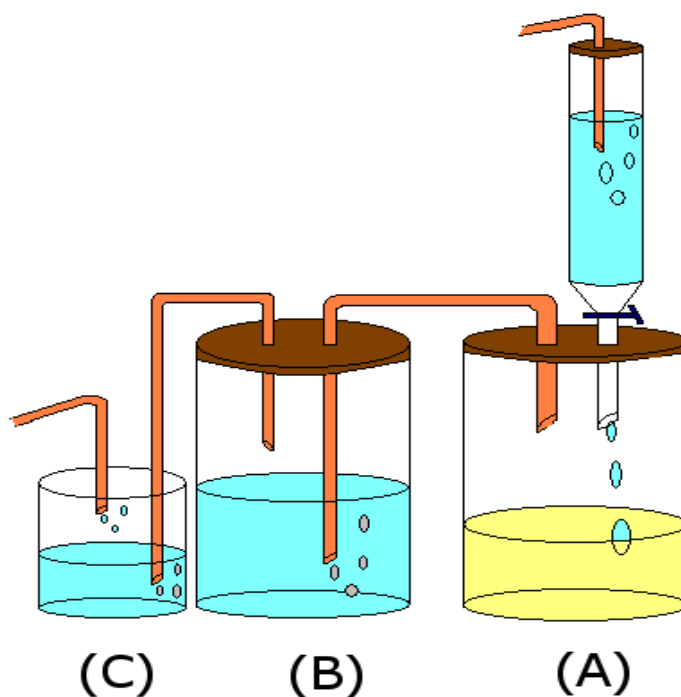
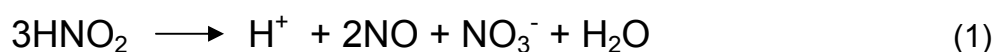


Figura 5: Esquema da síntese da solução saturada de óxido nítrico, (A) o ácido sulfúrico é gotejado na solução saturada de nitrito de sódio, formando o óxido nítrico que é então borbulhado na solução de hidróxido de sódio (B) e em seguida em água (C), resultando numa solução de NO com concentração de 1,8 mmol L⁻¹.

3.3.2 NiTsPc

3.3.2.1 Eletrodeposição da NiTsPc

A eletrodeposição do NiTsPc foi realizada seguindo o método pré estabelecido por Diab e colaboradores (DIAB et al., 2003). O NiTsPc (2 mmol L⁻¹ em

0,1 mol L⁻¹ de NaOH) foi eletrodepositado na superfície do eletrodo por repetidos ciclos de voltametria cíclica entre 0 V e 1,2 V, com velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹.

3.3.2.2 Caracterização

Eletroatividade do NiTsPc

A eletroatividade do filme de NiTsPc foi monitorada por voltametria cíclica entre os potenciais de 0,3 V e 0,6 V, com velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹ e em diferentes pHs.

3.3.2.3 Detecção amperométrica do NO pelo NiTsPc

Como o NO reage rapidamente com o oxigênio, as detecções foram realizadas em uma câmara de atmosfera controlada como ilustrada na Figura 6. A atmosfera de nitrogênio no interior da câmara foi mantida durante todo o experimento e o oxigênio gasoso presente nas soluções foi removido borbulhando o nitrogênio.



Figura 6: Câmara de atmosfera controlada utilizada durante a detecção amperométrica de NO.

Uma cela de três eletrodos foi usada para as detecções amperométricas do NO, neste caso, o potencial foi aplicado e as variações da corrente, em razão da oxidação/redução do NO adicionado periodicamente em solução tampão fosfato (PBS, eletrólito) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4), foram monitoradas. Em busca de um melhor desempenho do eletrodo, o potencial aplicado e o número de ciclos da eletrodeposição do NiTsPc foram variados. As adições de NO foram de $40 \mu\text{L}$ da solução estoque para um volume de 5 mL de eletrólito. A partir da curva analítica (densidade de corrente em função da concentração) pode-se obter o limite de detecção, faixa linear de trabalho, sensibilidade e o tempo de resposta. Sendo que, o limite de detecção é a concentração mínima do analito que o eletrodo consegue detectar, que é dado pela relação 3 vezes o desvio padrão da curva. A faixa linear de trabalho é o intervalo em que a corrente varia linearmente com a adição de eletrólito, correspondendo à uma curva analítica (equação de primeiro grau). A

sensibilidade com relação ao analito é a mudança na resposta resultante da variação da sua concentração. Para o caso de uma curva analítica, esse valor é correspondente à inclinação da reta representa a resposta vs quantidade do analito. E o tempo de resposta é o tempo que o eletrodo leva para responder à adição da substância de interesse.

Além disso, foi estudada a influência dos íons nitrito e nitrato na detecção do NO. A alíquota de cada analito adicionada foi de $7,2 \mu\text{mol L}^{-1}$. O íon nitrito é resultante da auto-oxidação do NO, pois o NO reage com o oxigênio formando o dióxido de nitrogênio, que em contato com a água forma os íons nitrito. Já o nitrato é formado pela reação do NO com superóxido ou hemoglobina e, além disso, o nitrito é convertido a nitrato pela hemoglobina (DOYLE; HERMAN; DYKSTRA, 1985; IGNARRO et al., 1993).

3.3.3 Citocromo c

3.3.3.1 Eletrodo maciço

3.3.3.1.1 Imobilização do citocromo c no eletrodo.

A imobilização do citocromo c no eletrodo envolveu duas etapas, a eletropolimerização do monômero 5-NH₂ 1-NAP e a ligação covalente do citocromo c na matriz desse polímero, tendo o cloreto cianúrico como uma ponte entre eles.

Eletropolimerização:

A eletropolimerização do poli (5-NH₂ 1-NAP) no eletrodo de carbono vítreo ($0,07 \text{ cm}^2$ de diâmetro) foi obtida a partir do seu monômero bifuncional 5-amino 1-naftol (1 mmol L^{-1}) em meio ácido (HCl 1 mol L^{-1}), através de variados ciclos de voltametria cíclica, aplicando o potencial de $-0,2 \text{ V}$ a $0,9 \text{ V}$ nos dois primeiros ciclos e

de -0,2 V a 0,7 V nos ciclos subsequentes, com velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹. O potencial aplicado foi diminuído de 0,9 V para 0,7 V devido à possibilidade da superoxidação do material formado. A variação da massa do polímero foi monitorada durante a eletropolimerização através da técnica MECQ.

Imobilização do citocromo c na matriz polimérica:

Após a eletropolimerização, o eletrodo foi lavado em solução PBS 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,4) e em seguida, mergulhado em uma solução alcoólica de cloreto cianúrico (100 mg mL⁻¹) por 24 h sob agitação. Passado este tempo, o eletrodo foi novamente lavado com solução de PBS e mergulhado em uma solução de citocromo c (0,5 mg mL⁻¹) por 24 h a 4^o C e na ausência de luz. O eletrodo modificado foi armazenado em PBS pH 7,4 sem o citocromo c, na ausência de luz e a 4^o C até a sua utilização.

As reações que envolvem a imobilização do citocromo c na matriz polimérica estão ilustradas na Figura 7.

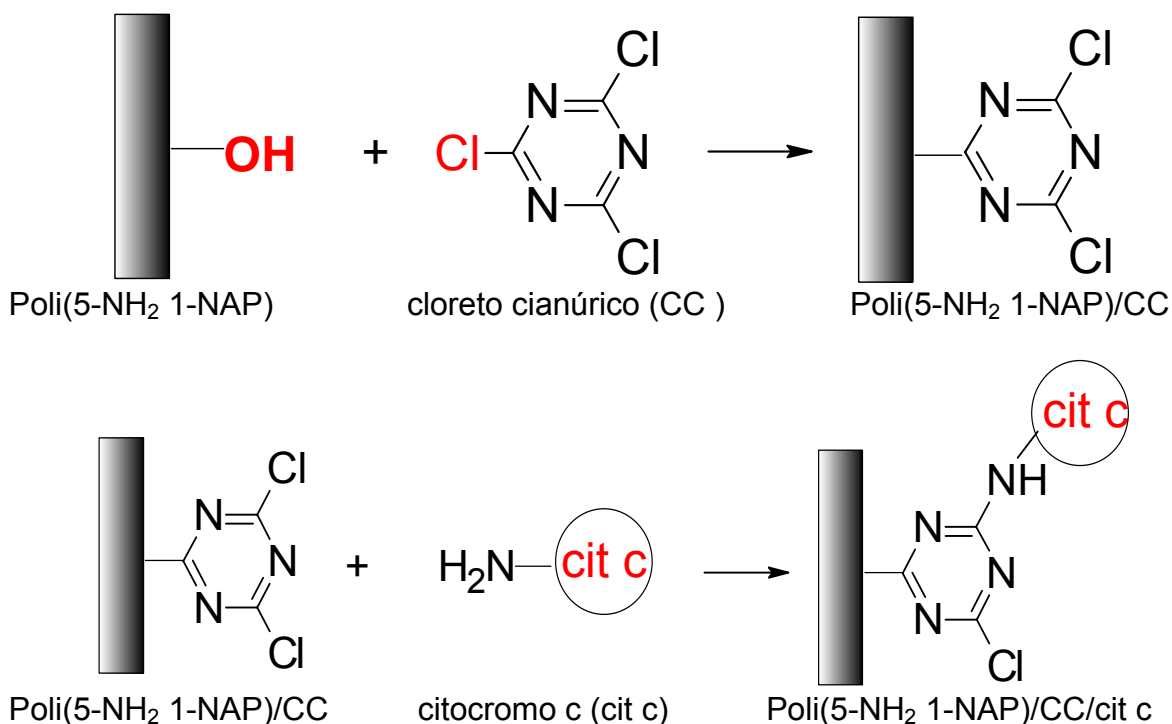


Figura 7: Reações envolvidas na imobilização do citocromo c no poli(5-NH₂ 1-NAP).

3.3.3.1.2 Caracterização

Voltametria cíclica

Para comprovar a imobilização do citocromo c no eletrodo por ligação covalente, foram obtidos os voltamogramas do poli(5-NH₂ 1-NAP) e do citocromo c ligado ao polímero, numa janela de potencial de -0,9 V a 0,2 V, com velocidade de varredura de 20 mV s⁻¹ e, além disso, voltamogramas do eletrodo modificado foram obtidos em diferentes velocidades de varredura.

Microbalança eletroquímica à cristal de quartzo

A variação da massa do eletrodo durante a reação do citocromo c com o eletrodo foi monitorada utilizando a MECQ (Figura 8). Para tal, a polimerização do poli (5-NH₂ 1-NAP) e a reação deste com o cloreto cianúrico foram realizadas da mesma maneira que para o eletrodo de carbono vítreo, sendo que o polímero foi obtido com 10, 50 e 70 ciclos de voltametria cíclica e o eletrodo de trabalho neste caso foi o cristal de quartzo.



Figura 8: Microbalança eletroquímica à cristal de quartzo usada na monitoração da massa no eletrodo de cristal de quartzo.

3.3.3.1.3 Detecção amperométrica do NO pelo citocromo c ancorado

O potencial a ser aplicado durante a detecção amperométrica do NO pelo cit c imobilizado no poli(5-NH₂ 1-NAP) foi determinado por voltametria cíclica do poli(5-NH₂ 1-NAP)/CC/cit c em PBS (20 mV s⁻¹) com a adição de alíquotas de uma solução de NO.

As detecções do NO foram realizadas conforme descrito no item 3.3.2.3 (Detecção amperométrica do NO pelo NiTsPc), porém com algumas modificações. O potencial aplicado foi de -0,6 V, as adições de NO foram de 25 e/ou 40 µL de uma solução 0,36 µmol L⁻¹.

3.3.3.2 Nanoestruturação da matriz polimérica do Poli(5-NH₂ 1-NAP)

Para que o eletrodo modificado seja nano estruturado, a polimerização foi realizada sobre nanotubos de carbono. Esses nanotubos de carbono foram obtidos pela decomposição do metanol com partículas metálicas de cobalto e manganês a 650^o C e depositados sobre fibras de feltro do mesmo material, que foram

sintetizadas a partir de poliacrilonitrila (ROSOLEN et al., 2006). Na Figura 9 (a) temos a microscopia eletrônica de varredura das fibras do feltro, em (b) temos uma fibra do feltro e aproximando mais de perto, podemos observar os nanotubos (c). A polimerização do poli(5-NH₂ 1-NAP) e a imobilização do citocromo c no eletrodo foram realizadas da mesma maneira que na seção 3.3.3.1.1.

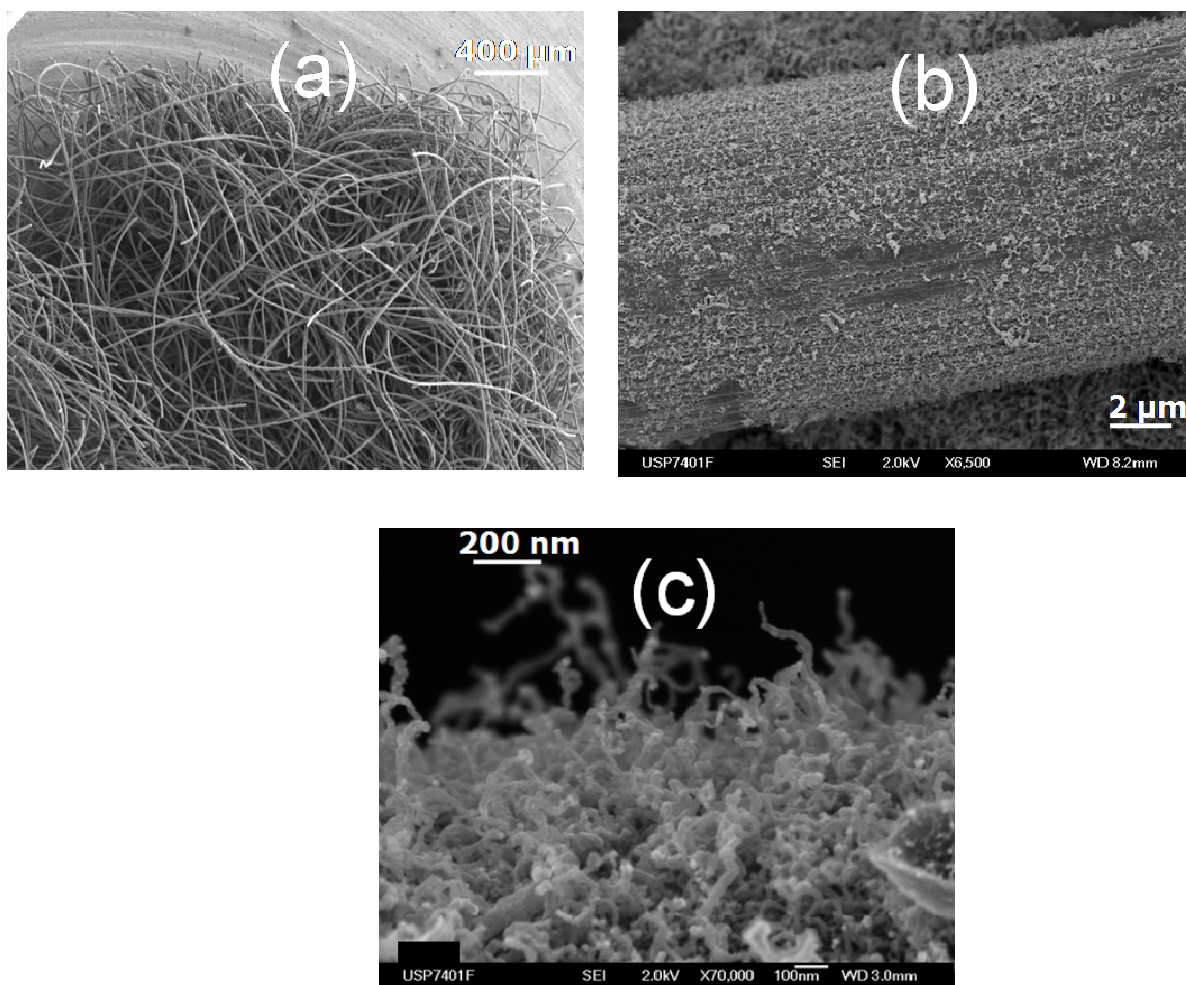


Figura 9: Microscopia eletrônica de varredura do (a) fibras do feltro (b) uma fibra e (c) os nanotubos

Microscopia eletrônica de varredura dos feltros

Com o intuito de se obter detalhes morfológicos do polímero sobre os nanotubos de carbono, as fotografias do feltro foram obtidas antes e depois da polimerização.

Detecção amperométrica do NO

As detecções do NO pelo citocromo c imobilizado no poli(5-NH₂ 1-NAP) nanoestruturado foram realizadas da mesma maneira que para o polímero maciço (3.3.3.1.3).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 NiTsPc

4.1.1 Eletrodeposição do NiTsPc:

Os voltamogramas obtidos durante a eletrodeposição do NiTsPc, variando o número de ciclos, estão ilustrados na Figura 10.

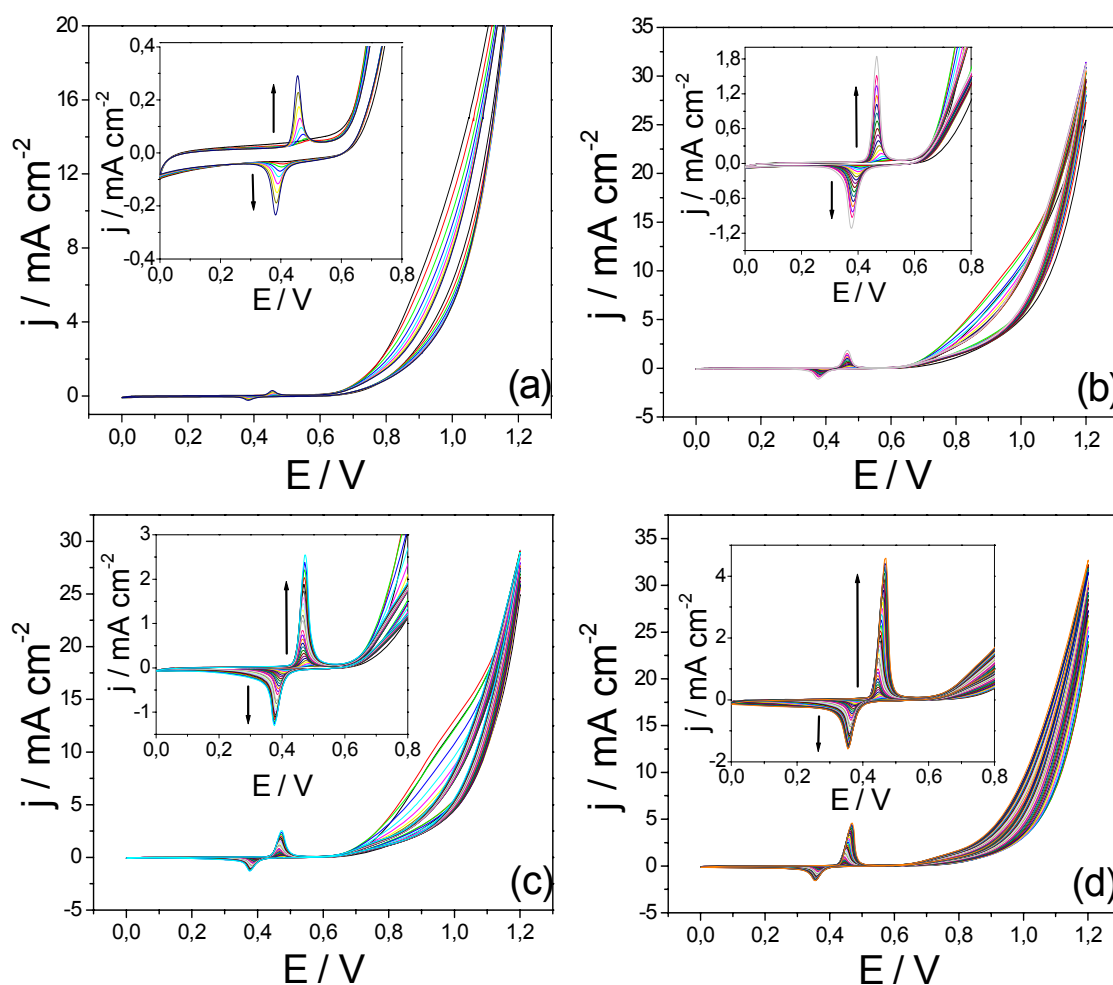


Figura 10: Eletrodeposição do NiTsPc no eletrodo de platina em diferentes ciclos de voltametria cíclica, (a) 10 ciclos, (b) 20 ciclos, (c) 30 ciclos e (d) 40 ciclos. No gráfico inserido dentro do outro, podemos observar com detalhe os picos de oxidação e redução.

Podemos observar o aparecimento de picos anódicos durante o primeiro ciclo que pode ser relacionado à oxidação do anel do NiTsPc. Picos reversíveis de oxidação e redução na região de 0,45 V e 0,38 V, respectivamente, podem ser observados como consequência dos repetidos ciclos nesta mesma janela de

potencial. Além disso, houve um aumento de amplitude dos picos com o aumento do número de ciclos, indicando que o filme formado é resultante da eletrodeposição anódica do complexo, como o observado por Pereira-Rodrigues e colaboradores (PEREIRA-RODRIGUES et al., 2002).

4.1.2 Caracterização

Eletroatividade do filme de NiTsPc:

Na Figura 11 estão apresentados os gráficos da voltametria cíclica do filme de NiTsPc em diferentes pHs.

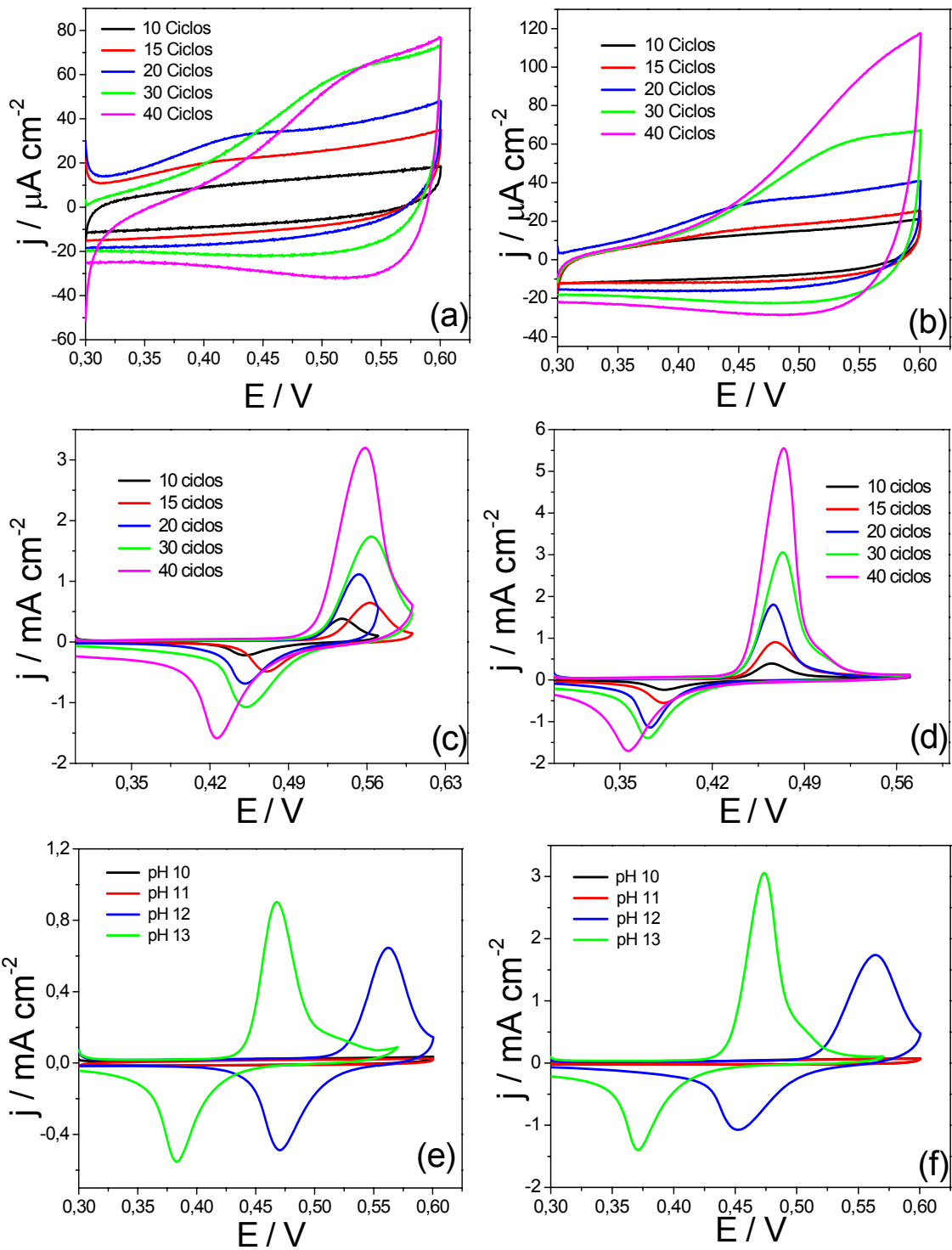


Figura 11: Voltametria cíclica dos filmes de NiTsPc em diferentes pHs, (a) pH 10, (b) pH 11, (c) pH 12, (d) pH 13 em função do número de ciclos de eletrodeposição de NiTsPc. Para efeito de comparação, voltametria cíclica dos filmes obtidos por diferentes ciclos, (e) 15 ciclos e (f) 30 ciclos em função do pH.

Podemos observar que o eletrodo de NiTsPc apresentou picos de oxidação e redução (eletroatividade) somente em pH 13 e pH 14, independentemente da forma

que o NiTsPc foi eletrodepositado (números de ciclos). A amplitude dos picos redox aumentou com a elevação do pH e do número de ciclos.

4.1.3 Detecção amperométrica do NO

Observando os dados obtidos na caracterização do eletrodo de NiTsPc, era de se esperar que o eletrólito utilizado nos experimentos de detecção estivesse em pH 13, porém, para efeito de comparação com outros eletrodos, e ainda, a aplicação em meio biológico, optou-se em realizar a detecção no pH 7,4, que é o pH do corpo humano.

Além do eletrólito, outro item importante para a detecção do NO é o potencial aplicado. O valor do potencial foi estudado por alguns pesquisadores e os valores obtidos por eles foram de 0,75 V e 0,9 V. Por este motivo, para obter o melhor resultado, as detecções foram realizadas nesses potenciais e o resultado está ilustrado na Figura 12.

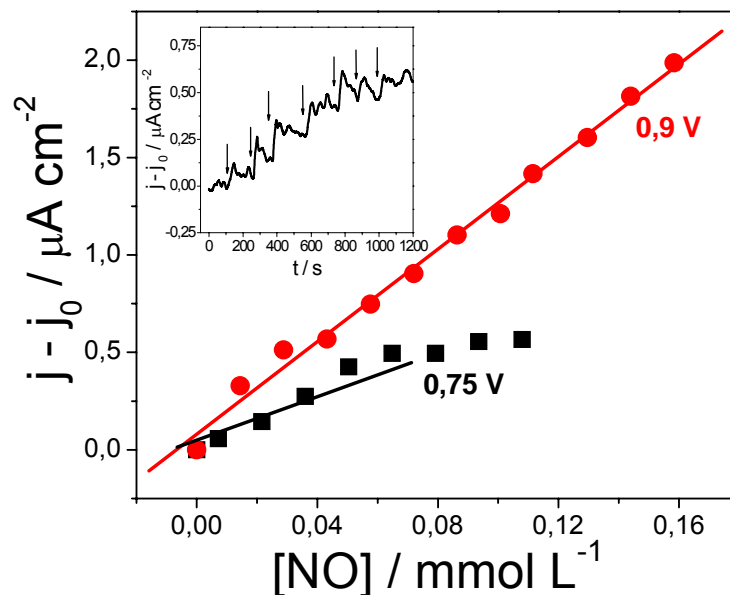


Figura 12: Curva da densidade de corrente corrigida em função da concentração de NO para 0,75 V (em preto) e 0,9 V (em vermelho). No gráfico interno: variação da corrente com a adição da alíquota de NO. Potencial aplicado de 0,75 V.

A partir da curva analítica (densidade de corrente corrigida em função da concentração da espécie de interesse), obtivemos para o potencial de 0,75 V, a sensibilidade de $7,94 \mu\text{A cm}^{-2} / \text{mmol L}^{-1}$, a faixa linear de trabalho foi de até $64,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ e o tempo de resposta de 23 s. Pode-se calcular também o limite de detecção, que neste caso foi de $21,67 \mu\text{mol L}^{-1}$. Já para o potencial de 0,9 V, a sensibilidade obtida foi de $11,88 \mu\text{Acm}^{-2} / \text{mmol L}^{-1}$, o tempo de resposta foi de 20 s e o limite de detecção foi de $7,84 \mu\text{mol L}^{-1}$. Desta forma, o melhor potencial a ser aplicado na detecção de NO é de 0,9 V, pois, neste potencial, a sensibilidade foi maior, a resposta ao analito foi mais rápida. O limite de detecção foi menor, podendo detectar concentração mais baixa de NO do que no potencial 0,75 V e, além disso, é esperado que a faixa linear de resposta seja maior do que quando o potencial mais baixo foi aplicado, pois mesmo com a concentração de $0,14 \text{ mmol L}^{-1}$ o eletrodo respondeu ao analito.

Aplicando o potencial em 0,9 V, efetuou-se as detecções de NO em função da quantidade de NiTsPc no eletrodo, e para isso, o número de ciclos da voltametria cíclica realizadas durante a eletrodeposição foram variadas. Os resultados estão ilustrados na Figura 13.

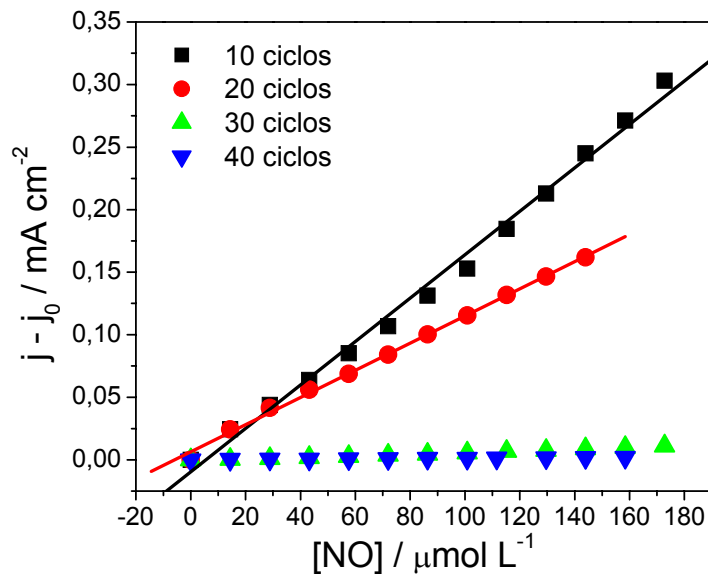


Figura 13: Curva da densidade de corrente corrigida obtida em função da concentração de NO para eletrodos preparados por 10 ciclos, 20 ciclos, 30 ciclos e 40 ciclos de voltametria cíclica na eletrodeposição do NiTsPc.

Para efeito de comparação, os dados de sensibilidade, limite de detecção e tempo de resposta para esses eletrodos estão agrupados na Tabela 2.

Tabela 2: Valores de sensibilidade, limite de detecção e tempo de resposta dos eletrodos.

Número de ciclos	Sensibilidade / $\mu\text{A cm}^{-2} / \mu\text{mol L}^{-1}$	Limite de detecção / $\mu\text{mol L}^{-1}$	Tempo de resposta / s
10	1,67 ($\pm 0,08$)	0,22 ($\pm 0,01$)	15 (± 2)
20	1,09 ($\pm 0,06$)	0,66 ($\pm 0,03$)	39 (± 2)
30	0,065 ($\pm 0,003$)	6,7 ($\pm 0,3$)	80 (± 4)
40	0,012 ($\pm 0,001$)	7,8 ($\pm 0,4$)	20 (± 1)

A partir desses dados podemos observar que o eletrodo de NiTsPc com a maior sensibilidade, menor concentração mínima de NO detectável e mais rápido na detecção, portanto, o eletrodo com melhor desempenho, foi o eletrodo obtido com 10

ciclos de eletrodeposição. O resultado esperado era que o eletrodo com maior quantidade de NiTsPc (número de ciclos mais elevado) respondesse melhor, já que teria quantidade maior de NiTsPc para a detecção, porém não foi o observado. Isto provavelmente se deve ao fato de que a partir de 10 ciclos formou-se um filme muito espesso, tornando assim a difusão do NO pela matriz do NiTsPc mais lenta.

A influência do íon nitrito e nitrato está demonstrada na Figura 14.

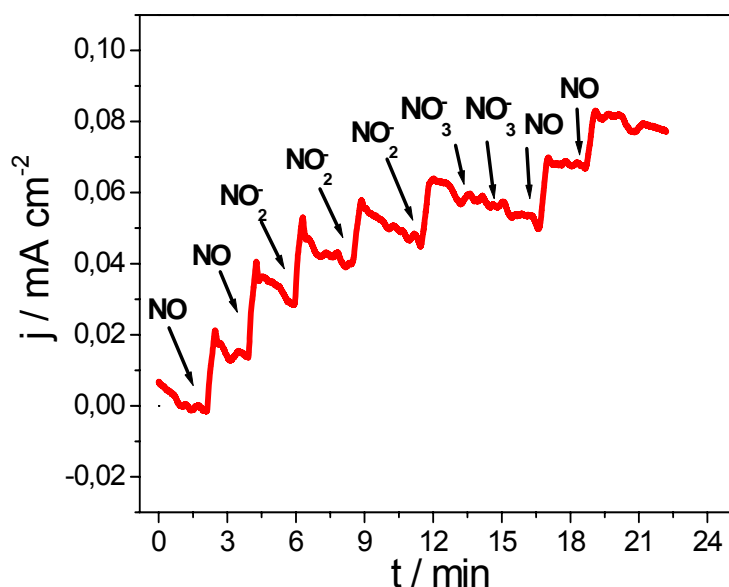


Figura 14: Influência dos íons nitritos e nitratos na detecção do NO.

Nesse potencial, o NiTsPc pode detectar além do NO os íons nitritos. Esse resultado não é muito interessante, já que o nitrito é o produto da auto-oxidação do NO em meio aquoso, podendo então detectar ao mesmo tempo as duas substâncias, mascarando o resultado. Uma alternativa que os pesquisadores usam para diminuir o efeito dos interferentes iônicos é o recobrimento do eletrodo com uma camada de náfion, porém a aplicação desse material diminui a variação da corrente como resposta à adição do analito, diminuindo assim, a sensibilidade do eletrodo, aumento do tempo de resposta ao NO. Por este motivo, a proposta inicial dessa dissertação que era de nanoestruturar o NiTsPc, foi mudada para a busca de

outros eletrodos que possam detectar o NO sem a interferência de outras substância e, para isso, tentamos imobilizar o citocromo c no eletrodo, já que é uma molécula que possui alta especificidade ao NO (aplicação de um baixo potencial na detecção do NO).

4.2 Citocromo c

4.2.1 Eletropolimerização do poli(5-amino 1-naftol):

O voltamograma gravado durante a eletropolimerização do poli(5-NH₂ 1-NAP) e o monitoramento simultâneo da variação da massa no eletrodo estão ilustrados na Figura 15.

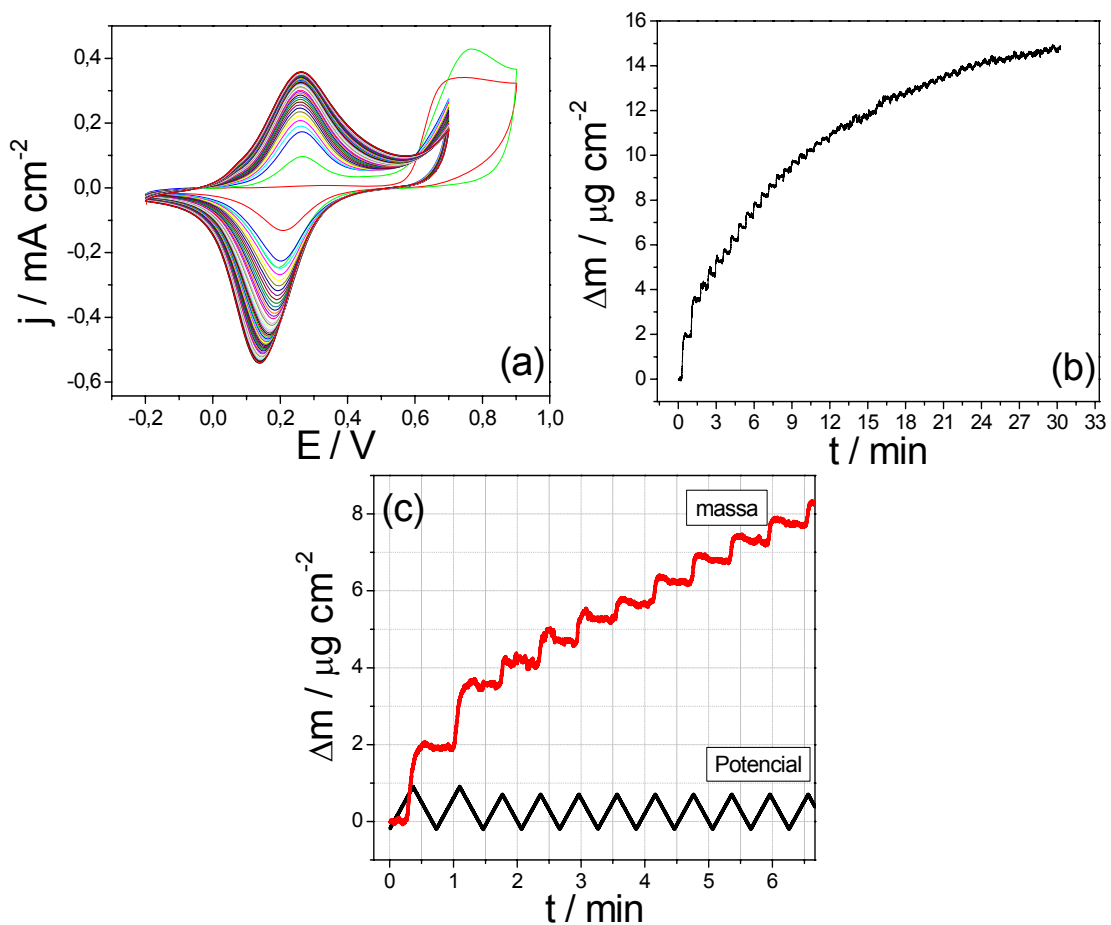


Figura 15: (a) Eletropolimerização do 5-NH₂ 1-NAP (50 ciclos) no eletrodo de carbono vítreo, (b) monitoramento da massa no eletrodo de cristal de quartzo por MECQ. (c) para melhor visualização: variação da massa no eletrodo em função do potencial.

O mecanismo de polimerização eletroquímica do 5-NH₂ 1-NAP foi explicado por Cintra e colaboradores (CINTRA et al, 2003; CINTRA et al., 2004). Nos dois primeiros ciclos, o processo redox irreversível observado em 0,7 V é atribuído à oxidação do grupamento amina, presente no monômero, formando radicais necessários para o início da polimerização. O processo redox que pode ser observado a partir do 2º ciclo, em aproximadamente 0,25 V, é atribuído à oxidação e redução do polímero. O aumento das correntes anódicas e catódicas, a cada ciclo, indicou que houve a deposição de material eletroativo na superfície do eletrodo. Fato este que também podemos comprovar pela Figura 15 (c). Como podemos observar, nos dois primeiros ciclos houve um aumento enorme da massa depositada, e após o segundo ciclo, o aumento da massa no eletrodo não foi tão grande, passando a ficar quase constante nos últimos ciclos, isto ocorreu devido ao potencial de inversão (0,9 V), pois, neste potencial, há a formação de uma quantidade maior de espécies radicalares, que são essenciais à formação e propagação da cadeia polimérica. Já nos ciclos subsequentes, o aumento de massa é provavelmente devido à compensação de carga, e como a cada ciclo mais material é depositado, mais íons são necessários para a compensação de carga.

4.2.2 Caracterização

Imobilização do citocromo c no eletrodo:

A voltametria cíclica em PBS (pH 7,4) do poli(5-NH₂ 1-NAP) e do citocromo c imobilizado, com velocidade de varredura de 20 mV s⁻¹, está ilustrada na Figura 16.

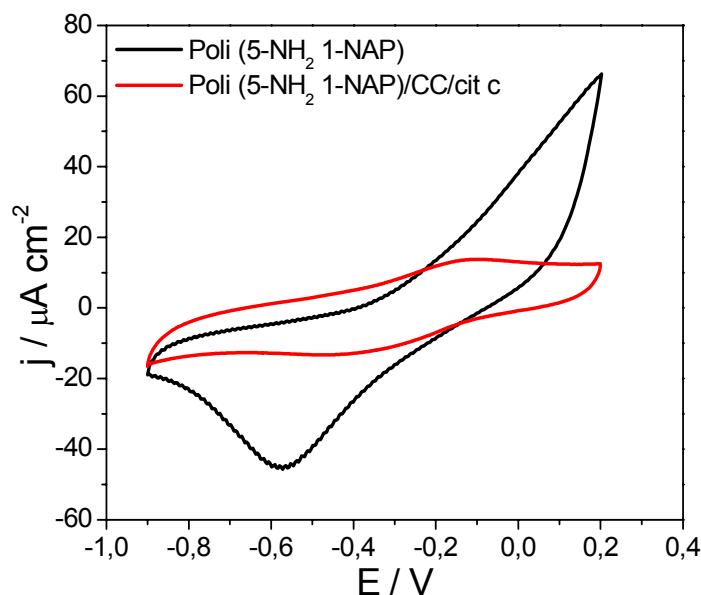


Figura 16: Voltametria cíclica do poli (5-NH₂ 1-NAP) e do poli (5-NH₂ 1-NAP)/CC/cit c em PBS pH 7,4 e com velocidade de varredura de 20 mV s⁻¹.

Podemos observar que o voltamograma do polímero em pH 7,4 apresentou comportamento diferente do voltamograma obtido durante a sua polimerização, pois a janela de potencial trabalhada foi diferente e o pH da solução eletrolítica também era diferente. Neste caso, o aparecimento de pico redox do polímero na polimerização se deve ao fato de que o polímero é muito mais eletroativo em pH ácido.

Com a imobilização do citocromo c no polímero, houve uma mudança no voltamograma do material, indicando que sítios eletroativos em pH 7,4 do citocromo c foram imobilizados no eletrodo. Para melhor visualização do comportamento eletroquímico do citocromo c, o voltamograma do poli(5-NH₂ 1-NAP)/CC/cit c no mesmo meio eletrolítico e em diferentes velocidades de varredura pode ser observado na Figura 17.

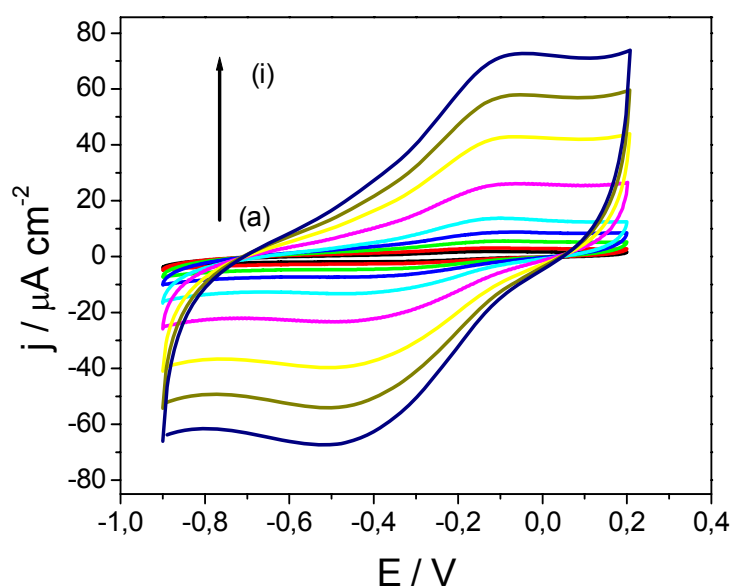


Figura 17: Voltametria cíclica do citocromo c covalentemente imobilizado no polímero, sendo o cloreto cianúrico a ponte entre eles, velocidades de varredura de (a) , (b) 2, (c) 5, (d) 10,(e) 20, (f) 50, (g) 100, (h) 150 e (i) 200 mV s^{-1} em PBS pH 7,4.

O par redox observado corresponde ao processo de oxidação e redução de sítios eletroativos do citocromo c ligado covalentemente no poli(5-NH₂ 1-NAP). O pico de oxidação e redução correspondem a -0,08 V e -0,49 V, respectivamente. O deslocamento do potencial de oxidação e de redução do cit c imobilizado em relação ao cit c nativo (de 0,07 V para -0,08 V e de 0,07 V para -0,49 V) é outro fator indicativo que o citocromo c foi imobilizado no eletrodo.

As correntes correspondentes aos picos de oxidação e redução do cit c após a imobilização variaram proporcionalmente com a velocidade de varredura, como podem ser observadas na Figura 18, indicando que o processo não é controlado por difusão, como esperado para a imobilização covalente. Já que neste caso, a espécie responsável pelos picos de oxidação e redução (ferro) está imobilizada covalentemente no eletrodo, não necessitando que o ferro chegue até a superfície do eletrodo por difusão. Se as moléculas do citocromo c estivessem na solução (difusão), as correntes correspondentes aos picos anódicos e catódicos em

diferentes velocidades de varredura seriam proporcional à raiz quadrada da velocidade de varredura.

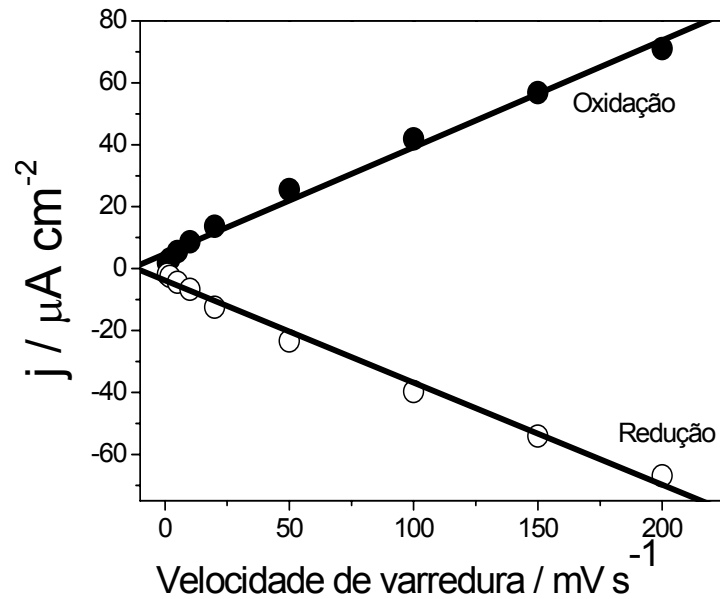


Figura 18: Densidade de corrente correspondente ao pico anódico (oxidação) e catódico (redução) em função da velocidade de varredura.

4.2.3 Detecção amperométrica do NO pelo citocromo c

O voltamograma do poli(5-NH₂ 1-NAP)/CC/cit c em PBS com a adição do NO está ilustrada na Figura 19.

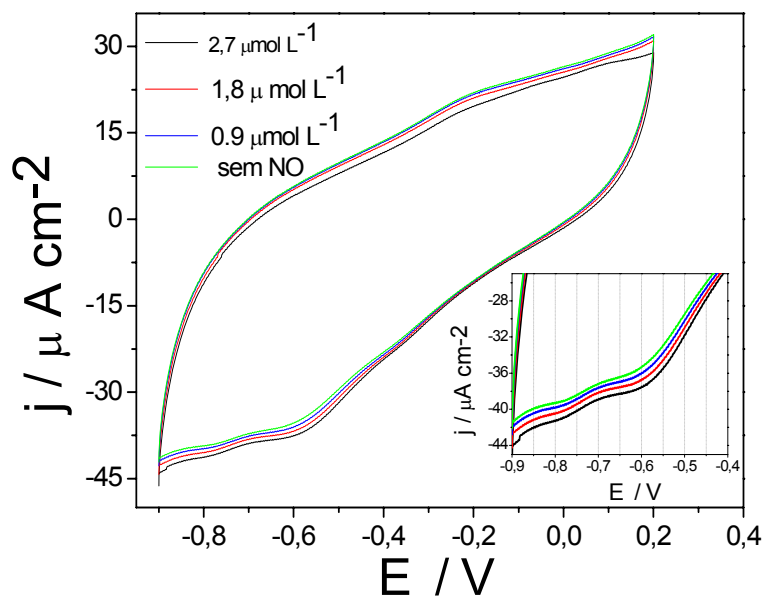


Figura 19: Voltametria cíclica a 20 mV s⁻¹ do poli(5-NH₂ 1-NAP)/CC/Cit c com a adição de NO.

Como podemos observar, com a adição de NO houve um aumento (em módulo) bem discreto da corrente de redução no potencial de -0,6 V, que corresponde então à redução do analito. Por isso, esse foi o potencial aplicado durante a detecção do NO. Nesse potencial, o NO adicionado é reduzido ao NO^{-1} e o citocromo c, que possui o ferro no estado de Fe^{+2} , já que o potencial aplicado é -0,6 V, é oxidado para Fe^{+3} (KOH et al., 2008) (processo indicado nas setas em vermelho e em azul da Figura 20). Como o potencial em -0,6 V é mantido durante todo o experimento, o Fe^{+3} é então reduzido para Fe^{+2} (como indicado pela seta em amarelo da Figura 20) e a corrente obtida decorrente desse processo (seta em verde da Figura 20) é medida durante o experimento de cronoamperometria e pode ser relacionada com a concentração de NO, já que neste caso, quanto maior é quantidade de NO adicionado, maior é o número de citocromo c que participa do processo, gerando uma quantidade maior de corrente. O perfil desse resultado pode ser observado na Figura 21.

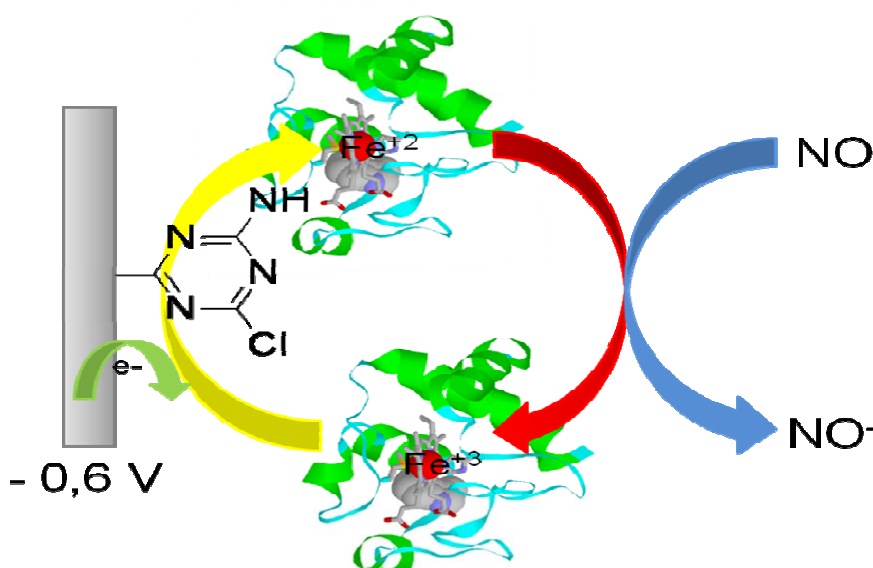


Figura 20: Esquema do processo de detecção do NO pelo citocromo c. O ferro do citocromo c que se encontra no estado +2 (pois o potencial aplicado foi de -0,6 V), em contato com o NO ele é oxidado para Fe^{+3} e o analito é reduzido para NO^{-1} (indicado pela seta em azul e em vermelho). Como o potencial é mantido nesse valor, o Fe^{+3} volta a Fe^{+2} (seta em amarelo), e a corrente envolvida nesse processo é então mensurada (em verde).

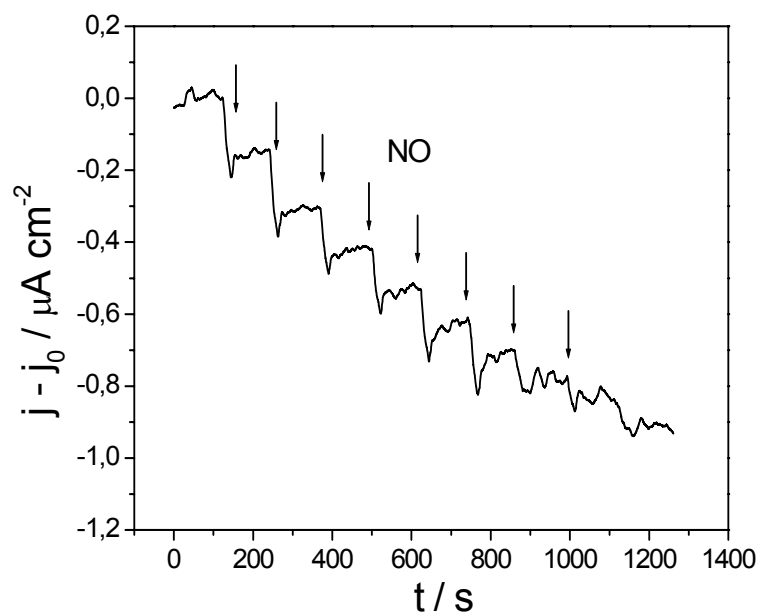


Figura 21: Perfil da cronoamperometria da detecção do NO pelo poli(5-NH₂ 1-NAP)/CC/cit c com 70 ciclos de polimerização do polímero.

As detecções, em função do tempo, do NO pelo poli(5-NH₂ 1-NAP)/CC/cit c com 50 ciclos de polimerização do 5-NH₂ 1-NAP estão ilustradas na Figura 22.

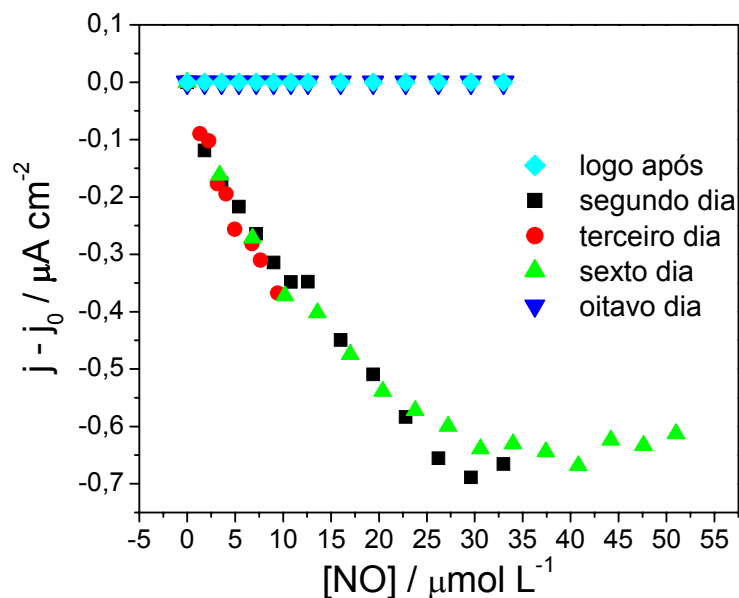


Figura 22: Resposta do eletrodo poli(5-NH₂ 1-NAP)/CC/cit c com a adição do NO. Sendo que: em azul claro temos a detecção logo após a modificação do eletrodo, em preto o 2º dia, em vermelho o 3º dia, em verde o 6º dia e em azul escuro o 8º dia após a imobilização do cit c. Eletrodo com 50 ciclos de polimerização.

Os valores de sensibilidade, limite de detecção, faixa linear de trabalho e tempo de resposta do eletrodo para cada dia de detecção estão ilustrados na Tabela 3.

Tabela 3: Valores obtidos para o eletrodo contendo citocromo c ancorado, sendo o polímero obtido com 50 ciclos

Dia após a final da reação de ancoramento	Sensibilidade / $\mu\text{A cm}^{-2}/\mu\text{mol L}^{-1}$	Limite de detecção / $\mu\text{mol L}^{-1}$	Faixa linear de trabalho / $\mu\text{mol L}^{-1}$	Tempo de resposta / s
0° (logo após)	0	0	0	0
2°	0,021 ($\pm 0,001$)	0,0041 ($\pm 0,0002$)	0,0041 - 26,2	4 ($\pm 0,2$)
3°	0,0376 ($\pm 0,002$)	0,0020 ($\pm 0,0002$)	--	2 ($\pm 0,3$)
6°	0,0361 ($\pm 0,003$)	0,0054 ($\pm 0,0003$)	0,0054 - 10,2	2 ($\pm 0,5$)
8°	0	0	0	0

O eletrodo respondeu ao analito somente no segundo dia após a imobilização do citocromo c, o seu desempenho melhorou do segundo dia para o terceiro, sofreu uma queda no sexto dia e não apresentou resposta no oitavo dia, como podemos observar nos valores de sensibilidade, limite de detecção, faixa linear de trabalho e tempo de resposta. O fato do eletrodo não responder logo após a imobilização do cit c e melhorar com o tempo deve estar relacionado ao fato de que a imobilização da proteína (que é spin baixo) leva a uma mudança na sua estrutura que inclui a coordenação do ferro (MURGIDA; HILDEBRANDT, 2004). Especificamente, o ligante

metionina 80 é removido do ferro hexacoordenado (por causa da imobilização), e o local onde estava o ligante pode se manter vago (ferro pentacoordenado, spin alto) ou é ocupado pela histidina da sua própria estrutura (hexacoordenado e de spin baixo) e é neste local vago que o NO se liga ao ferro, ocorrendo assim a detecção do NO, isto pode levar algum tempo, por isso o eletrodo responde ao NO somente no segundo dia após a imobilização. Após mais algum tempo, a estrutura do cit c sem um ligante, pode sofrer uma mudança, levando a uma melhor acomodação do citocromo c no eletrodo, o que está relacionada à melhora no desempenho do eletrodo do 2º para o 3º dia. Porém essa mudança também pode levar à desnaturação do citocromo c, assim podemos explicar o fato do eletrodo diminuir o seu desempenho, chegando a não detectar o NO.

A mesma resposta do eletrodo com 50 ciclos também foi observado com o eletrodo de 70 ciclos, como podemos observar na Figura 23 e Tabela 4 e pode ser explicado da mesma forma.

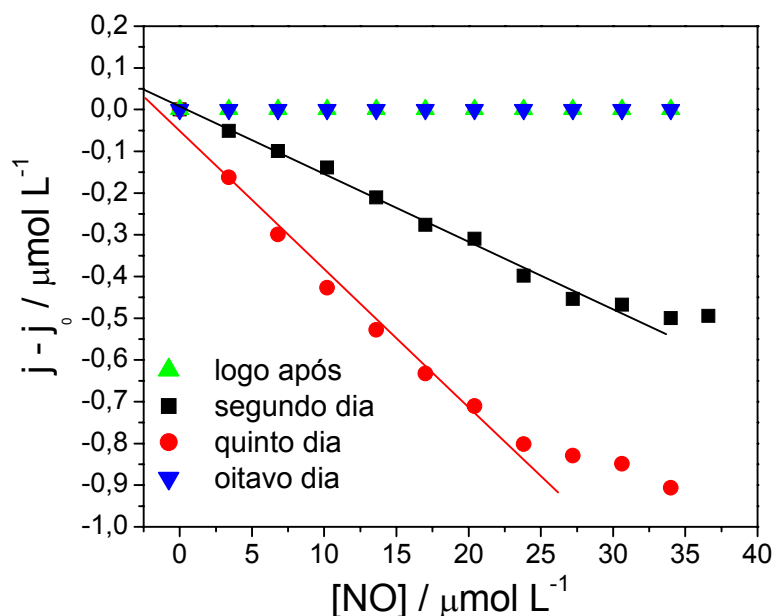


Figura 23: Resposta do eletrodo poli(5-NH₂ 1-NAP)/CC/cit c com a adição do NO. Sendo que: em verde temos a detecção logo após a modificação do eletrodo, em preto o 2º dia, em vermelho o 5º dia e em azul escuro o 8º dia após a imobilização do cit c. Eletrodo com 70 ciclos de polimerização.

Tabela 4: Valores obtidos para o eletrodo contendo citocromo c ancorado, sendo o polímero obtido com 70 ciclos

Dia após a final da reação de ancoramento	Sensibilidade / $\mu\text{A cm}^{-2}/\mu\text{mol L}^{-1}$	Limite de detecção / $\mu\text{mol L}^{-1}$	Faixa linear de trabalho / $\mu\text{mol L}^{-1}$	Tempo de resposta / s
2°	0,0156 ($\pm 0,0001$)	0,0022 ($\pm 0,0001$)	0,0022 – 34,0	4 ($\pm 0,3$)
5°	0,0331 ($\pm 0,0005$)	0,0037 ($\pm 0,0006$)	0,0037 – 23,8	11 ($\pm 0,7$)
8°	0	0	0	0

Como o tempo de reação do cloreto cianúrico (24 horas) e tempo de reação do citocromo c (24 horas) foram mantidos iguais para os eletrodos com 10, 50 e 70 ciclos, podemos então comparar os dados obtidos da curva de calibração de cada eletrodo no mesmo dia de experimento (2° dia) e eles estão reunidos na Tabela 5.

Tabela 5: Valores obtidos no 2° dia após a imobilização do cit c para os eletrodos com 10, 50 e 70 ciclos de polimerização.

Números de ciclos	Sensibilidade / $\mu\text{Acm}^{-2}/\mu\text{molL}^{-1}$	Limite de detecção / $\mu\text{mol L}^{-1}$	Faixa linear de trabalho / $\mu\text{mol L}^{-1}$	Tempo de resposta / s
10	0,0067 ($\pm 0,0003$)	0,0026 ($\pm 0,005$)	0,0026 - 7,2	11 ($\pm 0,6$)
50	0,021 ($\pm 0,001$)	0,0041 ($\pm 0,0002$)	0,0041 - 26,2	4 ($\pm 0,2$)

70	0,0156 ($\pm 0,0001$)	0,0022 ($\pm 0,0001$)	0,0022 – 34,0	4 ($\pm 0,3$)
----	----------------------------	----------------------------	---------------	-----------------

Com o aumento do número de ciclos da polimerização do monômero, quando comparado os dados de 10 e 70 ciclos, o valor da sensibilidade aumentou, o limite de detecção foi menor, a resposta do eletrodo foi mais rápida e a faixa linear de resposta foi maior. Isto se deve ao fato de que com 70 ciclos, há um aumento na quantidade de citocromo c imobilizado no eletrodo, já que neste caso, há mais ligações –OH livres no eletrodo, maior quantidade de sítios para o cloreto cianúrico se ligar ao polímero, conseqüentemente mais citocromo c foi ancorado no eletrodo. Isto pode ser comprovado pelo experimento de MECQ (Figura 24) para os eletrodos de 10, 50 e 70 ciclos, mantendo o tempo de reação do cloreto cianúrico constante.

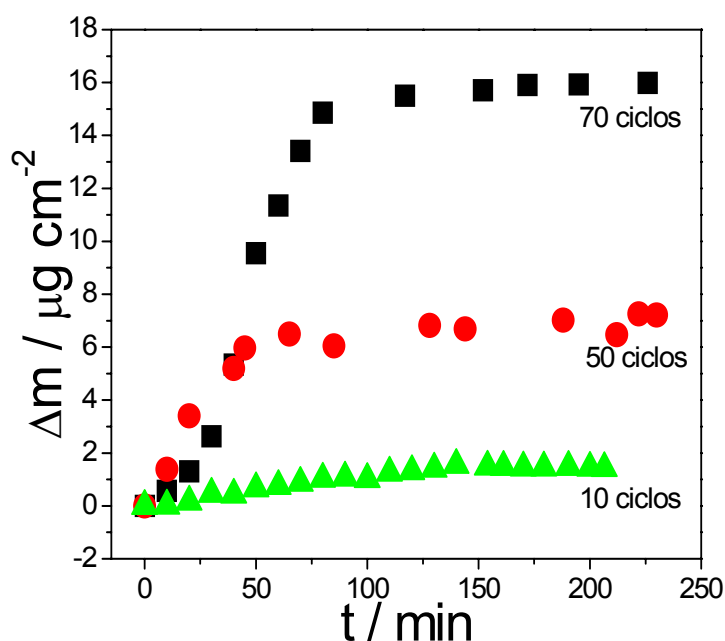


Figura 24: Variação da massa do eletrodo monitorada durante a imobilização do citocromo c no poli(5-NH₂ 1-NAP)/CC para as diferentes quantidades (voltametria cíclica) do polímero.

Era de se esperar que para 70 ciclos o valor da sensibilidade fosse maior do que o de 50 ciclos, já que há uma maior quantidade de cit c imobilizado, como podemos observar na Figura 24. Isto provavelmente é um efeito da melhor acomodação do cit c no eletrodo, pois, como para 70 ciclos há mais cit c imobilizado, o 2º dia pode não ter sido tempo suficiente para todo o cit c se acomodar. Já que se compararmos os dados para o 6º dia (Tabela 3) para o eletrodo com 50 ciclos e 5º dia (Tabela 4) para o de 70 ciclos, a resposta do eletrodo com maior quantidade de cit c foi melhor. Essa acomodação também é a responsável pela maior seletividade do eletrodo para interferentes (nitrito e nitrato), como podemos observar na Figura 25, para o eletrodo com 50 ciclos.

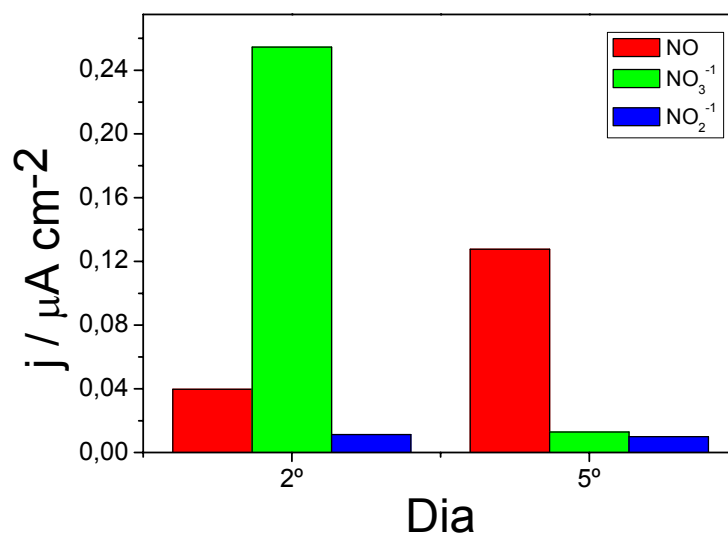


Figura 25: Variação da corrente obtida com a adição do NO, NO_3^- e NO_2^- em de dias após a imobilização do citocromo c.

4.2.4 Nanoestruturação da matriz polimérica do Poli(5-NH₂ 1-NAP)

Microscopia eletrônica de varredura dos nanotubos de carbono.

As microscopias eletrônicas de varredura dos nanotubos de carbono vítreo sobre os feltros antes e depois da polimerização foram obtidas e estão ilustradas na Figura 26.

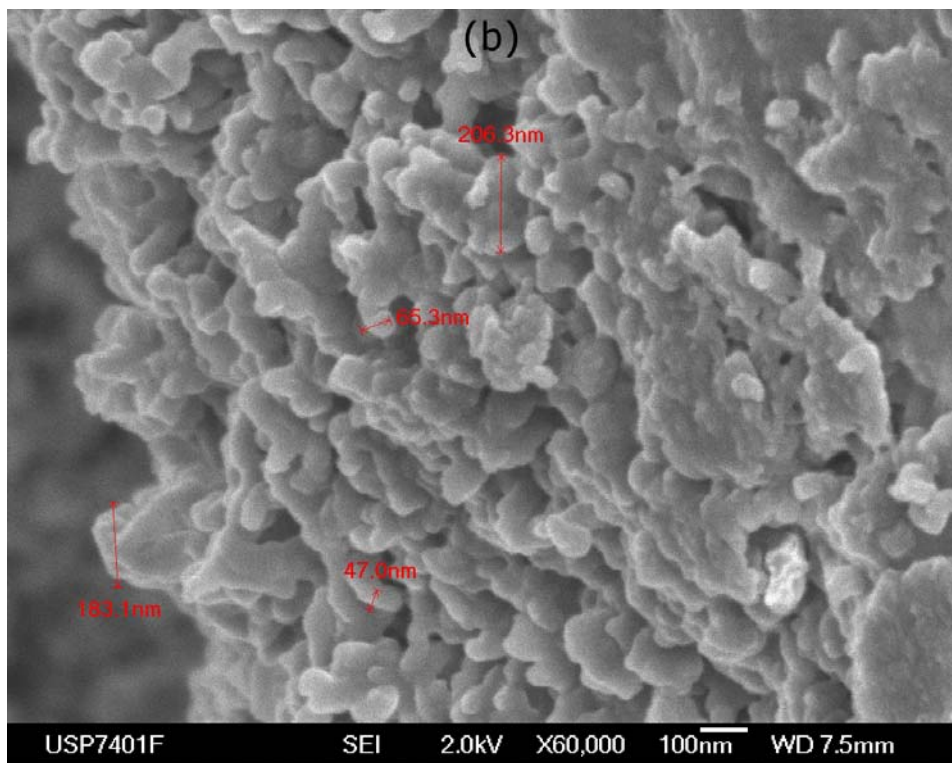
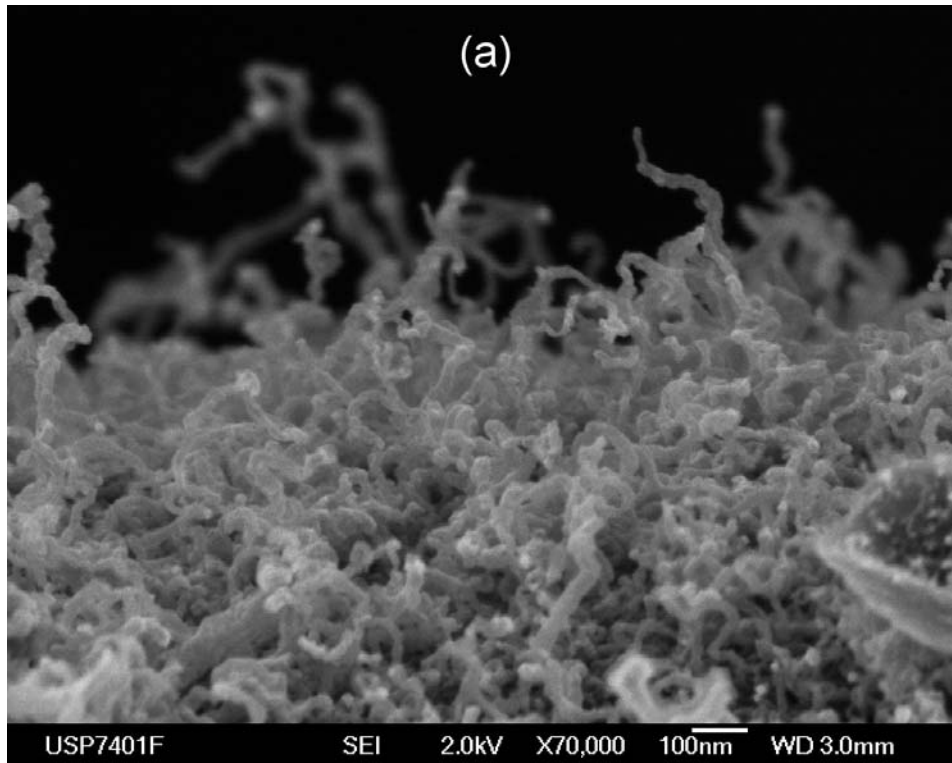


Figura 26: Microscopia eletrônica de varredura dos nanotubos de carbono sobre o feltro antes (a) e depois da polimerização (b).

Podemos observar que após a polimerização, os nanotubos de carbono foram cobertos pelo polímero e a sua estrutura foi mantida.

Detecção amperométrica do NO

Assim como no eletrodo maciço, as detecções do NO para o eletrodo nanoestruturado não apresentou variação da corrente com a adição do analito, o que deve estar relacionada ao mesmo motivo (ver seção 4.2.3).

A resposta do eletrodo com 50 ciclos de polimerização nanoestruturado (NTC) e maciço (CV), em função da adição do NO, está ilustrada na Figura 27.

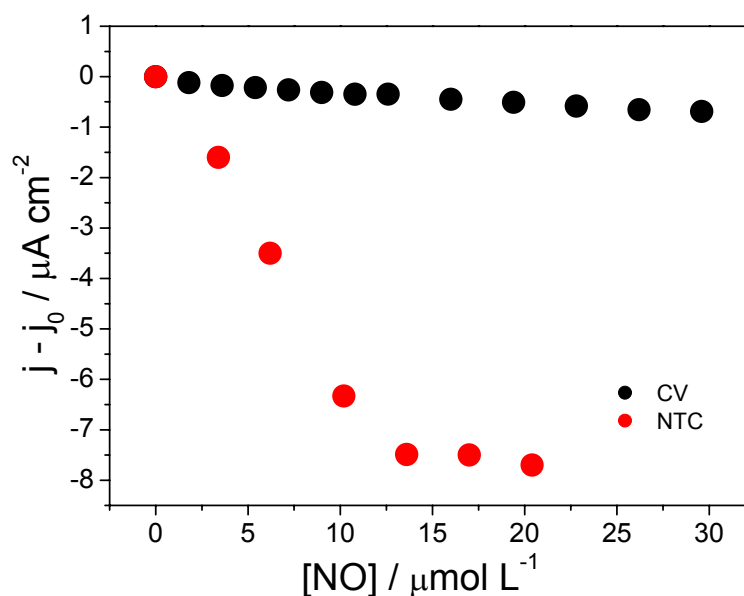


Figura 27: Resposta do eletrodo poli(5-NH₂ 1-NAP)/CC/cit c com a adição do NO. Em vermelho, poli(5-NH₂ 1-NAP) eletrodepolimerizado no nanotubos de carbono (NTC) e em preto, o polímero formado sobre o eletrodo de carbono vítreo (CV), ambos com 50 ciclos.

Os dados de sensibilidade, limite de detecção, faixa linear de trabalho e tempo de resposta estão agrupados na Tabela 6.

Tabela 6: Valores obtidos no 2º dia após a imobilização do cit c para o eletrodo contendo citocromo c ligado covalentemente no polímero

50 ciclos	Sensibilidade / $\mu\text{Acm}^{-2}/\mu\text{molL}^{-1}$	Limite de detecção / $\mu\text{mol L}^{-1}$	Faixa linear de trabalho / $\mu\text{mol L}^{-1}$	Tempo de resposta / s
CV	0,021 ($\pm 0,001$)	0,0041 ($\pm 0,0002$)	0,0041 - 26,2	4 ($\pm 0,2$)
NTC	0,58 ($\pm 0,001$)	0,0019 ($\pm 0,0004$)	0,0019 – 13,6	2($\pm 0,7$)

A partir da Tabela 6, podemos observar que para o NTC a sensibilidade foi maior, o limite de detecção foi menor, a resposta ao NO foi mais rápida do que para CV. Isto ocorreu devido ao substrato (eletrodo) nanoestruturado, que possui maior área superficial, com maior área para a polimerização, aumentando a quantidade de cit c. Porém, a faixa linear de trabalho para eletrodo nanoestruturado foi menor, o que não é tão ruim, já que para uma aplicação in vivo, a quantidade de NO não é tão grande, sendo mais importante, neste caso, os valores da sensibilidade, limite de detecção e tempo de resposta.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O NiTsPc foi eletrodepositado no eletrodo de platina, que foi comprovado pelo aparecimento do pico redox em meio básico e apresentou maior eletroatividade em pH13. As detecções amperométricas do NO foram realizadas em PBS (pH 7,4) aplicando potencial de 0,75 V e 0,9V, e o melhor resultado foi obtido para o maior potencial. As detecções também foram realizadas variando a quantidade de NiTsPc, ou seja, o número de ciclos de eletrodeposição, e o eletrodo obtido com a menor quantidade (10 ciclos) apresentou melhor desempenho que os outros eletrodos, isso provavelmente ocorreu devido ao fato de que quanto mais polímero, maior é o obstáculo para o NO se difundir pelo eletrodo. Esses eletrodos detectaram além do NO, o íon nitrito, o que não é interessante já que esse é o produto da auto-oxidação do NO e, por esse motivo, por possuir alta seletividade, o citocromo c foi imobilizado covalentemente na estrutura do poli(5-NH₂ 1-NAP) tendo como ponte entre eles, o cloreto cianúrico.

O 5-NH₂ 1-NAP foi eletropolimerizado no eletrodo de carbono vítreo, fato comprovado pelo aumento da massa no eletrodo durante a polimerização, obtido por MECQ. O citocromo c foi covalentemente imobilizado no polímero, tendo o citocromo c como uma ponte entre eles, o que foi comprovado por voltametria cíclica antes e depois da imobilização, e o deslocamento do valor do pico de oxidação e redução do cit c (em relação a sua forma nativa) indica que houve uma mudança na estrutura do cit c em função da imobilização e, para reforçar ainda este fato, a corrente de oxidação e redução da poli(5-NH₂ 1-NAP)/CC/cit c obtida por voltametria cíclica em diferentes velocidades de varredura, foi diretamente proporcional à velocidade de varredura, indicando que ocorreu a imobilização da proteína.

As detecções do NO por esse eletrodo foram realizadas em PBS (pH 7,4) e o eletrodo não apresentou variação da corrente devido à adição do NO, o que ocorreu somente no segundo dia após a imobilização. Isto deve estar relacionado ao fato de que quando o cit c foi imobilizado, umas das ligações do ferro (cit c) com um dos seus ligantes se torna fraca e se quebra, mudando o seu estado de spin alto para spin baixo, podendo assim o NO se ligar ao ferro para que, no potencial aplicado, o cit c se oxide e o NO reduzido.

Tanto para os eletrodos obtidos com 50 ciclos quanto para o de 70 ciclos, eles apresentaram uma melhora no seu desempenho com tempo, o que pode ser explicado pelo fato de que com a saída de uma ligação do ferro, pode ter ocorrido uma mudança na sua estrutura, levando a uma melhor acomodação do cit c no eletrodo. Porém, isso pode ter levado a uma desnaturação do cit c já que ele não apresenta nenhuma resposta no oitavo dia após a imobilização.

Comparando o desempenho do eletrodo com 10 ciclos e 70 ciclos de polimerização, o eletrodo com maior número de ciclos foi o melhor, o que pode ser explicado ao fato que com 70 ciclos, há uma maior quantidade de cit c imobilizado no eletrodo. Porém, quando comparamos o eletrodo de 70 ciclos com um valor intermediário ao de 10 ciclos, neste caso, o de 50 ciclos, o seu desempenho foi menor, provavelmente devido à melhor acomodação do cit c no eletrodo, pois com o tempo este quadro se reverte. O que também deve ter sido o responsável pela detecção do nitrato e NO no segundo dia e com o tempo o eletrodo detecta somente o analito de interesse.

A estrutura do polímero foi nanoestruturada, neste caso, a polimerização ocorreu sobre nanotubos de carbono, e como observado por MEV, o polímero recobriu os nanotubos e assim como para o eletrodo maciço, ele respondeu ao NO

somente no segundo dia. O seu desempenho foi melhor do que para o eletrodo maciço, devido ao aumento da sua área superficial.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMINE, A.; MOHAMMADI, H.; BOURAIS, I.; PALLESCHI, G. Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring. *Biosens. Bioelectron* 21 (2006) 1405.

Beckman, J. S.; Congert, K. A.; Direct measurement of dilute nitric oxide in solution with an ozone chemiluminescent detector. *Methods* 7 (1995) 35.

BRETT, D. S.; SNYDER, S. H. Nitric oxide mediates glutamate linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86 (1989) 9030.

BUTLER, A. R.; WILLIAMS, D. L. H. The physiological role of nitric oxide. *Chem. Soc. Rev.* 4 (1993) 233.

CHEN, X.; FERRIGNO, R.; YANG, J.; WHITESIDES, G. M. Redox properties of cytochrome c adsorbed on self-assembled monolayers: a probe for protein conformation and orientation. *Langmuir* 18 (2002) 7009.

CHEN, X.; XIE, P.; TIAN, Q.; HU, S. Amperometric nitric oxide sensor based on poly(thionine)/nafion-modified electrode and its application in monitoring nitric oxide release from rat kidney. *Anal Lett.* 39 (2006) 1321.

CINTRA, E. P.; CÓRDOBA DE TORRESI, S. I.; ERRIEN, N.; LOUARN, G.; Determination of formation of Ladder Structure in Poly(5-amino-1-naphthol) by resonant Raman and XPS characterization. *Macromolecules* 36 (2003) 2079.

CINTRA, E. P.; TORRESI, R. M.; LOUARN, G.; CÓRDOBA DE TORRESI, S. I. Electronic and ionic exchange in Poly(5-amino 1-naphthol) in acidic aqueous solution. *Electrochim. Acta* 49 (2004) 1409.

COSNIER, S. Biosensors based on electropolymerized films: new trends. *Anal. Bioanal. Chem.* 377 (2003) 507.

COTTON, F. A.; WILKINSON, G. *Advanced Inorganic Chemistry*, 5th ed.; Wiley: New York (1988) 327.

DARAIN, F.; PARK, J. S.; AKUTSU, H.; SHIM, Y. B. Superoxide radical sensing using a cytochrome c3 immobilized conducting polymer electrode. *Biosens. Bioelectron.* 23 (2007) 161.

DIAB, N.; ONI, J.; SCHULTE, A.; RADTKE, I.; BLÖCHL, A.; SCHUHMANN, W. Pyrrole functionalised metalloporphyrins as electrocatalysts for the oxidation of nitric oxide. *Talanta* 61 (2003) 43.

DICKS, J. M.; CARDOSI, M. F.; TURNER, A. P. F.; KARUBE, I. The application of ferrocene-modified n type silicon in glucose biosensors. *Electro-analysis* 5 (1993) 1.

DOYLE, M. P.; HERMAN, J. G.; DYKSTRA, R. L. Auto-catalytic oxidation of hemoglobin induced by nitrite: Activation and chemical inhibition. *J. Free. Rad. Biol. Med.* 1 (1985) 145.

EDDOWES, M. J.; HILL, H. A. O. Novel method for the investigation of the electrochemistry of metalloproteins: cytochrome c. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 21 (1977) 771.

EGGINS, B. Biosensors an a introduction. *John Wiley & Sons Ltd.* Engand. 1997.

GABRIELLI, C.; KEDDAM, M.; TORRESI, R. M. Calibration of the electrochemical quartz crystal microbalance. *J. Electrochem. Soc.* 138 (1991) 2657.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOR, J. S.; TANENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and N-15-labeled nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 126 (1982) 131.

HUGHES, M. N. Relationships between nitric oxide, nitroxyl ion, nitrosonium cation and peroxyxynitrite. *Biochim. Biophys. Acta* 1411 (1999) 263.

IGNARRO, L. J.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S.; BYRNS, R. E.; CHAUDHURI, G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84 (1987) 9265.

IGNARRO, L. J.; FUKUTO, J. M.; GRISCAVAGE, J. M.; ROGERS, N. E.; BYRNS, R. E. Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 8103.

IJJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* 354 (1991) 56.

KOH, W. C. A.; RAHMAN, M. D. A.; CHOC, E. S.; LEE, D. K.; SHIM, Y. B. A cytochrome c modified-conducting polymer microelectrode for monitoring *in vivo* changes in nitric oxide. *Biosens. Bioelectron* 23 (2008) 1374.

KOSHLAND, D. E.; The molecule of the year. *Science* 258 (1992) 1861.

KUN, M. C.; JOSHI, K. A.; CHE, W.; MYUNG, N. V.; MULCHANDANI, A. Biomolecules-carbon nanotubes doped conducting polymer nanocomposites and their sensor application. *Talanta* 74 (2007) 370.

LANCASTER Jr J., Ed. In Nitric Oxide – Principles and Action; Academic Press: New York, 1996.

LANGREHR, J. M.; HOFFMAN, R. A.; LANCASTER, J. R.; SIMMONS, R. L. Nitric oxide – a new endogenous immunomodulator. *Transplantation* 55 (1993) 1205.

LI, J.; CASSELL, A.; DELZEIT, L.; HAN, J.; MEYYAPAN, M. Novel three-dimensional electrodes: electrochemical properties of carbon nanotube ensembles. *J. Phys. Chem. B* 106 (2002) 9299.

LI, J.; WANG, Y. B.; QIU, J. D.; SUN, D. C.; XIA, X. H. Biocomposites of covalently linked glucose oxidase on carbon nanotubes for glucose biosensor. *Anal. Bioanal. Chem.* 383 (2005) 918.

LINCOLN, J.; HOYLE, C. H.; BURNSTYOCK, G. in: Nitric Oxide in Health and Disease, *Cambridge University Press*, Cambridge (1997) 83.

LIPTON, S. A.; CHOI, Y. B.; PAN, A. H.; LEI, S. Z.; CHEN, H. S. V.; SUCHER, N. J.; LOSCALZO, J.; SINGEL, D. J.; STAMLER, J. S. A. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364 (1993) 626.

LIU, Y. C.; ZHAO, J.; WU, W. L.; YANG, Z. S. Direct electrochemical behavior of cytochrome c on DNA modified glassy carbon electrode and its application to nitric oxide biosensor. *Electrochim. Acta* 52 (2007a) 4848.

LIU, Y. C.; CUI, S. Q.; ZHAO, J.; YANG, Z. S. Direct electrochemistry behavior of cytochrome c/L-cysteine modified electrode and its electrocatalytic oxidation to nitric oxide. *Bioelectrochemistry* 70 (2007b) 416-420.

MALINSKI, T.; TAHA, Z. Nitric oxide release from a single cell measured in situ by a porphyrinic-based microsensor. *Nature* 358 (1992) 676.

MASSAFERA, M. P.; CÓRDOBA DE TORRESI, S. I. Urea amperometric biosensors based on a multifunctional bipolymeric layer: comparing enzyme immobilization methods. *Sens. Actuators B: Chem.* 137 (2009) 476.

MENEGUZZI, A.; FERREIRA, C. A.; PHAM, M. C.; DELAMAR, M.; LACAZE, P. C. Electrochemical synthesis and characterization of poly(5-amino-1-naphthol) on mild steel electrode for corrosion protection. *Electrochim. Acta* 44 (1999) 2149.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGIS, E. A.; Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem. Pharmacol.* 38 (1989) 1709.

MURGIDA, D. H.; HILDEBRANDT, P. Electron-transfer process of cytochrome at interfaces. New insights by surface-enhanced resonance raman spectroscopy. *Acc. Chem. Res.* 37 (2004) 854.

MURPHY, L. J. Reduction of interference response at a hydrogen peroxide detecting electrode using electropolymerized films of a substituted naphthalenes. *Anal. Chem.* 70 (1998) 2928.

MURPHY, S.; SIMMONS, M. L.; AULLO, L.; GARCIA, A.; FEINSTEIN, D. L.; GALEA, E.; REIS, D. J.; MINC-GOLOMB, D.; SCHWARTZ, J. P. Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells. *Trends Neurosc.* 16 (1993) 323.

MUSAMEH, M.; WANG, J.; MERKOCI, A.; LIN, Y. Low-potential stable NADH detection at carbonnanotube-modified glassy carbon electrode. *Electroche. Commun.* 4(2002) 743.

NANTES, I. L.; ZUCHHI, M. R.; NASCIMENTO, O. R.; FALJONI-ALARIO. Effect of heme iron valence state on the conformation of cytochrome c and its association with membrane interfaces. *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 153-158.

NATHAN, C. F.; HIBBIS, J. B. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Opin. Immunol.* 3 (1991) 65.

OHTA, A.; TAKAGI, H.; MATSUI, T.; HAMAI, J.; IIDA, S.; ESUMI, H. Localization of nitric oxide synthase-immunoreactive neurons in the solitary nucleus and ventrolateral medulla oblongata of the rat: their relation to catecholaminergic neurons. *Neurosci. Lett.* 158 (1993) 33.

PAILLET, A.; ONI, J.; REITER, S.; ISIK, S.; ETIENNE, M.; BEDIQUI, F.; SCHUHMANN, W. In situ formation and scanning electrochemical microscopy assisted positioning of NO-sensors above human umbilical vein endothelial cells for the detection of nitric oxide release. *Electrochem. Commun.* 5 (2003) 847.

PEREIRA-RODRIGUES, N.; ALBIN, V.; KOUDELKA-HEP, M.; AUGER, V.; PAILLET, A.; BEDIQUI, F. Nickel tetrasulfonated phthalocyanine based platinum microelectrode array for nitric oxide oxidation. *Electrochem. Comm.* 4 (2002) 922.

PONTIÉ, M.; GOBIN, C.; PAUPOURÉ, T.; BEDIQUI, F.; DEVYNCK, J. Electrochemical nitric oxide microsensors: sensitivity and selectivity characterization. *Anal. Chim. Acta* 411 (2000) 157.

REES, D. D.; CELLECK, S.; PALMER, R. M. J.; MONCADA, S. Dexamethasone prevents the induction by endotoxin of a nitric oxide synthase and the associated effects on vascular tone: an insight into endotoxin shock. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197 (1990) 541.

ROBINSON, J. K.; BELLINGER, M. J.; BIRKS, J. W. Luminol/H₂O₂ chemiluminescence detector for the analysis of nitric oxide in exhaled breath. *Anal. Chem.* 71 (1999) 5131.

ROSOLEN, J. M.; MATSUBARA, E. Y.; MARCHESIN, M. S.; LALA, S. M.; MONTORO, L. A.; TRONTO, S. Carbon nanotube/felt composite electrodes without polymer binders. *J. Power Sources* 162 (2006) 620.

RUGGIERO, D. A.; MTUI, E. P.; OTAKE, K.; ANWAR, M.; Central and primary visceral afferents to nucleus tractus solitarius may generate nitric oxide as a membrane-permeant neuronal messenger. *J. Comp. Neurol.* 364 (1996) 51.

SHIBUKI, K. An electrochemical microprobe for detecting nitric oxide release in brain tissue. *Neurosci. Res.* 9 (1990) 69.

URETA-ZAÑARTU, M. S.; ALARCÓN, A.; BERRÍOS, C.; CÁRDENAS-JIRÓN, G. I.; ZAGAL, J.; GUTIÉRREZ, C. Electrodeposition and characterization of polyNiTsPc films. An EQCM study. *J. Electroanal. Chem.* 580 (2005) 94.

VALENTINI, F.; AMINE, A.; ORLANDUCCI, S.; TERRANOVA, M. L.; PALLESCHI, G. Carbon nanotube purification: preparation and characterization of carbon nanotube paste electrodes. *Anal. Chem.* 75 (2003) 5413.

VIDAL, J. C.; RUIZ, E. G.; CASTILLO, J. R. Recent advances in electro polymerized conducting polymers in amperometric biosensors. *Microchim. Acta.* 143 (2003) 93.

VIDOTTI, M.; DALLA'ANTONIA, L. H.; CINTRA, E. P.; CÓRDOBA DE TORRESI, S. I. Reduction of interference signal of ascorbate and urate in poly(pyrrole)-based ammonia sensors in aqueous solution. *Electrochim. Acta* 49 (2004) 3665.

WALLACE, G. G.; SMYTH, M.; ZHAO, H. Conducting electroactive polymer-based biosensors. *Trends Anal. Chem.* 18 (1999) 245.

WALLACE, J. L.; WOODMAN, R. C. Detection of nitric oxide by bioassay. *Methods* 7 (1995) 55.

WENNMALM, A.; LANNE, B.; PETERSSON, A. S. Detection of endothelial-derived relaxing factor in human plasma in the basal state and following and following ischemia using electron-paramagnetic resonance spectrometry. *Anal. Biochem.* 187 (1990) 359.

WU, Z.; XU, Y.; ZHANG, X.; SHEN, G.; YU, R. Microwave plasma treated carbon nanotubes and their electrochemical biosensing application. *Talanta* 72 (2007) 1336.

YEH, P.; KUWANA, T. Reversible electrode reaction of cytochrome c. *Chem. Lett.* (1977) 1145.

ZHAO, Q.; GAN, Z.; ZHUANG, Q. Electrochemical sensors based on carbon nanotubes. *Electroanalysis* 14 (2002) 1609.

7. SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Suélen Harumi Takahashi

Data de nascimento: 08 de outubro de 1982

Local: Paranavaí, Paraná - Brasil.

EDUCAÇÃO

Pós-graduação: Universidade de São Paulo – USP – Instituto de Química.

Mestrado em Química – Área: Físico-química (2007-2009).

Graduação: Universidade de Maringá – UEM – Maringá (PR).

Bacharel em Química com atribuições Tecnológicas (2000 – 2005).

Colégio Colégio Nobel Cayuá –Paranavaí, PR

Ensino médio (1997 – 1999)

OCUPAÇÃO

Bolsista de Mestrado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Vigência: março de 2007 a fevereiro de 2009.

EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

Agosto a Novembro de 2007 na Estágio no Programa de Apoio ao Ensino (PAE), disciplina QFL 2436 Físico-Química – IQ / USP.

Dezembro de 2007 USP. Monitora da 2ª Escola de Eletroquímica – IQ / USP.

Fevereiro a Junho de 2008 Monitora da disciplina QFL 2636 Eletroquímica e eletroanalítica – IQ / USP.

Dezembro de 2008 USP. Monitora da 3ª Escola de Eletroquímica –IQ / USP.

PUBLICAÇÕES

1. Guilherme M.R., Reis A.V., Takahashi S.H., Rubira A.F., Feitosa J.P.A.F., Muniz E.C. Synthesis of a novel superabsorbent hydrogel by copolymerization of acrylamide and cashew gum modified with glycidyl methacrylate. Carbohydrate Polymers 61 (2005) 464-471.

PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSO

8. Takahashi, S. H, Matsubara E. Y., Rosolen J. M., Córdoba de Torresi, S. I. Utilization of the cytochrome c linked to Polu(5-NH₂ 1-NAP) for NO detection. VII Encontro da SBPMat 2008, 2008, Guarujá, SP.

7. Takahashi, S. H, Córdoba de Torresi, S. I. Direct electrochemistry of cytochrome c by conducting polymer functionalization. The use in NO detection. 59th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, 2008, Sevilla, Espanha.

6. Takahashi, S. H., Córdoba de Torresi, S. I. Nitric Oxide sensing by cytochrome c bonded to a conducting polymer modified glassy carbon electrode. International Conference on Science and technology of Synthetic Metals – ICSM 2008, 2008, Porto de Galinhas, PE.

5. Takahashi, S. H., Córdoba de Torresi, S. I. Desenvolvimento de um biossensor para a detecção amperométrica do óxido nítrico. 31^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia , MG.

4. Takahashi, S. H., Guilherme, M. R., Rubira, A. F., Radovanovic, E., Muniz, E. C., Feitosa, J. P. A. Matriz polimérica de hidrogel superabsorvente sintetizada da goma do cajueiro e acrilamida hidrolisada. XXVI Congresso Latino Americano de Química e 27^o Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2004, Salvador.

3. Takahashi, S. H., Rubira, A. F., Muniz, E. C., Feitosa, J. P. A., Guilherme, M. R. Síntese de hidrogéis superabsorventes baseados na goma do cajueiro modificada e poli(acrilamida) hidrolisada. 7^o Congresso Brasileiro de Polímeros, 2003, Belo Horizonte - MG.

2. Takahashi, S. H., Guilherme, M. R., Rubira, A. F., Feitosa, J. P. A. Síntese e caracterização de hidrogéis superabsorventes baseados na goma do cajueiro e PAAm hidrolisada In: XI Encontro de Química da região Sul, 2003, Pelotas - RS

1. Takahashi, S. H., Rubira, A. F., Muniz, E. C., Guilherme, M. R. Síntese e intumescimento de hidrogéis superabsorventes baseados na goma do cajueiro e PAAm hidrolisada. XII Encontro Anual de Iniciação Científica - XII EAIC, 2003, Foz do Iguaçu - PR.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)