



Desenvolvimento de um sensor químico nanoestruturado fundamentado na tecnologia de nanotubos de carbono e *p*-nitroanilina ativada *in situ* para detecção de NADH

Joab Serra Rodrigues da Silva¹, João Paixão dos Santos Neto¹, Erivaldo de O. Costa², Leonardo Vieira da Silva³, Jonas dos Santos Sousa⁴, Phabyanno Rodrigues Lima⁵

¹Graduandos em Tecnologia de Alimentos – IFAL. Bolsistas de Iniciação Científica do CNPq. e-mail: joaopaixaoneto@gmail.com, joabserra2@gmail.com

²Doutorando do Curso de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia - UFAL. Bolsista de Doutorado do CNPq. e-mail: eri_olc@yahoo.com

³Mestrando do Curso de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia – UFAL. Bolsista de Mestrado do CNPq. e-mail: leovieira_iqb@hotmail.com

⁴Professor do Curso de Química e Tecnologia de Alimentos – IFAL. Doutorado em Engenharia de Processos – UFCG. e-mail: jonas@ifal.edu.br

⁵Professor do Curso de Química e Tecnologia de Alimentos – IFAL. Orientador, Doutorado em Química Analítica-UNICAMP, Credenciado no Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia – UFAL. e-mail: phaby.lima@gmail.com, phabyanno.lima@ifal.edu.br

Resumo: No presente trabalho é descrito, de forma inovadora e simples, o desenvolvimento de um sensor químico a base de nanotubos de carbono de paredes múltiplas (do inglês, MWCNT) e funcionalizados com uma nova sonda eletroquímica, a *p*-nitroanilina (*p*-NA) para detecção eletrocatalítica de β -nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH). Após o processo de imobilização (polimerização via técnica potenciodinâmica, $E_i=0,0$ e $E_\lambda=1,0$ vs. Ag/AgCl), o grupo nitro (R-NO₂) presente na *p*-NA foi ativado eletroquimicamente *in situ* a partir de varreduras sucessivas de potencial no sentido catódico entre 0,6 e -1,0V vs. Ag/AgCl. Em seguida, a sonda eletroquímica formada (R-NO/R-NHOH, $E=0,0$ V vs. Ag/AgCl) mostrou-se estável e bastante sensível para oxidação eletrocatalítica de NADH em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH =7,0 e potencial de detecção em 0,0 V vs. Ag/AgCl, tornando-se, portanto, uma excelente alternativa para determinação da coenzima.

Palavras-chave: NADH, Nanotubos de Carbono, Nitroanilina, Sensor Químico

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, vários estudos têm enfatizado a eletroquímica das coenzimas, pois estes estão relacionados ao processo de transferência de elétrons da enzima. Além disso, em muitos casos, as coenzimas fazem parte do sítio ativo da enzima, o qual é a região onde ocorre a reação redox e, em sua ausência a enzima não consegue catalisar a reação do substrato para o produto. Por essa razão, a compreensão das reações de transferência de elétrons envolvidos entre as coenzimas/enzimas e eletrodo é indispensável, uma vez que, devem ser levados em consideração o tamanho, os diferentes tipos de interações e a orientação da enzima depositada sobre a superfície do eletrodo. Dessa forma, o estudo do comportamento eletroquímico das coenzimas, sem a presença de enzima, tanto em solução como imobilizados sobre diferentes materiais eletródicos é de fundamental importância.

Neste contexto, a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) é uma coenzima bastante estudada devido à grande quantidade de enzimas desidrogenases que dependem do processo redox desta, e devido a sua importância como transportador de elétrons em células vivas. Sabe-se, por exemplo, que existem mais de 250 enzimas que dependem da NAD(H) e 150 NAD(P) (BARTLETT *et al.*, 1997, GORTON *et al.*, 2002).

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

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



envolver, preferencialmente 2 elétrons e 1 próton, possibilitando uma rápida transferência de elétrons na forma similar de hidreto numa reação homogênea com o NADH (GORTON *et al.*, 2002).

Estudos com ênfase na oxidação electrocatalítica de NADH têm sido reportados em revistas científicas especializadas e com seletiva política editorial, bem como alto fator de impacto. Estes mediadores redox incluem catecol (JAEGFEDT *et al.*, 1981), quinonas (YAMASHITA *et al.*, 2003), ferrocenos (RAMÍREZ-MOLINA *et al.*, 2003), phenilendiamina (PEREIRA *et al.*, 2003), fenoxazina (SANTOS *et al.*, 2002) e nitroderivados (Lima *et al.*, 2008). Por outro lado, alguns desses catalisadores apresentam uma série de limitações como baixa sensibilidade, reprodutibilidade ou modestas constantes de velocidade. Assim, há uma busca contínua por novos mediadores estrategicamente conectados em plataformas nanoestruturadas.

Neste sentido, no presente trabalho é descrito, pela primeira vez, a preparação e o uso de um simples e eficiente eletrodo a base de um novo mediador redox, a *p*-nitroanilina ativada *in situ* e imobilizada em nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT “*multi-walled carbon nanotubes*”), para oxidação electrocatalítica de NADH.

Uma das justificativas da escolha do uso de MWCNT como plataforma nanoestruturada diz respeito a suas propriedades ímpares, tais como o grande número de planos EDGE que, por sua vez, estão presentes em materiais grafiticos de elevada atividade electroquímica (IJIMA, 2991). Além disso, as moléculas que apresentam o grupo funcional nitro (R-NO₂) têm se destacado bastante nos últimos anos como estratégia para a formação de sondas redox que se enquadram nas características desejáveis para um mediador.

O grupo nitro, no seu estado oxidado, não tem atividade electrocatalítica para a oxidação de NADH (LIMA *et al.*, 2008). Por outro lado, quando reduzido electroquimicamente *in situ*, o grupo nitro é transformado no grupo hidroxilamina. A hidroxilamina formada pode, assim, ser oxidada para nitroso (par R-NO/R-NHOH), através de um processo redox envolvendo $2e^-/2H^+$, resultando em uma sonda redox estável e sensível para o reconhecimento de analitos em matrizes biológicas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os reagentes foram obtidos dos seus respectivos fornecedores e utilizados em todas as etapas experimentais sem nenhum tratamento prévio: β -nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma reduzida (NADH), *p*-nitroanilina (*p*-NA), nanotubos de carbono de paredes múltiplas foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), fosfato de sódio monobásico monohidratado (NaH₂PO₄·H₂O), fosfato de sódio dibásico diidratado (Na₂HPO₄·2H₂O), hidróxido de sódio (NaOH), ácido clorídrico (HCl) e N,N-dimetilformamida (DMF) foram obtidos da Vetec (Duque de Caxias, RJ, BR). As soluções foram preparadas usando água purificada em um sistema Milli-Q Millipore e os valores de pH das soluções tampão foram ajustados com um pHmetro Corning, modelo 350.

Um potenciostato modelo PGSTAT30 Eco Chemie da AUTOLAB (Utrecht, The Netherlands), interfaceado a um microcomputador (software: GPES 4.9), foi empregado para as medidas voltamétricas (potenciodinâmica). Para homogeneizar a solução do eletrólito de suporte após a adição de NADH foi utilizado um agitador magnético da marca Corning com 6 modos de velocidade.

Para o preparo das dispersões e limpeza do eletrodo de carbono vítreo (ECV) foi utilizado um banho de ultra-som da marca da marca Ultrasonic modelo 19H.

Uma balança analítica Mitter Toledo AG245, foi utilizada para pesar os reagentes.

As medidas foram realizadas usando 5,0 mL de solução tampão. A eliminação de oxigênio dissolvido foi feita pelo borbulhamento de um fluxo de nitrogênio (N₂(g)) nas soluções durante 10 minutos antes das análises.

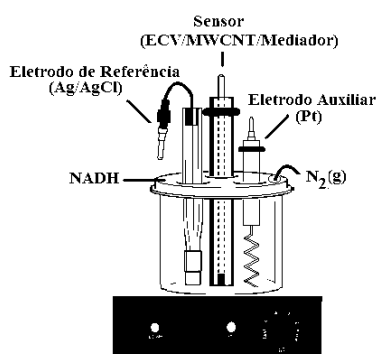


Figura 1. Modelo esquemático da célula eletroquímica e dos respectivos eletrodos utilizados em todos os experimentos.

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

O ECV foi polido com alumina ($\phi=0,3 \mu\text{m}$), lavado com água milli-Q, levado ao ultrassom por 2-3 min em etanol e lavado novamente com água destilada. A limpeza do eletrodo foi verificada utilizando uma sonda eletroquímica (ferrocianeto de potássio, $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$), com observação de um sistema reversível, em potenciais adequados. Em seguida o ECV foi lavado com água milli-Q e secado a temperatura ambiente.

O eppendorf com MWCNT e DMF ficou sob agitação no ultrassom por 2 horas para assegurar uma melhor dispersão. Uma alíquota de $5 \mu\text{L}$ da dispersão de MWCNT foi, então, depositada sobre o ECV. Essa foi secada em estufa a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 min (ECV/MWCNT).

Após o desenvolvimento da plataforma ECV/MWCNT, a mesma foi lavada com água milli-Q e colocado em tampão fosfato pH 7,0 e submetida a um processo de ativação *in situ* (ECV/MWCNT-NA) utilizando a voltametria cíclica na faixa de potencial entre 0,0 a 1,0 V vs. Ag/AgCl, $v = 0,020 \text{ V s}^{-1}$, 6 varreduras de potencial no sentido anódico. Em seguida, o eletrodo modificado foi transferido para uma nova solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH=7 e submetido a nova ativação na faixa de potencial entre 0,6 a -1,0 V vs. Ag/AgCl, $v = 0,02 \text{ V s}^{-1}$, 4 varreduras de potencial no sentido catódico, garantindo, portanto, a formação da sonda eletroquímica nitroso/hidroxilamina (R-NO/R-NHOH).

O eletrodo modificado ECV/MWCNT/nitroderivados ativado foi imerso em uma solução de tampão fosfato pH 7,0, sob atmosfera de nitrogênio. Em seguida, foram adicionadas alíquotas de NADH em diferentes concentrações e o sinal destas foi comparado com o sinal do branco. Nestes experimentos, foi selecionada uma faixa de potencial entre -0,5 a 0,6 V vs. Ag/AgCl, sentido anódico, a uma velocidade de $0,005 \text{ V s}^{-1}$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, o eletrodo de carbono vítreo foi modificado, depositando-se $5 \mu\text{L}$ de uma dispersão 2 mg mL^{-1} de nanotubos de carbono (MWCNT), em DMF. Posteriormente, a *p*-nitroanilina foi eletrodepositado *in situ* sobre ECV/MWCNT, através de sucessivas varreduras de potencial com $E_{\text{inicial}} = 0,0 \text{ V}$ e $E_{\lambda} = 1,0 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ (10 varreduras de potencial, $v = 0,02 \text{ V s}^{-1}$) (Figura 2). A partir da Figura 2, observa-se a evolução do gráfico corrente-potencial do crescimento da poli(nitroanilina), os picos redox e a diminuição do pico de oxidação do monômero. Assim, na primeira varredura de potencial observa-se somente um pico de corrente irreversível, relativo à oxidação da *p*-NA, na região de potencial de 0,7 a 1,0 V vs. Ag/AgCl. Após a primeira varredura de potencial, verifica-se a presença de novos sistemas de picos redox reversíveis em potenciais inferiores. A corrente destes picos tanto catódico quanto anódico aumenta com o número de varreduras de potencial, indicando,

portanto, a incorporação de unidades monoméricas à cadeia polimérica em crescimento, ou a formação de novas cadeias crescendo a partir da plataforma nanoestruturada (ECV/MWCNT).

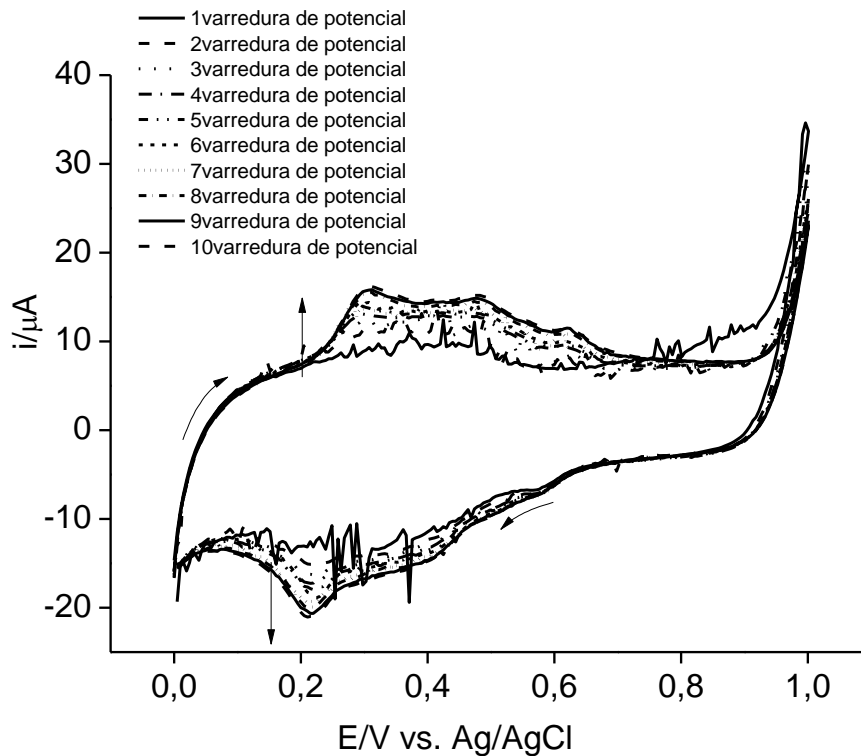


Figura 2. Voltamograma cíclico das 10 ciclagens na faixa de 0,0 a 1,0 V vs. Ag/AgCl para a polimerização do ECV/MWCNT com *p*-NA, em HCl 0,1 mol L⁻¹ e $v = 0,020 \text{ V s}^{-1}$.

Em seguida, o ECV/MWCNT-poli-NA obtido foi lavado e imerso em uma nova solução tampão. A espécie eletroativa, a hidroxilamina, foi eletrogerada *in situ* diretamente na superfície do ECV/MWCNT-poli-NA (Figura 3), a partir da redução irreversível do grupo nitro, após varredura na faixa de potencial de 0,0 V a -0,1 V vs. Ag/AgCl, em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) e velocidade de varredura de potencial (v) de $0,02 \text{ V s}^{-1}$.

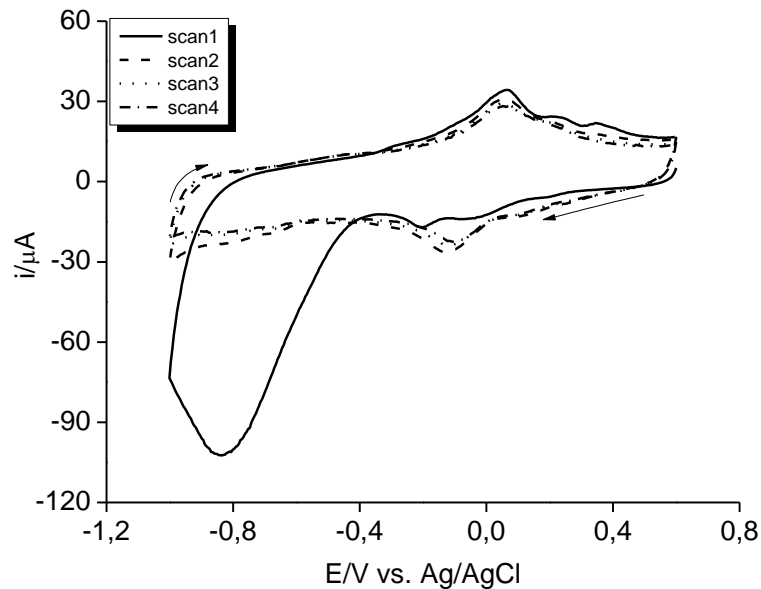


Figura 3. Voltamogramas cíclicos obtidos entre 3 e 4 varreduras de potencial para um ECVqMWCNT-poli-NA, $v = 0,02 \text{ V s}^{-1}$. $E_{\text{inicial}} = 0,5 \text{ V}$ e $E_{\lambda} = -0,5 \text{ V vs. Ag/AgCl}$, varredura no sentido catódico. Condições empregadas: solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0.

A eletrorredução irreversível do grupo nitro via quatro elétrons e quatro prótons do mediador confinado no ECV/MWCNT, em meio neutro, leva à formação da hidroxilamina (R-NHOH) ($E_p \sim -0,8 \text{ V vs. Ag/AgCl}$), que pode ser oxidada reversivelmente ao grupo nitroso (R-NO) correspondente, gerando o par redox nitroso/hidroxilamina (R-NO/R-NHOH) ($E_0 \sim 0,0 \text{ V vs. Ag/AgCl}$) (Figura 3), corroborando com vários trabalhos reportados recentemente na literatura científica (LIMA et al., 2008; SANTHIAGO et al., 2009; SANTHIAGO et al., 2010; MANO e KUHN, 2001a; MANO e KUHN, 2001b; MUNTEANU et al., 2004; LIMA et al. 2008b; RADOI e COMPAGNONE, 2009).

Alguns ensaios foram conduzidos com intuito de verificar a atividade eletrocatalítica do par redox R-NO/R-NHOH eletrogerado *in situ* a partir do nitroderivado (também conhecido do inglês como “electrochemically triggered reaction – ETR”) eletrogerado sobre ECV/MWCNT na presença de NADH (Figura 4). Assim, a Figura 4 mostra os voltamogramas cíclicos representativos para o ECV/MWCNT-poli-NA ativada através da ETR em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 7,0), usando uma varredura no sentido anódica, com $E_{\text{inicial}} = -0,5 \text{ V}$ e $E_{\lambda} = 0,6 \text{ V vs. Ag/AgCl}$, na ausência (a) e na presença (b) de NADH.

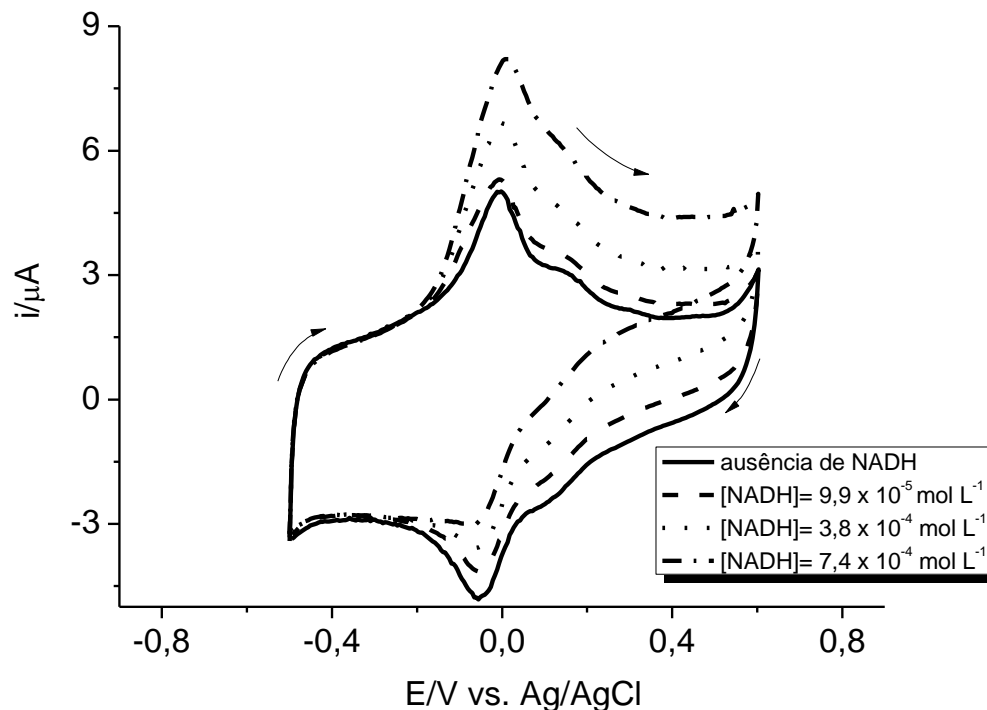


Figura 4. Voltamogramas cíclicos para um ECV/MWCNT/poli-NA ativada, $v = 0,005 \text{ V s}^{-1}$. $E_{\text{inicial}} = 0,25 \text{ V}$ e $E_{\lambda} = -0,25 \text{ V vs. Ag/AgCl}$, varredura no sentido anódico. Condições empregadas: solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho é descrito o desenvolvimento e aplicação da plataforma nanoestruturada a base de nanotubos de carbono de paredes múltiplas funcionalizados com *p*-nitroanilina ativada eletroquimicamente *in situ*. Este processo de ativação *in situ* promove a formação da sonda eletroquímica nitroso/hidroxilamina, a partir da redução irreversível do grupo nitro, responsável pelo reconhecimento da coenzima NADH.

Além disso, foi possível operar a célula eletroquímica durante a eletrooxidação do NADH, aplicando potencial de $+0,0 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ para o sensor desenvolvido, o que amplia bastante o uso destes sensores em amostras complexas, pois, neste potencial, o sensor torna-se mais seletivo e muito menos sensível a possíveis interferentes. Por essa razão, o sensor químico apresenta-se como uma alternativa para o desenvolvimento de biossensores com o emprego de enzimas NADH dependentes, uma vez que a plataforma nanoestruturada a base de nanotubos de carbono possui grupos carboxílicos disponíveis para a formação de ligações covalentes com estas enzimas.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, CAPES, IFAL-Campus Maceió, UFAL, INCT-Bio.

REFERÊNCIAS

- BARTLETT, P.N., BIRKIN, P.R., WALLACE, E.N.K., **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions**, v.93, p. 1951–1960, 1997.
 GORTON L. E DOMÍNGUEZ E., **Reviews in Molecular Biotechnology**, v.82, p. 371–392, 2002.



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

JAEGFEDT, H., TORSTENSSON, A., GORTON, L., TOHANSSON, G., **Analytical Chemistry**, v. 53, p. 1979-1982, 1981.

LIMA, P.R., SANTOS, W.J.R., OLIVEIRA, A.B., GOULART, M.O.F., KUBOTA, L.T., **Biosensor and Bioelectronics**. v. 24, p. 448, 2008.

MANO, N.; KUHN, A. **Biosensors and Bioelectronics**,v. 16, p.653-600, 2001a.

MANO, N.; KUHN, A., **JournalofElectroanalyticalChemistry**, v.498, p.58-66, 2001b.

PEREIRA, A.U., SANTOS, A.D., KUBOTA, L.T., **Electrochimica Acta**, v. 48, p. 3541-3550, 2003.

RADOI, A.; COMPAGNONE, D. **Bioelectrochemistry**, v.76, p.126–134, 2009.

RAMÍREZ-MOLINA, C., BOUJTITA, M., MURR, N. E., **Electroanalysis**, v. 15, p.1095-1100, 2003.

SANTHIAGO, M. et al. **Electrochimica Acta**, v.54, p.6609-6616, 2009.

SANTHIAGO, M. et al., **SensorsandActuators B: Chemical**, v.146, p.213-220, 2010.

SANTOS, A.D., GORTON, L., KUBOTA, L.T., **Electrochimica Acta**, v. 47, p. 3351-3360, 2002.

YAMASHITA, M., PESSOA, C.A., KUBOTA, L.T., **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 263, p. 99-105, 2003.