

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

ROBSON PINHO DA SILVA

*Aplicações Analíticas de Eletrodos Quimicamente
Modificados por Espécies de Interesse Biológico*

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Helena Pires Serrano

São Paulo

02/08/2007

ROBSON PINHO DA SILVA

Aplicações Analíticas de Eletrodos Quimicamente Modificados
por Espécies de Interesse Biológico

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do Título de
Mestre Química (Química Analítica)

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Helena Pires Serrano

São Paulo
2007

Robson Pinho da Silva

Aplicações Analíticas de Eletrodos Quimicamente Modificados por Espécies de Interesse Biológico

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

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dra. Sílvia Helena Pires Serrano

Instituição: Instituto de Química – Universidade de São Paulo

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

**Aos meus pais, Raimundo e D. Nina, que me ensinaram os primeiros passos,
à professora Sílvia Serrano, que me inseriu no caminhar científico,
aos meus irmãos que a cada queda me fizeram engolir o choro e continuar,
à minha esposa Carolina, que nos momentos mais difíceis não me deixou parar e
à minha filha Elis que me faz buscar o horizonte.**

AGRADECIMENTO(S)

À Profa. Dra. Silvia Helena Pires Serrano pela ORIENTAÇÃO e grata amizade.

Aos Prof. Dr. Antônio William Oliveira Lima pela valiosa colaboração neste trabalho.

À Carolina Tomoi pela revisão e formatação deste trabalho

Aos Profs. Drs. Mauro Bertotti, e Lúcio Angnes, pelas ótimas discussões e contribuições durante a qualificação.

Aos Profs. Drs. Paulo Teng, Nina Coichev, Graciliano de Oliveira Neto, Paulo Celso, José Riveiros do IQ-USP e Mauro Aquiles, da UNIFESP, que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização desta dissertação.

Às todos os professores da química analítica em especial aos Profs. Drs. Roberto Tokoro, Mauro Bertotti, Lúcio Angnes Jorge Masini, Claudimir Lago. Marina Franco, Pedro Vitoriano, Fabio Rocha e Renato Sanchez pelas aquisições de conhecimentos por cursos por eles ministrados.

Aos colegas de laboratório, Murilo, Ritinha, Viviane, Fávero, Carol, Glaucia e Marília pela amizade e pelas boas risadas.

À todos os colegas da Química Analítica, em especial João, Pedro, Caracol, Osmar, Renata M, Carlos, Denis, Lúcia, Tiago e Fabiana (LAIA), Luis (Lab. do Prof. Jivaldo); Laerte, Luciene, Margareth, Luciana, Gisele, Maria e Ruben (Lab. da Profa. Nina); Renata Pinho e Luciana (Lab. do Prof. Jorge Masini), pela amizade e momentos de descontração.

Agradecimentos todos os funcionários da química analítica em especial para Cristina, Lúcia, Célia, Marlene e Vinícios.

Aos colegas, professores e funcionários do Instituto de Química, pelo agradável convívio. Em especial para Cibele (pós-graduação), Chico e Jailton (fotocópias), Mirian e Maria (Copa).

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

Ao CNPq e FAPESP pelos auxílios concedidos, como a bolsa de mestrado

Loteria da Babilônia
Raul Seixas e Paulo Coelho

Vai e grita ao mundo que você está certo
Você aprendeu tudo enquanto estava mudo
Agora é necessário gritar e cantar Rock
E demonstrar o teorema da vida
E os macetes do xadrez
Você tem as respostas das perguntas
Resolveu as equações que não sabia
E já não tem mais nada o que fazer a não ser
Verdades e verdades
Mais verdades e verdades para me dizer
A declarar
Tudo o que tinha que ser chorado já foi chorado
Você já cumpriu os doze trabalhos
Reescreveu livros dos séculos passados
Assinou duplicatas, inventou baralhos
Passeou de dia e dormiu de noite
Consertou vitrolas para ouvir música
Sabe trechos da Bíblia de cor
Sabe receitas mágicas de amor
Conhece em Marte um amigo antigo lavrador
Que te ensinou a ter do bom e do melhor
Do melhor
Mas o que você não sabe por inteiro
É como ganhar dinheiro
Mas isso é fácil e você não vai parar
Você não tem perguntas pra fazer
Porque só tem verdades pra dizer
Pra declarar

RESUMO

Silva, R.P. **Aplicações Analíticas de Eletrodos Quimicamente Modificados por Espécies de Interesse Biológico**. 2007. 89p. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Química Analítica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O trabalho apresentado nesta Dissertação de Mestrado descreve o desenvolvimento e aplicação de eletrodos de pasta de carbono modificados eletroquimicamente em soluções de guanina e de eletrodos de grafite pirolítico modificados em soluções de dopamina. Estes eletrodos foram empregados na detecção e, a quantificação, por voltametria de pulso diferencial (VPD), de alguns compostos de importância biológicas tais como NADH, NADPH, 8-oxo-guanina, ácido úrico (AU), ácido ascórbico (AA), dopamina (DA) e xantina (XA). No primeiro caso, os eletrodos de pasta de carbono foram modificados em solução de guanina por aplicação de um potencial de 1,1 V (vs Ag/AgCl, KCl_{sat}) ao eletrodo de trabalho por 12 minutos sob agitação constante. Com estes eletrodos detectaram-se NADH, NADPH, 8-oxo-guanina e AU, com limites de detecção de 3,3, 3,7, 2,0 e 6,6 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ respectivamente, na faixa de concentração de 7,5 x 10⁻⁶ a 8,1 x 10⁻⁴ mol L⁻¹. No segundo caso, eletrodos de grafite pirolítico, previamente tratados em solução de NaOH, foram modificados eletroquimicamente em solução de DA por aplicação de um potencial 1,5 V (vs Ag/AgCl, KCl_{sat}) ao eletrodo de trabalho durante 2 minutos. Com estes eletrodos foi possível a determinação simultânea de AA, AU e DA. Para obtenção das curvas analíticas variou-se a concentração do analito de interesse, mantendo-se constante a concentração dos possíveis interferentes nos valores de 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ (DA), 5,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ (AU) e 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ (AA). Os limites de detecção calculados para AU, AA e DA foram respectivamente de 1,4 x 10⁻⁶ mol l⁻¹, 2,5 x 10⁻⁵ mol l⁻¹ e 1,1 x 10⁻⁷ mol l⁻¹. Ácido úrico foi determinado em amostras de urina, sangue e soro humano com 92 a 103 % de recuperação, sem a necessidade de tratamento prévio das amostras.

Palavras-chave: Guanina, Dopamina, NADH, ácido úrico, eletrodo modificado, voltametria.

ABSTRACT

Silva, R.P. **Analytical applications of chemically modified electrode of biological species interest.** 2007. 89p. Masters Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Chemically Modified Carbon Paste and Pyrolytic Graphite Electrodes were prepared via electrochemical deposition from guanine and dopamine solutions. Carbon paste electrodes were modified in guanine solutions under an applied potential of 1.1 V (vs Ag/AgCl, KCl_{sat}) during 12 minutes under constant stirring. They were used for electrochemical detection of NADH, NADPH, uric acid and 8-oxoguanine. Detection limits were 3.3, 3.7, 6.6 and 2.0 10⁻⁶ mol L⁻¹ respectively, with sensitivity of 0.13, 0.10, 0.26 and 0.40 A mol⁻¹ L cm⁻², respectively. The electrodes showed high reproducibility and absence of surface poisoning effects. Good analytical performance was attributed to the formation of superficial dimer or trimers species of guanine during the modification process. Pyrolytic graphite electrodes, previously submitted an electrochemical treatment in NaOH solution, were modified in dopamine solution (phosphate buffer, pH 10) under an applied potential of 1.5 V (vs Ag/AgCl, KCl_{sat}) during 2 minutes under constant stirring and, further used for the simultaneous determination of ascorbic acid (AA), uric acid (AU) and dopamine (DA). The analytical curves were obtained changing the concentration of the wished analyte, at constant concentration levels of the interferences: 1.0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ (DA), 5.0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ (UA) and 1.0 x 10⁻³ mol L⁻¹ (AA). Detection limits were 1.4 x 10⁻⁶ mol L⁻¹, 2.5 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ and 1.1 x 10⁻⁷ mol L⁻¹ for UA, AA and DA, respectively. Uric acid was determined in human urine, blood and serum samples without any previous treatment. Recovering percentages of 92 to 103 % were obtained.

Keywords: Guanine, Dopamine, NADH, uric acid, modified electrode, voltammetry.

LISTA DE FIGURAS

Analitos e agentes modificadores

Figura 1.1 – Estrutura química da guanina	22
Figura 1.2 – Estrutura química da 8-oxo-guanina	22
Figura 1.3 – Estrutura química do NADH	23
Figura 1.4 – Estrutura química do NADPH	23
Figura 1.5 – Estrutura química do ácido úrico (AU)	24
Figura 1.6 – Estrutura química da dopamina (DA)	25
Figura 1.7 – Estrutura química do ácido ascórbico.....	26

Modificação do eletrodo em solução de guanina

Figura 3.1 – Voltamogramas de pulso diferencial	56
Figura 3.2 – VDP registrados em solução de NADH	58
Figura 3.3 – VDP registrados com EPC	62
Figura 3.4 – VDP registrados em tampão PIPES	64
Figura 3.5 – VDP registrados em solução NADH	65
Figura 3.6 – VDP registrados com eletrodos EPC-G(NADH)	68
Figura 3.7 – VDP registrados com eletrodos EPC-G(NADPH)	68
Figura 3.8 – VDP registrados com eletrodos EPC-G(AU)	69
Figura 3.9 – VDP registrados com eletrodos EPC-G(8-oxo-guanina)	69
Figura 3.10 – VDP registrados em AA, AU, e DA com EGP-Ativado	73
Figura 3.11 – VDP registrados em AA, AU, e DA com EGP-DA	75
Esquema 3.1 – Mecanismo de oxidação da dopamina	79
Figura 3.12 – Voltamogramas cíclicos com EGP-DA	81
Figura 3.13 – VDP registrados em solução AU para curva analítica	83
Figura 3.14 – VDP registrados com EPG-DA 10 – interferência da xantina	86

LISTA DE TABELAS

Tabela I	40
Apresentação dos resultados analíticos obtidos nos trabalhos consultados na literatura com diferentes eletrodos modificados e citados no presente trabalho	
Tabela II	44
Reagentes e procedências	
Tabela III	48
Composição das soluções modificadoras dos eletrodos de pasta de carbono e sua nova denominação	
Tabela IV	50
Soluções usadas na modificação da superfície do eletrodo de grafite pirolítico	
Tabela V	67
Sensibilidade, limite de detecção e variação do potencial de pico de oxidação obtidos pela média de duas curvas analíticas consecutivas com EPC e EPC-G pH 8,0	
Tabela VI	76
Sinais de corrente e potenciais de pico de oxidação obtidos em solução contendo simultaneamente AA, DA e AU	
Tabela VII	84
Determinação de ácido úrico em amostras de urina, soro e sangue humano diluídas em tampão fosfato	
Tabela VIII	85
Teste de recuperação de ácido úrico em amostras de urina, soro e sangue humano	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido ascórbico
AU	Ácido úrico
BLM	Membrana de bicamada lipídica
DA	Dopamina
DE	Detecção eletroquímica
DNA	Ácido desoxirribunucleico
DOPAC	3,4 dihidroxifenilacético
DTDB	5,5 ditetradecil-2(2-trimetil-amônioetil)-1,3 dioxano
ECV	Eletrodo de carbono vítreo
EL	Eletrodo limpo
EPC	Eletrodo de pasta de carbono
EQM	Eletrodo quimicamente modificado
FDDB	Filme de diamante dopado com boro
FIA	Análise por injeção em fluxo
GLI	Glicose
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
LC	Cromatografia líquida
L-DOPA	L-β-3,4-dihidroxi-fenil-alanina
MEFC	Microeletrodo de fibra de carbono
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NTC	Nanotubos de carbono
PVC	Poli cloreto de vinila
QSAR	Relações quantitativas entre estrutura química e atividade biológico
TF	Tampão fosfato
VC	Voltametria cíclica
VPD	Voltametria de pulso diferencial
XA	Xantina

SUMÁRIO

1. Introdução.....	15
1.1 Analitos e agentes modificadores	
1.1.1 Guanina e 8-oxo-guanina.....	22
1.1.2 NADH e NADPH.....	23
1.1.3 Ácido úrico (AU)	24
1.1.4 Dopamina (DA)	25
1.1.5 Ácido áscobico (AA)	26
1.2 Eletrodos modificados com DNA	28
1.3 Determinação analítica de dopamina e ácidos áscorbico e úrico	30
2. Procedimento experimental.....	43
2.1 Reagentes	44
2.2 Soluções	45
2.3 Equipamentos e sistemas de eletrodos	47
2.4 Modificação dos eletrodos dse pasta de carbono	48
2.5 Detecção de NAD(P)H, ácido úrico e 8-oxo-guanina	49
2.6 Limpeza e ativação da superfície do eletrodo de grafite pirolítico	49
2.7 Modificação dos eletrodos de grafite pirolítico	50
2.8 Detecção de dopamina e ácidos ascóbico e úrico	51
2.9 Determinação de ácido úrico em, amostras de urina, sangue ou soro	53
3. Resultados e Discussão.....	54
3.1. Primeira parte: Eletrodos de pasta de carbono modificados em solução de guanina – detecção na determinação de NAD(P)H, 8-oxo-guanina e ácido úrico.....	55
3.1.1 Modificação do eletrodo em solução de guanina	55
3.1.2 Modificação do eletrodo em solução de 8-oxo-guanina	57
3.1.3 Monitoramento do recobrimento do eletrodo de pasta de carbono modificado por filmes produzidos a partir da oxidação de guanina.....	63
3.1.4 Influência do pH no processo de modificação	64
3.1.5 Determinação analítica de NADH, NADPH, 8-oxo-guanina e ácido úrico utilizando EPC e EPC-G, pH 8,0	67

3.2. Segunda parte: Eletrodos de grafite pirolítico modificados em solução de dopamina utilizados na determinação de dopamina, ácido ascórbico e ácido úrico.....	72
3.2.1 Eletrodos de grafite pirolítico modificados em solução de dopamina, ácido ascórbico e ácido úrico	72
3.2.2 Eletrodos de grafite pirolítico modificados em solução de dopamina .	74
3.2.3 Eletrodos de grafite pirolítico modificados em tampão fosfato	77
3.2.4 Formação do filme condutor	78
3.2.5 Determinação simultânea de dopamina e dos ácidos ascórbico e úrico	82
3.2.6 Determinação voltamétrica de ácido úrico em amostras de urina, sangue e soro	84
3.2.7 Estudo da interferência de xantina e glicose	85
4. Conclusões.....	87
5. Perspectivas Futuras	90
6. Referências.....	93

1. Introdução

A SELETIVIDADE EM TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS pode ser obtida através da utilização do material adequado e do controle do potencial aplicado ao eletrodo de trabalho. Diversos substratos têm sido utilizados como sensores eletroquímicos, entre eles, eletrodos de carbono, ouro e platina, os quais apresentam grande aplicação na detecção de diversos analitos. As superfícies de carbono merecem destaque, pois foram e são, ainda, empregadas por apresentarem ampla janela de potencial, inclusive na região positiva, onde a utilização do eletrodo de mercúrio é inviável^[1-3].

No entanto, a aplicação das superfícies de carbono para análise de amostras contendo moléculas biológicas é igualmente limitada, devido ao envenenamento superficial^[4,5]. Muitas vezes, como resultado de uma adsorção irreversível, a sensibilidade do método é limitada.

Modificações da superfície do carbono, através de pré-tratamentos eletroquímicos podem resolver parcialmente estes problemas ^[6-8], porém as modificações não são permanentes e, em muitos casos, apenas o tratamento eletroquímico não é suficiente, principalmente naqueles em que é necessária a quantificação de duas espécies eletroativas com potenciais de oxidação próximos ou com cinéticas de eletrodos diferentes^[5,9].

O desenvolvimento de Eletrodos Quimicamente Modificados (EQM) surgiu com o objetivo de superar esses obstáculos. Com a modificação superficial pode-se obter efeitos eletrocatalíticos, prevenção de envenenamento e pré-concentração do analito conseguindo-se, assim, maiores sensibilidade e seletividade^[3,10-13].

As modificações superficiais de eletrodos visam pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo-solução, alterando a reatividade dos sensores base^[10-14]. Para promover estas modificações podem ser utilizados metais

eletrodepositados, óxidos, espécies orgânicas adsorvidas, metaloporfirinas, enzimas, filmes poliméricos, ou macromoléculas como o ácido desoxirribonucléico (DNA), dentre uma infinidade de substâncias. Devido ao vasto número de materiais que podem ser utilizados na modificação de eletrodos, estes sensores encontram aplicação nas mais variadas áreas da ciência ^[10,11].

Inúmeras técnicas são utilizadas na modificação de eletrodos, destacando-se as técnicas eletroquímicas, pela facilidade e reprodutibilidade de preparação e recobrimento total da superfície. Além destes aspectos, outras vantagens ainda são observadas em função da modificação superficial, dentre elas: a) estabilidade química e mecânica do filme, características básicas para garantir a durabilidade do sensor e reprodutibilidade das medições; b) emprego de matrizes que permitam a imobilização de uma ou mais espécies catalíticas; c) larga faixa dinâmica de trabalho, com resposta linear como função da variação da concentração do analito; d) correntes de fundo relativamente baixas e estáveis, em ampla faixa de potencial; e) compatibilidade com meios orgânicos e aquosos; f) facilidade de preparação; g) aumento de sensibilidade (devido à melhoria na eficiência na etapa de transferência de elétrons) e seletividade de resposta no que se refere ao analito investigado; h) viabilidade de acoplamento à técnicas complementares (espectroscópicas ou de separação) e; i) uso em sistemas biológicos para medições *on-line* ^[12-15].

Os métodos eletroquímicos que empregam aos eletrodos modificados vêm sendo utilizados com diversas vantagens em comparação às técnicas colorimétricas e espectrofotométricas, na determinação de compostos eletroativos em fluidos biológicos ^[1], em muitos casos, com maior sensibilidade, seletividade, rapidez e menor custo. Isto porque a modificação do sensor deve possibilitar a eliminação dos principais

problemas comuns em muitas matrizes biológicas. Como o elevado potencial de oxidação (ou redução) do analito, a presença simultânea de outras espécies que atuam como interferentes por se oxidarem (ou se reduzirem) em potencial muito próximo do potencial aos da espécie de interesse; além do bloqueio da superfície do eletrodo causado pela adsorção dos produtos de reação formados eletroquimicamente^[10-15].

Tais resultados têm sido alcançados com o uso de filmes poliméricos, filmes condutores ou permeáveis à espécie de interesse, os quais têm sido empregados no desenvolvimento de sensores quimicamente modificados. Estes filmes têm sido usados para proteger a superfície do transdutor, efeitos de envenenamento, selecionar a espécie eletroativa que chegará à superfície do sensor, incorporar mediadores de elétrons e imobilizar biocomponentes de modo a obter biocompatibilidade^[11,16-18].

Os filmes eletropolimerizados são bastante empregados devido ao vasto número de materiais utilizados para este fim, sendo obtidos pela oxidação ou redução direta do correspondente monômero na superfície do eletrodo, deste modo filmes bastante reproduzíveis podem ser obtidos.

Dentro deste enorme campo de pesquisa, uma possibilidade bastante interessante, não só do ponto de vista da eletroanálise, como também da química farmacêutica, se abriu com o desenvolvimento dos eletrodos quimicamente modificados com DNA^[19] e biossensores de DNA^[20]. O desenvolvimento destes sensores inseriu o Químico Analítico num campo ainda pouco explorado: o estudo das possíveis interações entre fármacos e/ou seus intermediários de redução ou oxidação, com esta macromolécula^[19,21]. Estas interações ocorrem *in vivo*, porém interações estudadas *in vitro*, podem servir como uma primeira aproximação para estabelecer mecanismos de interação. Como na maioria das vezes, os principais alvos de ataque por enzimas

oxidativas no DNA são os sítios contendo as bases purínicas (Guanina e Adenina)^[22-24], pode-se com estes eletrodos avaliar a interação fármaco-base purínica, com vista ao estabelecimento de uma escala de reatividade envolvendo diversos fármacos ou poluentes.

Esta estratégia é possível porque ambas as bases acima citadas ou seus produtos de oxidação podem ser monitorados eletroquimicamente. Deste modo, o estudo de eventuais interações pode ser conduzido com as bases em solução ou alternativamente, imobilizadas na superfície de eletrodos.

A detecção e a quantificação de alguns compostos eletroquimicamente ativos, tais como dopamina, ácido úrico, ácido ascórbico, NADH, NADPH, 8-oxo-guanina e xantina, em matrizes biológicas, são importantes no diagnóstico de doenças, na monitoração da terapêutica das disfunções orgânicas causadas pelo excesso ou falta destes substratos e na elucidação de interações envolvendo estas espécies em processos fisiológicos^[2,5,10]. Eletrodos quimicamente modificados (EQM) com filmes produzidos eletroquimicamente apresentam-se como uma alternativa poderosa na detecção destes compostos ^[25,26] devido à sua versatilidade, diversidade e rapidez na alteração das propriedades das superfícies de diversos substratos usados como eletrodos.

No trabalho desenvolvido durante este Programa de Mestrado, eletrodos de pasta de carbono (**EPC**) foram modificados eletroquimicamente em soluções de guanina e utilizado para a detecção voltamétrica de espécies biológicas importantes, cujos produtos de oxidação, sabidamente, adsorvem na superfície dos eletrodos causando bloqueio de resposta. Entre elas se encontram: NA(P)DH, Ácido Úrico, Guanina e a 8-oxo-guanina (produto primário da oxidação da Guanina)^[27-32].

O filme formado não apresentou eletroatividade na região positiva de potencial, de modo que não foi possível usar, por exemplo, a voltametria cíclica para determinação do excesso superficial da camada modificadora. O recobrimento total da superfície foi monitorado de forma muito simples: em superfícies totalmente recobertas, o pico de oxidação ou adsorção registrado em tampão PIPES, a potenciais da ordem de 1,0 V não é detectado.

Atribuiu-se ao filme formado, a eliminação dos efeitos de envenenamento superficial, bem como a possibilidade de pré-concentração dos analitos. Efeitos eletrocatalíticos não foram observados, mas a boa estabilidade da camada modificadora indica que estes eletrodos podem ser utilizados como detectores eletroquímicos em sistemas cromatográficos, bem como em sistemas de análise em fluxo contínuo.

Interações entre a guanina superficialmente imobilizada no eletrodo e diferentes fármacos (e/ou seus produtos de oxidação/redução) serão conduzidas durante o Programa de Doutorado.

Desenvolveram-se ainda, ao longo do Programa de Mestrado, eletrodos de grafite pirolítico modificados eletroquimicamente em soluções de Dopamina (DA), visando à determinação simultânea de Ácido Ascórbico (AA), Dopamina (DA) e Ácido Úrico (AU). Eletrodos de grafite pirolítico foram pré-tratados eletroquimicamente em solução de NaOH e posteriormente em solução de DA, por aplicação de um potencial de 1,5V por dois minutos.

Já se encontravam descritos na literatura eletrodos modificados por filmes de melanina, obtidos por eletropolimerização em soluções de L-β-3,4-dihidroxi-fenil-alanina (L-Dopa) a 1,0 V^[33] e limites de detecção de 5 e 10 nM para DA, em presença de AA

foram obtidos usando como substratos eletrodos de carbono vítreo e fibra de carbono, respectivamente. Neste trabalho, obtiveram-se limites de detecção mais altos, porém AA, DA e AU foram determinados simultaneamente, o que não é comumente apresentados na literatura. O ácido úrico foi determinado em amostras de sangue, soro e urina humana obtendo-se resultados concordantes com a determinação espectrofotométrica^[34-36].

1.1. Analitos e agentes modificadores

1.1.1. Guanina e 8-oxo-guanina^[22,37,38]

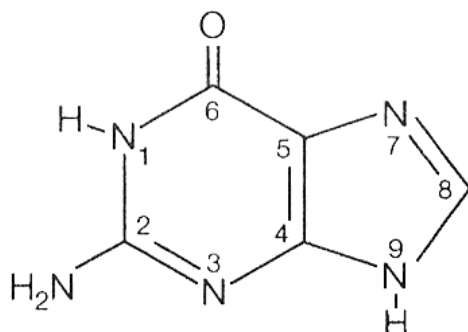


Figura 1.1 Estrutura química da guanina

A guanina (2-amino-6-oxipurina), pKa 9,6, é uma das duas principais purinas encontradas nos ácidos nucleicos, estando assim envolvida em diversos processos biológicos. As purinas são principais alvos dos danos resultantes da

oxidação do DNA, sendo a guanina a base mais facilmente oxidável.

Os estudos eletroquímicos demonstraram que a guanina é oxidada irreversivelmente na posição C8-H, por um mecanismo em duas etapas, envolvendo a perda de quatro elétrons e quatro prótons. O produto principal da oxidação desta purina é a 8-oxo-guanina,

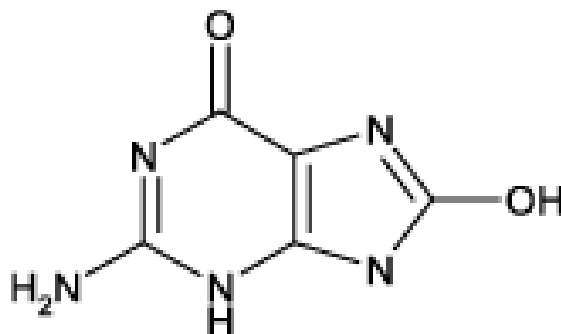


Figura 1.2 Estrutura química da 8-oxo-guanina

que também é eletroativa. Esta molécula é mutagênica e um marcador bioquímico, que pode ser utilizado na detecção de lesões oxidativa no DNA. Sendo também eletroativa, a 8-oxo-guanina que é oxidada a potenciais mais baixos que

a guanina e, justamente por isso, é utilizada como marcador bioquímico.

1.1.2. NADH e NADPH [27, 28,37]

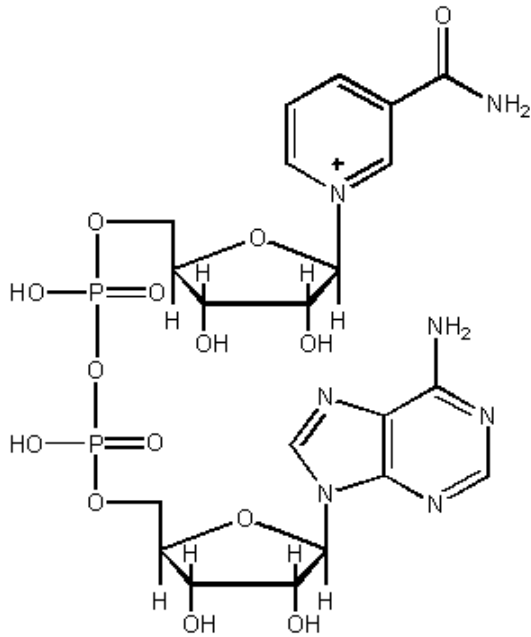


Figura 1.3 Estrutura química do NADH

erença de um único grupo fosfato no NADH e no NADPH proporciona funções bioquímicas distintas ao nível celular: por exemplo, o NADH é usado extensivamente na glicólise e no ciclo do ácido cítrico da respiração celular; já o NADPH é o doador de elétrons nas vias da pentose-fosfato e requerido para a biosíntese de ácidos nucleicos.

A determinação destes cofatores via métodos eletroquímicos vem sendo bastante

Os cofatores enzimáticos nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) e nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) são de fundamental importância para a ação catalítica de diversas enzimas oxido-redutases, desempenhando um papel chave nos processos de transferência de elétrons.

A

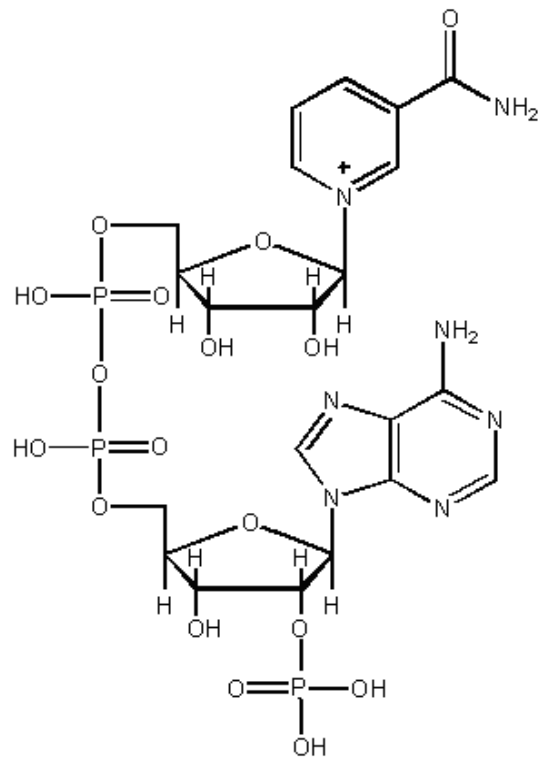


Figura 1.4 Estrutura química do NADPH

explorada, pois estes podem ser utilizados no monitoramento indireto de vários substratos ou produtos não eletroativos, podendo portanto serem utilizados na construção de biossensores, por exemplo para a determinação da atividade enzimática.

1.1.3. Ácido úrico (AU)^[23,37,39,40]

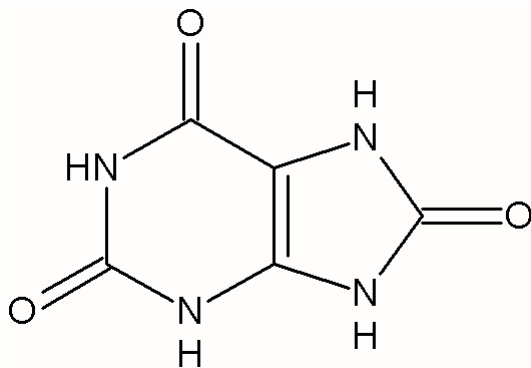


Figura 1.5 Estrutura química do ácido úrico

O ácido úrico é um ácido fraco (pKa 5,75) e a sua forma ionizada, o urato monossódico, é a forma encontrada no plasma humano, no líquido extra-celular e na sinóvia.

A sinóvia é o líquido viscoso, que preenche as cavidades articulares. O

AU e outras oxipurinas são os principais produtos finais do catabolismo de purinas (guanina e adenina) no corpo humano, sendo degradadas em hipoxantina e xantina. Esta última, por ação irreversível da *xantina oxidase*, se transforma em ácido úrico e este em urato de sódio.

A taxa dos uratos no organismo humano é de 68 mg L^{-1} , a qual se encontra no limite da solubilidade dos mesmos na temperatura normal do corpo humano. Os sais de urato de sódio são muito solúveis à temperatura de 37° C , mas se depositam com facilidade, provocando inflamações, nas articulações periféricas, joelhos, tornozelos, calcanhares e artelhos do pé, onde a temperatura do corpo é mais baixa. Quando o ácido úrico atinge taxas superiores a 80 mg L^{-1} no plasma sanguíneo ele pode,

dependendo muito das condições locais, se depositar em qualquer tecido do organismo. Quando isso ocorre, pode surgir processos inflamatórios como gota, artrite ou nefrite. A quantificação de ácido úrico no sangue e na urina é de grande valor para o diagnóstico das alterações do metabolismo do ácido úrico estando a hiperuricemia relacionada a diversas doenças como, por exemplo, a leucemia, hipertiroidismo, hipertensão e diabetes.

1.1.4. Dopamina (DA) ^[41,42]

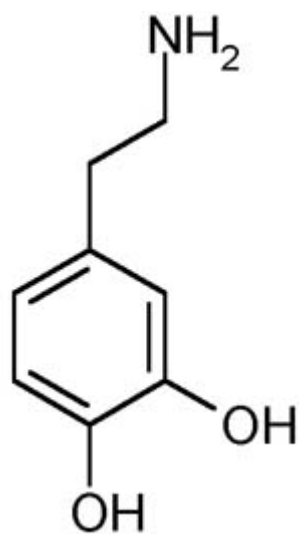


Figura 1.6 Estrutura química da dopamina

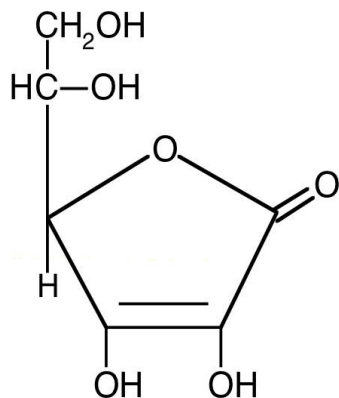
A dopamina (pks = 8,92) é um neurotransmissor importante, sintetizado por certas células nervosas, sendo responsável pela comunicação entre os neurônios. Está associada à coordenação motora, à motivação sexual e às sensações de euforia e prazer. A insônia está possivelmente associada a uma diminuição dos níveis de DA no cérebro. Na síntese

das catecolaminas, a partir da tirosina, este neurotransmissor é precursor metabólico da noradrenalina e da adrenalina, que atuam em receptores específicos, presentes no sistema nervoso central, nos vasos mesentéricos, renais e nas coronárias. A DA está também diretamente relacionada a doenças neuro-degenerativas, como o mal de Parkinson (escassez de DA na via dopaminérgica nigro-estriatal) e a esquizofrenia

(excesso de DA na via dopaminérgica mesolímbica e escassez na via mesocortical). É utilizada farmacologicamente no tratamento de diversos tipos de choque e da hipotensão grave após infarto agudo do miocárdio por atuar como dilatador dos vasos sanguíneos renais, causando um aumento no fluxo de sanguíneo.

1.1.5. Ácido Ascórbico (AA) [30,42-44]

O Ácido ascórbico, vitamina C, (pK_{a1} 4,20 e pK_{a2} 11,34) é uma cetolactona de seis carbonos, estruturalmente relacionada à glicose e outras hexoses. Sofre oxidação



reversível no organismo para ácido desidroascórbico. Este último possui a atividade integral do Ácido Ascórbico. Já na oxidação eletroquímica, o ácido sofre oxidação pela transferência de dois elétrons em duas etapas, perdendo um elétron em cada uma delas. O processo envolve a participação de um ânion radical do ácido

desidroascórbico, que sofre reação de hidratação para formar um produto eletroinativo.

O AA atua como co-fator em diversas reações de hidroxilação e amidação através da transferência de elétrons para enzimas que fornecem equivalentes redutores em muitas reações biológicas. Outra função importante do ácido ascórbico está relacionada à síntese de colágenos, proteoglicanos e outros constituintes orgânicos da matriz intercelular em diversos tecidos, como os dos dentes, ossos e endotélio capilar. As

concentrações elevadas de AA no sistema nervoso provavelmente se explicam pela necessidade de ascorbato para a síntese de neurohormônios e de noradrenalina. A vitamina C participa no metabolismo do triptofano e dos neurotransmissores, serotonina e dopamina.

1.2. Eletrodos modificados com DNA

O ácido desoxirribunucleico (DNA) vem sendo empregado como agente modificador para o desenvolvimento de eletrodos quimicamente modificados e biosensores, ou seja, os ácidos nucleicos são utilizados como o elemento biológico que pode fornecer informações a respeito da interação fármaco–DNA^[45-49], ou ainda, ser usado como modificador para construção de sensores com fins analíticos, qualitativos ou quantitativos^[21,50-52]. Os biosensores de DNA possuem enorme aplicação em diagnósticos clínicos, na detecção de agentes poluentes^[20], na monitoração dos processos de hibridização, etc. ^[53-57]

A oxidação eletroquímica de ácidos nucleicos está intimamente associada à oxidação dos resíduos das bases purínicas, guanina e adenina, sendo tais bases responsáveis pela atividade eletroquímica do DNA na região positiva de potencial^[55]. O comportamento eletroquímico do DNA e adsorção em diversos tipos de eletrodos vem sendo estudado há anos ^[58-64]. Alguns trabalhos mostram que os pontos passíveis de redução são adenina e citosina ^[61,62], com a estrutura do DNA desempenhando papel fundamental na facilidade ou não do processo.

A utilização de biosensores de DNA ou eletrodos modificados com DNA é de grande importância na determinação analítica de agentes quimioterápicos, como os efetuados com complexos de platina, agentes antimicrobianos como nitroimidazóis — que também têm o DNA como alvo para ação biológica *in vivo* ^[19,49,50,55]—, na detecção de lesões oxidativas no DNA causado por agentes carcinogênicos e mutagênicos^[45,46],

bem como na interação de outros fármacos ^[47-50] que têm, *in vivo*, a molécula de DNA como alvo de sua ação farmacológica.

A determinação analítica e mecanismo de interação de nitroimidazóis com DNA foram estudados por nosso grupo ^[21,49,55]. E apesar de seu excelente desempenho o biossensor é bastante frágil para ser utilizado, por exemplo, em sistemas analíticos automatizados. Além disso, o mecanismo de resposta destes eletrodos ainda é motivo de especulação. Existem indícios de que a superfície modificada é resultado da formação de DNA em estado triplex durante o processo de condicionamento ^[21,53]. No entanto, a participação das bases oxidadas do DNA no processo de condução superficial não foi totalmente descartada ^[53].

Assim a modificação de eletrodos com as bases do DNA, pode ser uma ferramenta promissora no desenvolvimento de sensores que podem ser usados não só do ponto de vista analítico, como também em estudos da interação de fármacos com as bases do DNA, contribuindo assim para estudos de QSAR (Relações quantitativas entre estrutura química e atividade biológica) de novos fármacos, que tenha o DNA como molécula alvo.

1.3. Determinação analítica de dopamina e ácidos úrico e ascórbico

O maior problema para determinação eletroquímica de DA e/ou AU é a coexistência, em amostras biológicas, de AA em concentrações relativamente elevadas no plasma ^[65] (6,0 – 15,0 mg L⁻¹) e urina humana ^[66] (10,0 – 60,0 mg/24h), espécies estas, que apresentam potenciais de oxidação muito próximos ^[67,68] dificultando a detecção seletiva e simultânea destes analitos.

Diversos métodos eletroquímicos têm sido desenvolvidos para a determinação de AA, DA e AU em fluidos biológicos, buscando maior sensibilidade, seletividade, rapidez, diminuição de custos (quando comparado às técnicas colorimétricas e espectrofotométricas)^[11,69,70] e miniaturização do sistema, visando a realização de medidas *in vivo*^[71-73]. Devido à importância e dificuldade na determinação simultânea destes compostos o número de trabalhos publicados nos últimos anos enfocando o problema cresceu. Assim, Eletrodos quimicamente modificados (EQM) e/ou Eletrodos limpos (EL), tem sido utilizados para detecção eletroquímica destes compostos empregando técnicas de separação como: Cromatografia líquida de alta pressão (HPLC)^[74], Cromatografia líquida (LC)^[75] e Microdiálise^[76], para além de técnicas envolvendo algum tipo de automação, como a Análise por injeção em fluxo (FIA)^[77].

Voltamogramas de pulso diferencial (VPD) registrados com eletrodos descartáveis de carbono, do tipo *screen-printed* (impresso) no intervalo de 20 °C ≤ t ≤ 50 °C, mostraram que o pico de oxidação da DA varia bruscamente para valores menos positivos com o aumento de temperatura, enquanto o potencial de pico do ácido úrico permanece inalterado^[78]. O pico do ácido ascórbico desapareceu com o aumento de

temperatura. Estes resultados foram interpretados com o auxílio de medidas de impedância, as quais mostraram que a resistência à transferência de carga nos potenciais de pico da dopamina e do ácido úrico diminui pelo menos duas vezes quando se passa de 20 para 50°C. O ácido ascórbico na temperatura mais alta é degradado, transformando-se numa espécie inativa. Segundo os autores, o aumento da temperatura também impediu a adsorção dos produtos de oxidação na superfície do eletrodo, evitando assim o envenenamento superficial.

Um conjunto de microeletrodos de ouro modificados pela eletrodeposição de metais nobres como paládio e platina acoplados a um sistema FIA foram explorados e utilizados para determinação amperométrica simultânea de AA e AU^[79] e de AA, DA, epinefrina e dipirona^[80]. Em ambos trabalhos não foram observados efeitos de envenenamento e, após a deposição do metal, houve aumento da área superficial dos microeletrodos justificando o aumento dos limites de detecção dos analitos obtido pelos autores. Angnes *et al*^[79] quantificaram ainda o teor de AA e AU em amostras de urina utilizando amperometria diferencial, para tanto, foram realizadas medidas em solução de padrão contendo uma alíquota de amostra, medidas em amostras puras e amostras tratadas enzimaticamente com uricase e peroxidase para AU, e com ascorbato oxidase para AA. Para determinação dos analitos foi realizado o método de adição de padrão com subtração dos valores de correntes obtidos com a amostra tratada enzimaticamente.

Saldanha *et al*^[80] realizaram a determinação simultânea dos analitos usando o método de calibração multivariada, com aquisição de dados efetuados por um multipotenciostato, evitando assim de separação dos analitos. A análise dos resultados foi

efetuada usando um grupo com a mistura de 16 padrões selecionados por um modelo fatorial de dois níveis.

A dopamina e/ou a serotonina foram igualmente determinadas, usando Microeletrodos de fibra carbono (MEFC) ^[81-84] e Voltametria de onda quadrada ^[81] ou Voltametria cíclica ^[82,83] de alta velocidade de varredura. Nos dois primeiros trabalhos citados^[81,82], os autores exploraram a afinidade que superfícies de carbono ativadas apresentam por espécies catiônicas, que em altas velocidades de varredura adsorvem fracamente à superfície do eletrodo. Nesta condição o sensor respondeu seletivamente a DA e a serotonina por estarem na sua forma catiônica em detrimento da resposta de interferentes aniônicos como AU e AA.

Nowall e Kuhr^[83] obtiveram uma superfície modificada com os produtos de oxidação do NADH que foi utilizada para determinação eletrocatalítica de **NADH, AU, AA, DA e DOPAC**. Os autores observaram que microeletrodos de fibra de carbono recobertos com os produtos de oxidação de NADH reagiram com o ácido ascórbico a 38^oC para originar uma superfície que apresentou baixo valor de sobrepotencial para oxidação de diversas espécies biológicas. Microeletrodos de Pt quimicamente modificados foram também empregados para determinação simultânea de ácido úrico e ácido ascórbico ^[84]. Para tanto, microdiscos de Platina foram atacados com água régia para a formação superficial de microcavidades, as quais foram preenchidas com negro de carbono. Como este material corresponde a partículas de carbono quase gráficas, esféricas e com dimensões coloidais, a área superficial ativa do eletrodo aumentou significativamente.

As propriedades extremamente interessantes dos eletrodos de filme de diamante dopado com boro (FDDB), como a ampla janela de potencial nas regiões positivas e

negativas, as baixas correntes capacitivas e a ausência de efeitos de adsorção foram exploradas para a construção e aplicação de um microeletrodo ^[85]. Ele foi utilizado como detector eletroquímico para a determinação amperométrica, após separação por Eletroforese Capilar, de DA, epinefrina, noraepinefrina, entre outras catecolaminas.

As diferenças de reversibilidade entre os processos de oxidação de DA e AA foram exploradas para determinação seletiva de DA na presença de AA^[86]. Para tanto, os autores construíram um dispositivo na forma de uma microcavidade constituída por um “sanduíche” de silicone que alternou camadas condutivas (ouro com camada adesiva de cromo) e isolantes (poli imida). O dispositivo funcionou como uma célula eletroquímica para volumes da ordem de 1nL e permitiu a incorporação de três eletrodos de ouro em um pequeno espaço tridimensional: um disco foi alocado no fundo da cavidade, atuando como eletrodo gerador do produto de oxidação dos analitos; outro, na lateral da cavidade, na forma de eletrodo de banda, que atuou como eletrodo coletor; e, por fim, um na borda da cavidade, atuando como pseudo contra-eletrodo. A dopamina, cujo processo de oxidação é quase reversível foi oxidada no eletrodo gerador, enquanto o produto foi reduzido no eletrodo coletor. O AA foi concomitantemente oxidado com a DA, porém como seu processo de oxidação é totalmente irreversível, apenas o produto de oxidação da DA foi seletivamente reduzido no eletrodo coletor, produzido um sinal analítico limpo.

As propriedades permeáveis seletivas de monocamadas auto-organizadas (SAM) sobre eletrodos de ouro^[87-89] foram utilizadas como forma de diferenciação de propriedades eletroquímicas de algumas substâncias de interesse biológico. Assim, eletrodos de ouro foram recobertos com monocamadas de ácidos ω -mercaptop

carboxílicos^[87], que em pH fisiológico adquirem uma superfície carregada negativamente, possibilitando a determinação de DA em presença de AA e AU. Neste pH, a DA possui um grupo amino carregado positivamente, o qual é atraído pela superfície do eletrodo, enquanto os interferentes são repelidos por estarem carregados negativamente. Monocamadas de alcanotóis minimizaram os sinais de AU e AA por apresentarem características aniônicas, enquanto analitos como DA, paracetamol, 4-amino fenol e noraepinefrina, por não apresentarem estas características, tiveram seus sinais aumentados^[88]. Assim, estas espécies foram detectadas amperometricamente num sistema FIA acoplado a HPLC. Monocamadas auto-organizadas de mercatobenzimidazol (SAM-MBI), produzidas eletroquimicamente sobre eletrodo de ouro, foram ainda utilizadas na determinação simultânea de AU e AA ^[89], usando Voltametria de onda quadrada.

Com o objetivo de manter as propriedades físico-químicas superficiais do carbono e tornar possível a renovação superficial de eletrodos, compósitos Carbono – PVC (poli cloreto de vinila) foram também utilizados na detecção de AA, DA e AU utilizando Voltametria Cíclica (VC) ou cronoamperometria ^[90].

É conhecido na literatura que nanotubos de carbono (NTC) apresentam propriedades eletrônicas interessantes para promover e mediar reações de transferência de carga ^[91-94] sendo, portanto, materiais adequados para a construção de sensores químicos. Isto se deve, pelo fato dos NTCs possuírem alta condutividade elétrica, alta estabilidade química e alta estabilidade mecânica. Devido a estas características este material foi utilizado para modificar a superfície de carbono vítreo e quantificar ácido úrico na presença de ácido ascórbico ^[91,92], ou ainda, quantificar

xantina e ácido úrico em presença de ácido ascórbico, dopamina e hipoxantina ^[93]. Esta mesma aproximação foi ainda usada na presença de filmes de náfion para eliminação da interferência de ácidos ascórbico e úrico e obtenção de reversibilidade para oxidação de dopamina ^[94]. As técnicas utilizadas na determinação destes analitos foram respectivamente a Voltametria de Pulso Diferencial ^[91,92], Voltametria de Redissolução Adsorptiva ^[93] e Voltametria Cíclica ^[94].

A eliminação da interferência do ácido ascórbico concomitantemente à pré-concentração de DA e AU foi obtida através da modificação do eletrodo de carbono vítreo com um tipo especial de sílica ^[95], cuja composição é 1,87% de Na₂O, 10,28% de Al₂O₃, 32,20% de Fe₂O₃, 36,35% de SiO₂ e 18,16% de H₂O. Os autores valeram-se do Princípio de Pearson, o qual propõe que o Ferro, sendo um ácido duro, deve ligar-se a bases igualmente duras, neste caso DA e AU. Assim os autores recobriram o carbono vítreo com este material e aplicaram ao eletrodo um potencial positivo, garantindo que todo o ferro estivesse realmente no estado trivalente. Seqüencialmente, o eletrodo assim modificado, foi recoberto com filme náfion. Como resultados finais obtiveram pré-concentração de DA e AU (pH ≤ 4,0), além da exclusão do AA por carga.

A dopamina foi determinada utilizando eletrodos quimicamente modificados, explorando as propriedades catalíticas de metais como cobre^[96,97] e Rutênio^[98]. Um sistema FIA com eletrodos modificados a partir da imobilização de cobre(II) em membrana de poli (etileno-co-vinil acetato)^[96] foi desenvolvido para determinação seletiva de dopamina em presença de altos níveis de AA, Catecol e L-DOPA. Um sensor recoberto com membrana de Náfion dopada com complexo de cobre(II) – bipyrimidina^[97] foi utilizado para a determinação amperométrica de dopamina em

presença de AA e AU. Os autores utilizaram as propriedades redox do par cobre(II)/(I) e aumentaram a ação catalítica do metal na oxidação de catecóis. Para tanto, utilizaram o peróxido de hidrogênio para re-oxidar o cobre reduzido, aumentando a sensibilidade do sensor. Eletrodos modificados com filmes de complexos de tetrarutenato cobalto-porfirina^[98] foram utilizados na determinação de NADH e dopamina. A modificação superficial do sensor proporcionou alta seletividade, para a redução dos analitos (previamente oxidados) e, alta sensibilidade sendo atribuída ao rápido processo de transferência de elétrons envolvendo os bioanalitos e o rutenato porfirínico. O uso de um sistema FIA com o eletrodo modificado permitiu a determinação de dopamina e NADH em níveis de ppb.

DA também foi determinada, sem a interferência de AA, em eletrodos de carbono vítreo modificados com membrana de bicamada lipídica auto-organizada (BLM), constituída por brometo de 5,5 ditetradecil-2-(2-trimetil - amônioetil)-1,3 dioxano (DTDB)^[99]. Esta superfície apresentou efeito eletrocatalítico para DA e devido ao forte efeito de repulsão da camada modificadora, o pico de corrente de oxidação do AA praticamente desapareceu.

O desenvolvimento de biossensores utilizando materiais como DNA^[52], enzimas como *lacase*^[100,101], *peroxidase*^[101] e *poli fenol oxidase*^[102] foram utilizadas na determinação catalítica de diversas catecolaminas, incluindo a dopamina. Um microsensor foi construído pela imobilização de DNA e poli pirrol gerado eletroquimicamente em um eletrodo de fibra de carbono, o microsensor foi utilizado na determinação simultânea de DA e serotonina. O biossensor foi preparado pela modificação de pasta de carbono incorporando extrato bruto de um fungo com fonte de *lacase*, esta enzima catalisou a oxidação de dopamina e adrenalina, o produto de

oxidação do respectivo analito gerado na superfície do eletrodo foi reduzido e o resultado da corrente catódica foi diretamente relacionada com a concentração da respectiva catecolamina^[100].

Barbosa et al^[101] exploraram o efeito sinérgico de um sistema com *lacase* e *peroxidase*, assim o biosensor de pasta de carbono modificado pelas duas enzimas aumentou a sensibilidade na determinação de DA, adrenalina, isoprenalina e L-DOPA. O sistema bi-enzimático para determinação de catecolaminas funcionou da seguinte forma, a enzima *lacase* catalisou a oxidação de catecolamina, gerando peróxido de hidrogênio, e este devido a presença de peroxidase funcionou como acceptor de elétrons aumentando a resposta do sensor. A notável atividade enzimática apresentada por fibras do tecido da fruta de palmeira *Latania*, SP, foram utilizados como fonte de *polifenol oxidase* para a construção de biosensores como eletrodos modificados e reatores biocatalíticos, sendo utilizados na quantificação de catecol e dopamina^[102]. Estes compostos foram determinados pela redução eletroquímica de seus produtos de oxidação em eletrodos de pasta de carbono, após a conversão biocatalítica de catecol e DA em seus produtos quinônicos. Melhores resultados para a quantificação de dopamina foram obtidos quando se utilizou um reator contendo o tecido de *Latânia on-line* associado a um sistema.

Eletrodos Quimicamente Modificados com filmes produzidos pela modificação eletroquímica também representam uma alternativa poderosa na detecção de DA, AA e AU, devido a versatilidade, diversidade e rapidez na alteração das propriedades superficiais dos eletrodos^[103-110]. Assim superfícies de eletrodos de pasta de carbono, modificadas por eletro-oxidação de colina e acetilcolina^[103], apresentaram efeito

catalítico para a DA e AA. Picos de oxidação bem resolvidos foram observados e a determinação simultânea destes analitos pode ser realizada. Resultados similares foram obtidos com eletrodos de carbono vítreo (ECV) modificados eletroquimicamente em solução de glicina ^[104], β-alanina ^[105] e poli fenosafrine ^[106].

Filmes muito finos e estáveis de hexacianoferrato de cobalto ^[107], foram eletroquimicamente depositados na superfície de eletrodos de carbono vítreo, e empregados na determinação seletiva de DA utilizando voltametria de pulso diferencial, determinação esta que foi acompanhada por efeitos eletrocatalíticos e ausência de adsorção dos produtos de oxidação.

Eletrodos de carbono modificados covalentemente com ácido glutâmico foram eletroquimicamente oxidados ^[108] e aplicados na oxidação catalítica de AU e AA. A modificação efetuada proporcionou diminuição do sobrepotencial de oxidação dos analitos e a separação dos dois picos de oxidação, seja usando VDP ou VC, permitindo a determinação simultânea de AA e AU. Polímeros de N,N-dimetilalanina foram eletroquimicamente depositados ^[109] sobre eletrodos de pasta de carbono, formando filmes positivamente carregados devido ao grupo amônio quaternário presente no polímero. Com esta característica catiônica o filme pré-concentrou AA e AU, que em pH 7,0, encontram-se carregados negativamente, facilitando o processo de oxidação observado pelo deslocamento de ambos os potenciais de oxidação para regiões mais negativas de potencial. Concomitantemente, foram observados maiores níveis de corrente, ausência de envenenamento, sendo o efeito mais pronunciado para AU. A determinação deste último foi efetuada com boa reprodutibilidade e sensibilidade calculada de 0,0285 μA μM⁻¹. Em sistema FIA, com detecção amperométrica, a

presença de AA não causou efeitos superficiais indesejáveis, porém foi necessário descontar a corrente de oxidação do AA da corrente total lida, pois esta corresponde à corrente de oxidação de ambos os analitos.

A quantificação de AA ^[110] em presença de AU também foi realizada usando sistema similar e eletrodo de pasta de carbono modificado com um filme polimérico de 3,4 dihidroxibenzaldeído. Boa sensibilidade, associada à diminuição de sobrepotencial para a oxidação de AA, foram igualmente observada.

Foram aqui discutidos, apenas alguns trabalhos que, de alguma maneira, traziam contribuições significativas na utilização de eletrodos limpos ou ainda, no processo de modificação de eletrodos e, não apenas, bons limites de detecção das espécies de interesse. A **Tabela I** apresenta outros trabalhos, já descritos na literatura, nos quais foram realizadas determinações simultâneas de **AA** e **DA** ou **AU** e **AA** ou ainda **DA** e **AU**.

Tabela I. Apresentação dos resultados analíticos obtidos nos trabalhos consultados com diferentes eletrodos modificados citados no presente trabalho.

Eletrodo	Agente Modificador	Técnica	Analito determinado	F Linear $\mu\text{mol L}^{-1}$	L. D. μmolL^{-1}	Outros analitos	Elim. interfer.	Ref
Pasta de carbono	----	VPD ^a	NADH	15 - 810	8,2	----	----	27
Ouro	OBP ^b	Amp. ^c	AA	2 – 400	0,6	----	DA e AU	30
Carbono vítreo	DHB ^d	Amp.-FIA ^e	AA	0,7 – 100	0,3	----	AU	34
Fibra de carbono	DNA-PPyox ^f	VPD ^a	DA	0,3 - 10	0,05	5-HT ^g	AA	52
Eletrodo impresso	IrOx ^h	Amp. ^c	DA	0,1 - 70	0,08	E ⁱ	AA e AU	69
Nanofibra de carbono	----	VPD ^a	DA	----	0,04	NE ^j e E ⁱ	----	72
Carbono vítreo	PPyox ^k	Amp-CL ^l	DA	0,005 - 500	0,00005	5-HT ^g , E ⁱ , NE ^j e DOPAC ^m	AA	75
Carbono vítreo	NTC-COOH ⁿ	Amp-CL ^l	DA	0,0005 – 10	0,0002	5-HT ^g , NE ^j , DOPAC ^m , etc ...	----	76
Eletrodo impresso	Alta temperatura	VVL ^o	DA e AU simultânea	----	----	----	AA	78
Conjunto de micro-eletrodos de ouro	Paládio	Amp-FIA	AU ¹ e AA ²	340-1680 ¹ 440-2640 ²	-----	----	----	79
Ouro	μ -cavidades	VC ^a	DA	5-100	2,0	Ru(NH ₃) ₆ ³⁺	AA	86

a) Voltametria de pulso diferencial; b) Polímero redox formado pela coordenação de [Os(bpy)₂Cl]⁺ / [Os(bpy)₂Cl]²⁺ com poli (4-vinil-piridina); c) Amperometria; d) 3,4-dihidroxibenzaldeído; e) Amperometria acoplada a um sistema FIA; f) DNA imobilizado com poli pirrol; g) Serotonina; h) Óxido de irídio hidratado; i) Adrenalina; j) Noradrenalina; k) Poli pirrol; l) Amperometria acoplada a um sistema de cromatografia líquida; m) 3,4 dihidroxifenilacético; n) Nanotubos de carbono carboxilados; o) Voltametria de Varredura Linear.

Eletrodo	Agente Modificador	Técnica	Analito determinado	F Linear $\mu\text{mol L}^{-1}$	L. D. μmolL^{-1}	Outros analitos	Elim. interfer.	Ref
Ouro	Micro-cavidade	VC ^a	DA	5-100	2,0	Ru(NH ₃) ₆ ³⁺	AA	86
Ouro	SAM alcanotiol ^b	HPLC-FIA-DE ^c	DA	5-500	0,5	4-AP ^d , NE ^e e PRTC ^f	AU e AA	88
Ouro	SAM-MBI ^g	VOQ ^h	AU ¹ e AA	1- 300 ¹	1,0 ¹	----	Gli ⁱ , Pur ^j Urea e oxalato	89
Compósito carbono-PVC ^l	----	VPD	DA	4-12	0,0009	----	AA e AU	90
Ouro	NTC ^m	VPD	AU ¹ e DA	4-700 ¹	1,0 ¹	NE ^e	AA	91
Carbono vítreo	NTC ^m	VPD	AU	0,2-80	0,1	----	AA	92
Carbono vítreo	NTC ^m	VRA ⁿ	AU	0,1-100	0,04 ¹	Xantina	AA, DA hipoxantina	93
Carbono vítreo	NTC ^j -náfion	VPD	DA	0,01-10	0,0025	----	AA e AU	94
Carbono vítreo	Nantronite-náfion	VOQ ^h	AU ¹ ou DA ²	0,5-10 ¹	0,2 ¹	----	AA	95
				0,0-6,0 ²	0,0027 ²			
Grafite-epoxi	EVA-Cu ²⁺	Amp-FIA	DA	1000-10000	870	----	AA, GLI ^j , CAT ^o , etc...	96
Carbono vítreo	Náfion-[Cu(bipy) ₂] ²⁻	Amp.	DA	35-240	8,0	Catecol e L-DOPA	AA, AU, etc...	97

a) Voltametria cíclica; b) Monocamadas auto-organizadas (SAM) de n-alcanotióis; c) Amperometria acoplada a um sistema FIA e HPLC; d) 4-ace-toaminofenol; e) Noradrenalina; f) Paracetamol; g) SAM de mercaptobenoimidazole; h) voltametria de onda quadrada; i) Glicose; j) Purina; l) poli cloreto de vinila; m) Nanotubos de carbono; n) Voltametria de redissolução anódica; o) Catecol.

Eletrodo	Agente Modificador	Técnica	Analito determinado	F Linear $\mu\text{mol L}^{-1}$	L. D. μmolL^{-1}	Outros analitos	Elim. interfer.	Ref
Carbono vítreo	TRCP ^a	Amp-FIA	DA ¹ e NADH ²	0,2-0,8 ¹ 2-8 ²	ppb ^{1,2}			98
Carbono vítreo	DTDB-BLM ^b	Amp-FIA	DA	0,005-500	0,00005	----	AA	99
Compósito com pasta de carbono	lacase	VPD	DA	70-400	9,8	E ^c	----	100
Pasta de carbono	Lacase-peroxidase	VPD	DA	6,6-390	0,027	E ^c , L-dopa e isoprenalina	----	101
Carbono vítreo	Reator biocatalítico ^d	Amp-FIA	DA	5-70	----	Catecol e fenol	Não fenólicos	102
Carbono vítreo	Colina-acetilcolina	VPD	DA ¹ , AA ²	0,7-5,0 ¹ 7,0-90 ²	0,3 ¹ 0,5 ²	serotonina	----	103
Carbono vítreo	glicina	VPD	DA ¹ e AA ²	5,0-800 ¹ 60-4000 ²	1,8 ¹ 21 ²	----	----	104
Carbono vítreo	β -alanina	VPD	DA ¹ e AA ²	4,0-500 ¹ 20-6000 ²	2,4 ¹ 12 ²	----	----	105
Carbono vítreo	Poli phenosafrafrase	VPD	DA ¹ e AA ²	----	0,02 ¹ 0,01 ²	serotonina	----	106
Carbono vítreo	CoHCF ^e	VC	DA	300-5000	1,0	----	----	107
Carbono vítreo	Ac. glutâmico	VPD	AU ¹ e AA ²	2,0-400 ¹ 1,0-400 ²	1,1 ¹ 0,92 ²	----	----	108

a) Complexo de tetra-rutenato de cobalto-porfirina; b) Membrana de bicamada lipídica dopada com 5,5-ditetradecil-2-(2-trimetil-amônioetil)-1,3-dioxano; c) Adrenalina, d) tecido do fruto de Latânia, como fonte de poli fenol oxidase; e) Hexacianoferrato de cobalto.

2. Procedimento Experimental

2.1. Reagentes

Tabela II. Reagentes¹ e procedência

Reagentes	Procedência
Ácido úrico	Aldrich Chemical
2-amino-6,8 dihidroxipurina (8-oxo-guanina)	Aldrich Chemical
óleo Nujol	Aldrich Chemical
ácido L-ascórbico	Mallinckrodt
cloridrato de dopamina	Avocado Research Chemicals
pó de grafite Acheson 38	Fisher
β D-glucose	Sigma
β -Nicotinamida adenina dinucleotídeo dissódico (NADH)	Merck
β -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato tetrassódico (NADPH)	Merck
xantina	Merck
hidróxido de sódio	Merck
nitrate de sódio	Merck
acetato de sódio	Merck
hidrogenofosfato dissódico	Merck
dihidrogenofosfato monossódico	Merck
ácido cítrico	Merck
ácido bórico	Merck
ácido acético	Merck
ácido <i>o</i> -fosfórico	Merck
ácido clorídrico	Merck
Piperazine-N,N'-bis [ácido 2-etanosulfônico] (PIPES)	Alfa AESAR
hidrocloro de guanina	Alfa AESAR

¹ Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e utilizados sem prévia purificação.

2.2. Soluções

Soluções estoques de guanina e 8-oxo-guanina foram preparadas na concentração de $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ pela dissolução dos respectivos sais em solução de NaOH $1,0 \text{ mol l}^{-1}$.

Soluções diluídas de guanina e 8-oxo-guanina na concentração de $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ foram utilizadas para modificação dos eletrodos de pasta de carbono. Estas soluções diluídas foram feitas a partir das soluções estoques no tampão de pH desejado.

Soluções estoques de NADH e NADPH foram preparadas na concentração de $3,0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ por dissolução dos respectivos sais em tampão PIPES, pH 7,0.

Soluções estoques de ácido ascórbico e dopamina foram preparadas respectivamente nas concentrações de $1,0 \times 10^{-1} \text{ mol l}^{-1}$ e $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ foram preparadas por dissolução de massa apropriada destas substâncias em solução de tampão fosfato (TF), pH 6,5.

Soluções estoques de ácido úrico (AU) e xantina (XA) foram preparadas na concentração de $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ por dissolução de massa apropriada desses analitos em 2,0 ml de NaOH $1,0 \times 10^{-1} \text{ mol l}^{-1}$, com posterior diluição a 10,0 ml com TF pH 6,5.

Solução estoque de glicose (GLI) foi preparada na concentração de $1,0 \text{ mol l}^{-1}$ por dissolução de massa apropriada desse analito em TF pH 6,5 e mantida em temperatura ambiente por 24 h para permitir o equilíbrio de suas formas anoméricas.

Para todas as medidas analíticas foram adicionados volumes adequados de soluções estoques para as concentrações desejadas diretamente à célula eletroquímica contendo o tampão de pH desejado.

As soluções tampão foram preparadas como descrito na literatura ^[111,112].

Tampão acetato de sódio/ácido acético (tampão acetato) foi preparado na concentração de $0,1 \text{ mol l}^{-1}$, pH 4,5 por dissolução de massa apropriada de acetato de sódio e volume adequado de ácido acético e ajuste de pH feito com solução de HAc $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ ou NaOH $2,0 \text{ mol l}^{-1}$.

Tampão fosfato (TF) foi preparado na concentração de $0,1 \text{ mol l}^{-1}$, pH 6,5 ou 10,0, por dissolução de massa apropriada dos sais hidrogenofosfato dissódico e dihidrogenofosfato monossódico e ajuste de pH feito com solução de H_3PO_4 $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ ou NaOH $2,0 \text{ mol l}^{-1}$.

Tampão PIPES foi preparado na concentração de $0,1 \text{ mol l}^{-1}$, pH 7,0 por dissolução de massa apropriada de PIPES em NaOH $1,0 \text{ mol l}^{-1}$ e ajuste de pH feito com o próprio hidróxido. A força iônica foi então ajustada para $0,3 \text{ mol l}^{-1}$ com NaNO_3 .

Tampão universal foi preparada nos pHs 4,5, 7,0 e 8,0, pela mistura de volumes adequados de soluções estoques dos ácidos bórico, acético e fosfórico todos com concentração de $0,4 \text{ mol l}^{-1}$ e ajuste de pH feito com solução de e NaOH $2,0 \text{ mol l}^{-1}$.

Amostras de urina, soro e sangue foram coletadas pelo Laboratório de Análises Clínicas do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, e usadas sem qualquer tratamento, apenas diluídas a 20% em tampão fosfato $1,0 \times 10^{-1} \text{ mol l}^{-1}$ pH 6,5, ou seja, cada volume de amostra foi diluído em quantidade quatro vezes maior de tampão.

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada obtida de um sistema da Barnstead Nanopure, momentos antes das medidas voltamétricas, e foram previamente desoxigenadas por borbulhamento de N_2 , por 15 min.

A pasta de carbono foi preparada pela mistura de grafite/nujol, respectivamente na proporção 2:1 (massa/massa).

2.3 Equipamentos e sistema de eletrodos

Todas as medidas voltamétricas foram registradas utilizando potenciostato/galvanostato μ AUTOLAB Type III da Eco-Chemie PG-STAT 30 da Eco-Chemie acoplado ao software GPES versão 4.9005.

As medidas de pH foram efetuadas com o pH-metro modelo 654 acoplado a um eletrodo de vidro modelo 6.0203.100 (OE), ambos da Metrohm.

Os voltamogramas de pulso diferencial foram registrados nas seguintes condições: velocidade de varredura de 5 ou 10 mV s^{-1} ; amplitude de pulso de 50 mV e duração de pulso de 70ms.

Utilizaram-se eletrodos de pasta de carbono ou grafite pirolítico, como eletrodos de trabalho, Ag/AgCl, $\text{KCl}_{(\text{sat})}$, como eletrodo de referência e fio de platina, como auxiliar.

2.4 Modificação dos eletrodos de pasta de carbono

Eletrodos de pasta de carbono foram modificados em soluções de guanina ou 8-oxo-guanina $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ em tampão acetato, PIPES ou Universal em diferentes pHs. Estes eletrodos também foram modificados apenas em solução de tampão acetato pH 4,5 ou tampão universal, pH 8,0. Para a modificação foram aplicados potenciais de + 0,2, + 0,4, e + 1,1 V, por um período de 12 minutos sob agitação. Após a modificação os eletrodos foram lavados com água deionizada para posterior utilização.

A **Tabela III** apresenta a composição de cada solução modificadora e a denominação do eletrodo após a sua modificação.

Tabela III: Composição das soluções modificadoras dos eletrodos de pasta de carbono e sua nova denominação.

Eletrólito suporte	Solução Modificadora	Denominação do eletrodo
Tampão Acetato, pH 4,5	Guanina ^a	EPC-G pH 4,5
Tampão PIPES, pH 7,0	Guanina ^a	EPC-G pH 7,0
Tampão Universal, pH 8,0	Guanina ^a	EPC-G pH 8,0
Tampão PIPES, pH 7,0	8-oxo-guanina ^a	EPC-8-oxo pH 7,0
Tampão acetato, pH 4,5	Tampão Acetato, pH 4,5	EPC pH 4,5
Tampão Universal, pH 8,0	Tampão Universal, pH 8,0	EPC pH 8,0

^a Concentração $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$

2. 5. Detecção de NAD(P)H, ácido úrico e 8-oxo-guanina

Os eletrodos de pasta de carbono modificados nas condições acima descritas, juntamente com os eletrodos auxiliar e de referência, foram imersos na célula eletroquímica contendo PIPES $1,0 \times 10^{-1} \text{ mol l}^{-1}$ pH 8,0. Registraram-se vários voltamogramas de pulso diferencial até a estabilização da linha base. Em seguida, adicionaram-se diversas alíquotas das soluções estoques de cada um dos analitos (NADH, NADPH, ácido úrico ou 8-oxo-guanina) à célula eletroquímica. Em seguida, registraram-se três voltamogramas de pulso diferencial consecutivos no intervalo de $0,2 \text{ V} \leq E_{\text{aplicado}} \leq + 0,9$. Para a construção das curvas analíticas foram adicionados, consecutivamente, quatro alíquotas de 25 μl , uma de 550 μl e mais quatro de 750 μl .

2.6. Limpeza e ativação da superfície do eletrodo de grafite pirolítico

A limpeza do eletrodo de grafite pirolítico foi feita mecanicamente em feltro metalográfico com alumina 1 μm e 0,3 μm , seguida da lavagem com água deionizada após cada polimento e posterior etapa de limpeza eletroquímica. Esta última consistiu na aplicação de + 1,5 V por 120 s ao eletrodo de trabalho, previamente imerso com eletrodos de referência e auxiliar em solução de NaOH $1,0 \times 10^{-1} \text{ mol l}^{-1}$, sob agitação. Em seguida registrou-se um VPD nas seguintes condições: E_{inicial} : - 0,2 V, E_{final} : + 1,5 V, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, o sistema foi mantido sob agitação para contribuir no processo de limpeza. Após este tratamento os eletrodos foram denominados de **EGP/Ativado**.

2.7. Modificação dos eletrodos de grafite pirolítico

O eletrodo de trabalho (**EGP-Ativado**), juntamente com eletrodos de referência e auxiliar foi transferido para a célula eletroquímica contendo apenas eletrólito suporte. Em seguida efetuou-se o registro de voltamogramas de pulso diferencial nas seguintes condições: E_{inicial} : - 0,2 V, E_{final} : + 0,5 V e $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, até estabilização da linha base, com etapas de pré-concentração de 10 s a + 1,5 V. Após esta etapa adicionou-se solução modificadora à célula, mantendo-se o potencial aplicado de + 1,5 V por 120 segundos sob agitação. A **Tabela IV** apresenta as soluções modificadoras empregadas, o eletrólito suporte e a respectiva denominação do eletrodo após sua modificação.

Tabela IV: Soluções usadas na modificação da superfície do eletrodo de grafite pirolítico

Eletrólito suporte	Solução Modificadora	Denominação do eletrodo
Tampão Fosfato, pH 6,5	Tampão Fosfato, pH 6,5	EGP-TF 6,5
Tampão Fosfato, pH 10	Tampão Fosfato, pH 10	EGP-TF 10
Tampão Fosfato, pH 6,5	DA ^a em TF pH 6,5	EGP-DA 6,5
Tampão Fosfato, pH 10	DA ^a em TF pH 10	EGP-DA 10

^a Concentração $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$

2.8. Detecção de dopamina e ácidos ascórbico e úrico

Os eletrodos **EGP-Ativados** e demais eletrodos modificados nas condições descritas anteriormente, juntamente com os eletrodos auxiliar e de referência, foram imersos na célula eletroquímica contendo tampão fosfato $1,0 \times 10^{-1} \text{ mol l}^{-1}$ pH 6,5. Registraram-se os voltamogramas de pulso diferencial até a estabilização da linha base. Em seguida, adicionaram-se soluções estoques de cada um dos analitos ou interferentes à célula eletroquímica, de modo a se obter concentração final de: ácido ascórbico $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$, dopamina $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, ácido úrico $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, glicose $6,5 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ e/ou xantina (XA) $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$. Em seguida, efetuou-se etapa de pré-concentração de 10 s a +1,5 V e registraram-se seis voltamogramas de pulso diferencial consecutivos no intervalo de $-0,2 \text{ V} \leq E_{\text{aplicado}} \leq +0,5 \text{ V}$ para AA, DA e AU e para XA e GLI $-0,2 \text{ V} \leq E_{\text{aplicado}} \leq +0,9 \text{ V}$.

As curvas analíticas foram obtidas variando a concentração do analito desejado, porém fixando as concentrações das demais espécies. Os intervalos de concentração utilizados foram para dopamina, $1,0 \times 10^{-6} \leq DA \leq 2,0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, mantendo constantes as concentrações dos interferentes AA e AU, respectivamente, em $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ e $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$; para ácido úrico, $2,5 \times 10^{-6} \leq AU \leq 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, mantendo constantes as concentrações de AA e DA, respectivamente, $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ e $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$; e para ácido ascórbico, $2,5 \times 10^{-5} \leq AA \leq 5,0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ mantendo constantes as concentrações de DA e AU em $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ e $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, respectivamente.

Em todos os casos, para cada concentração do analito, registraram-se três voltamogramas consecutivos de pulso diferencial, mantendo a etapa de pré-

concentração de 10 s a + 1,5 V entre um voltamograma e outro. Para todos os analitos foram efetuadas três curvas analíticas consecutivas, utilizando-se apenas uma etapa de limpeza envolvendo a manutenção do eletrodo de trabalho no eletrólito suporte por 10 s a +1,5 V, seguida dos registros de três VDP. Deste modo, o processo de modificação foi efetuado uma única vez, não havendo modificação superficial posterior.

2.9. Determinação de ácido úrico em amostras de urina, sangue ou soro

Eletrodos **EGP-DA 10**, foram utilizados para determinação de AU em amostras de urina, sangue e plasma humano. Estas amostras, previamente diluídas a 20% em tampão fosfato, foram adicionadas diretamente à célula eletroquímica contendo apenas tampão fosfato $1,0 \times 10^{-1} \text{ mol l}^{-1}$, pH 6,5. Assim a diluição final para cada amostra foi: (urina: TF, 1:3000 v / v), (soro: TF, 1 : 250 v / v) e (sangue: TF, 1 : 500 v / v). Em seguida foram registrados os VPDs correspondentes às amostras diluídas. A quantificação de AU nestas amostras foi efetuada empregando-se o método de adição de padrão. Assim, foram adicionadas à célula contendo as amostras diluídas, alíquotas crescentes de solução padrão de AU, de modo a obter dados para a construção da curva analítica na matriz biológica. Antes de cada medida, efetuou-se etapa de pré-concentração de 10 s a +1,5 V e registraram-se VDP em triplicata, no intervalo de $-0,2 \text{ V} \leq E_{\text{aplicado}} \leq +0,5 \text{ V}$.

Os testes de recuperação foram efetuados após a quantificação de AU nas amostras. Conhecendo-se os valores presentes nas amostras, adicionaram-se às mesmas, concentrações exatamente conhecidas do analito, na mesma magnitude de concentração daquelas encontradas nas matrizes originais. Determinou-se AU nestas amostras empregando-se o método de adição de padrão. Do resultado final descontou-se o valor presente originalmente na amostra, de modo a obter o valor de recuperação frente ao padrão adicionado.

3. Resultados e Discussão

3.1. Primeira parte: Eletrodos de pasta de carbono modificados em solução de guanina – Detecção na determinação de NAD(P)H, 8-oxo-guanina e ácido úrico.

3.1.1. Modificação do eletrodo em solução de guanina

Eletrodos de pasta de carbono foram inicialmente modificados em solução de guanina $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ em tampão PIPES, (**EPC-G pH 7,0**) mediante aplicação de + 0,4 V ou + 1,1 V ao eletrodo de trabalho durante 12 minutos, sob agitação. Após a modificação, estes eletrodos foram utilizados na determinação de NADH, este analito foi utilizado devido ao pronunciado efeito de envenamento superficial em eletrodos limpos^[27,28], portanto este analito foi utilizado como parâmetro para acompanhar a modificação superficial do eletrodo. O potencial de oxidação deste analito, obtido com ambos os eletrodos foram similares, aproximadamente + 0,6 V, porém, os níveis de correntes de oxidação foram muito superiores quando o processo de modificação foi efetuado a + 1,1 V, **Figura 3.1**.

Para o eletrodo modificado a + 0,4 V registrou-se em solução de NADH um segundo pico de oxidação a + 0,8 V, sendo este atribuído da guanina previamente adsorvida na superfície do eletrodo durante o processo de modificação^[113,114], **Figura 3.1**. (curva d).

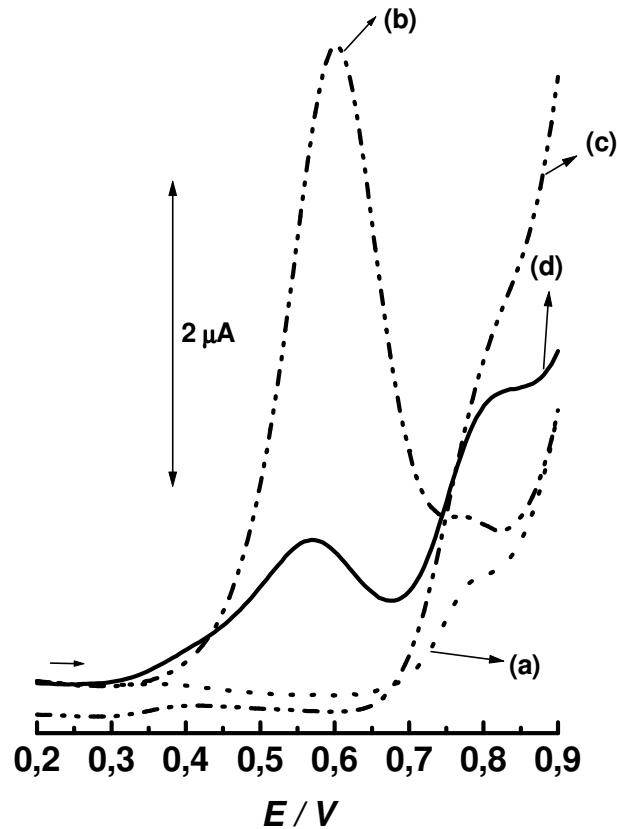


Figura 3.1. Voltamogramas de pulso diferencial registrados com **EPC-G pH 7,0** modificado a + 1,1 V em: tampão PIPES pH 7,0 (curva a) e em solução $4,2 \times 10^{-4}$ mol l^{-1} de NADH (curva b). VPD registrados com **EPC-G pH 7,0** modificado a + 0,4 V em: tampão PIPES pH 7,0 (curva c) e em solução $4,2 \times 10^{-4}$ mol l^{-1} de NADH (curva d). Condições experimentais: amplitude de pulso 50 mV, largura do pulso 70 ms e velocidade de varredura $5,0$ mVs $^{-1}$.

Podemos observar que a modificação do **EPC-G pH 7,0** realizada a + 1,1 V, proporcionou uma superfície condutora apresentando altos níveis de corrente para oxidação de NADH, **Figura 3.1** (curva b). Com modificação do eletrodo realizada a + 0,4 V, também obtivemos uma superfície modificada, porém o pico de oxidação para NADH obtido com este eletrodo foi largo e de baixa intensidade de corrente. No potencial em que ocorreu a oxidação do NADH, a guanina ainda não foi oxidada, pois

de acordo com Goyal e Dryhurst^[113] a guanina é oxidada a 8-oxo-guanina em eletrodo de grafite pirolítico a 0,66 V vs ECS (pH 7,0). Portanto o segundo pico observado em solução de NADH, na **Figura 3.1** (curva d) foi atribuído à oxidação de guanina adsorvida previamente a superfície do eletrodo, sendo que o formato dos picos de oxidação alargado indicou que durante o processo de modificação a + 0,4 V, as espécies eletroativas foram adsorvidas na superfície do eletrodo. Desta forma, os produtos de oxidação gerados na superfície do eletrodo, pela aplicação do potencial de 1,1 V, durante o pré-tratamento em solução de guanina, devem estar envolvidos no processo de modificação do eletrodo, explicando os altos níveis de corrente obtidos para a oxidação de NADH.

3.1.2. Modificação do eletrodo em solução de 8-oxo-guanina

A fim de se entender qual o papel da 8-oxo-guanina no processo de modificação superficial do eletrodo, eletrodos de pasta de carbono também foram pré-tratados em solução de 8-oxo-guanina em PIPES, pH 7,0 (**EPC-8-oxo pH 7,0**) a + 0,2 V (antes do potencial de oxidação desta espécie) e, também a + 1,1 V (após o potencial de oxidação da mesma), **Figura 3.2**. Em ambos casos, os níveis de corrente e o potencial de pico de oxidação do NADH foram similares. Além disso, após o registro de vários voltamogramas consecutivos, observamos um ligeiro decréscimo nas correntes de pico e um ligeiro deslocamento de potencial no sentido positivo, evidenciando um efeito de envenenamento superficial (**Figuras 3.2.a. e 3.2.b.**).

Por outro lado, **EPC-G pH 7,0** pré-tratados em solução de guanina a 1,1 V, além de apresentarem intensidade de corrente aproximadamente duas vezes maiores que aqueles obtidos com os eletrodos **EPC-8-oxo pH 7,0**, não apresentaram efeito de

envenenamento superficial, **Figura 3.2.C**. Desta forma, ficou evidente que as espécies superficiais que são formadas durante o pré-tratamento do eletrodo a 1,1 V em solução de guanina, **EPC-G pH 7,0**, não puderam ser obtidas utilizando apenas a 8-oxo-guanina como solução modificadora.

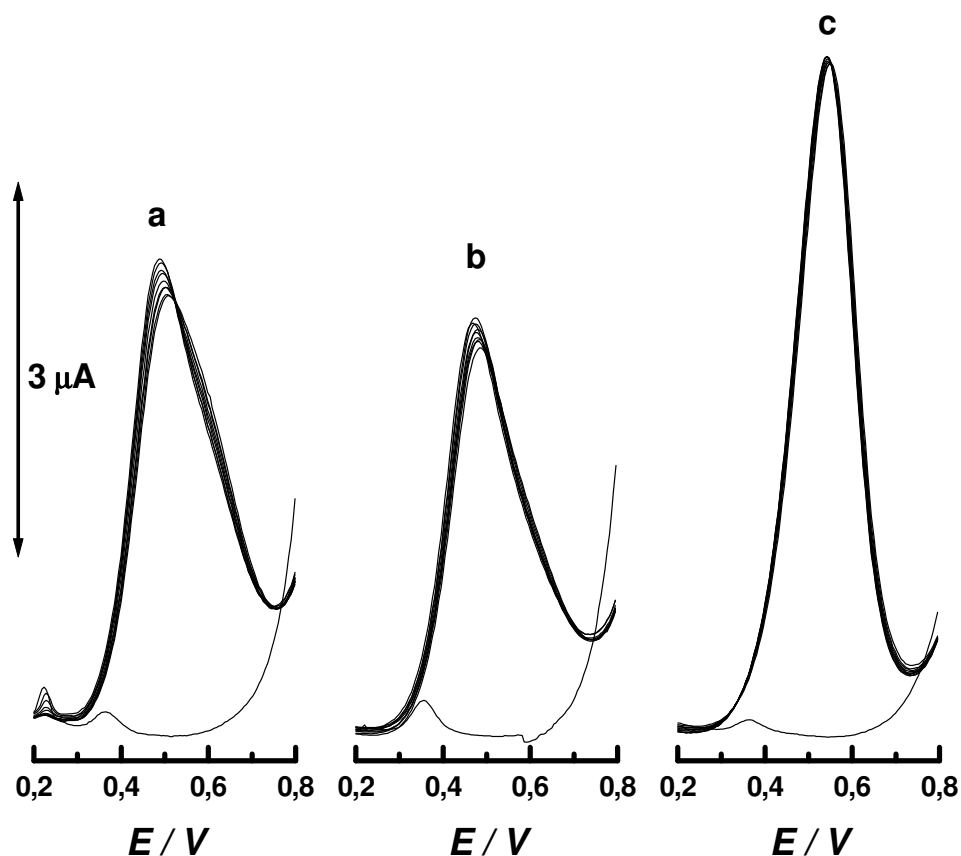


Figura 3.2. VPD registrados consecutivamente em solução de $4.2 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ de NADH em tampão PIPES, pH 7,0 usando: (a) **EPC-8-oxo** modificado sob aplicação de 0,2 V durante 12 min. (b) **EPC-8-oxo** modificado a 1,1 V de potencial durante 12 min. (c) **EPC-G pH 7,0** modificado a 1,1 V de potencial durante 12 min. Condições experimentais similares as da **Figura 3.1**.

Uma possível explicação pela diferença entre a modificação superficial obtida, com o pré-tratamento em solução de 8-oxo-guanina (**Figuras 3.2.a e b**) com aqueles obtidos com o pré-tratamento em solução de guanina (**Figuras 3.1. b e 3.2.c**), está no modelo proposto por Subramanian e Dryhurst para a oxidação eletroquímica de guanosina em eletrodo de grafite pirolítico^[29] e nos resultados obtidos por Brett *et al*^[115] para oxidação de guanina em microeletrodos de carbono vítreo.

No primeiro trabalho, os autores demonstraram que no processo de oxidação da guanosina, a primeira etapa envolve a oxidação da guanosina com a perda de um elétron e um próton, levando a formação de um radical livre com um elétron desemparelhado na posição C (8). Este radical reage com guanosina e água para produzir outros diferentes radicais livres, que sofrem uma série de reações químicas e eletroquímicas formando di e tri-nucleosídeos de guanosina.

Em princípio, Subramanian e Dryhurst acreditavam que produtos oligoméricos não poderiam ser formados pela eletro-oxidação de guanina devido a sua baixa solubilidade (entre 20 a 25 vezes menos solúvel que guanosina). Por outro lado, a solubilidade da guanina em meio alcalino é maior e assim, baixas concentrações do radical guanil C (8) devem promover a produção de dímeros ou trímeros de guanina. Esta hipótese é corroborada pelo trabalho de Brett *et al*^[115] mostrando que após o quinto VPD registrado em solução de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ de guanina em pH 4,5, três picos de oxidação foram observados: o primeiro a + 0,55 V, atribuído a oxidação reversível da 8-oxo-guanina formada na superfície do eletrodo, envolvendo dois prótons e dois elétrons, o segundo pico a + 0,8 V, atribuído a oxidação da guanina a 8-oxo-guanina e o terceiro a + 0,95 V, atribuído a oxidação reversível de dímeros de guanina, envolvendo um elétron. Após transferir o eletrodo para outra célula eletroquímica

contendo apenas eletrólito suporte, sucessivos voltamogramas de pulso diferencial foram registrados e apenas um pico de oxidação permaneceu a + 1,0 V, sendo atribuído aos dímeros de guanina adsorvidos na superfície do eletrodo.

Deste modo, os resultados obtidos e apresentados nesta dissertação já foram obtidos por outros pesquisadores, embora os mesmos não tivessem por objetivo a preparação e aplicação destas superfícies modificadas, aliás, os autores não se atentaram para a modificação que ocorria na superfície do eletrodo.

Com o objetivo de obter dados experimentais que dessem suporte a hipótese de formação de dímeros e trímeros de guanina, como decorrência do processo de modificação superficial dos eletrodos, realizaram-se VPDs em eletrólito suporte, após registro de alguns voltamogramas em solução de guanina e, após o mesmo ter sido modificado nesta solução a + 1,1 V durante 12 minutos.

Para tanto, um eletrodo de pasta de carbono pré-tratado em **tampão acetato**, pH 4,5 a + 1,1V (**EPC pH 4,5**) foi utilizado para registros de VPD em solução de $5,0 \times 10^{-5}$ mol l⁻¹ de guanina. Um pico de oxidação a + 0,83 V foi detectado. Após a transferência deste eletrodo para uma cela contendo apenas tampão acetato, pH 4,5 nenhum pico foi detectado, **Figura 3.3a**. Contudo, os VPD registrados com eletrodos pré-tratados em solução $5,0 \times 10^{-5}$ mol l⁻¹ de guanina pela aplicação de + 1,1 V por 12 minutos, em tampão acetato apresentaram um pequeno pico estável registrado a + 0,88 V. Aumentando a concentração de guanina na solução modificadora para $5,0 \times 10^{-4}$ mol l⁻¹ (**EPC-G pH 4,5**) dois picos estáveis são detectados em tampão acetato, pH 4,5. O primeiro a + 0,55 V, atribuído a oxidação da 8-oxo-guanina e o segundo a + 0,9 V, atribuído a oxidação de estruturas de guanina na forma de dímeros ou trímeros adsorvidas na superfície do eletrodo, **Figura 3.3.b**. Este último pico é cerca de 100 mV

menos positivo que aqueles previamente descritos por Brett *et al*^[115] e, conseqüentemente, a composição do filme e a organização das estruturas formadas na superfície do eletrodo de pasta de carbono deve ser ligeiramente diferentes daquela obtida com o microeletrodo de carbono vítreo.

Os resultados experimentais obtidos não são suficientes para esclarecer qual a real composição do filme que recobre o eletrodo, se são estruturas diméricas ou triméricas. Assim, estudos adicionais envolvendo o emprego de espécies capazes de seqüestrar os eventuais radicais livres formados devem ser realizados para esclarecer qual a composição do filme formado na superfície do eletrodo.

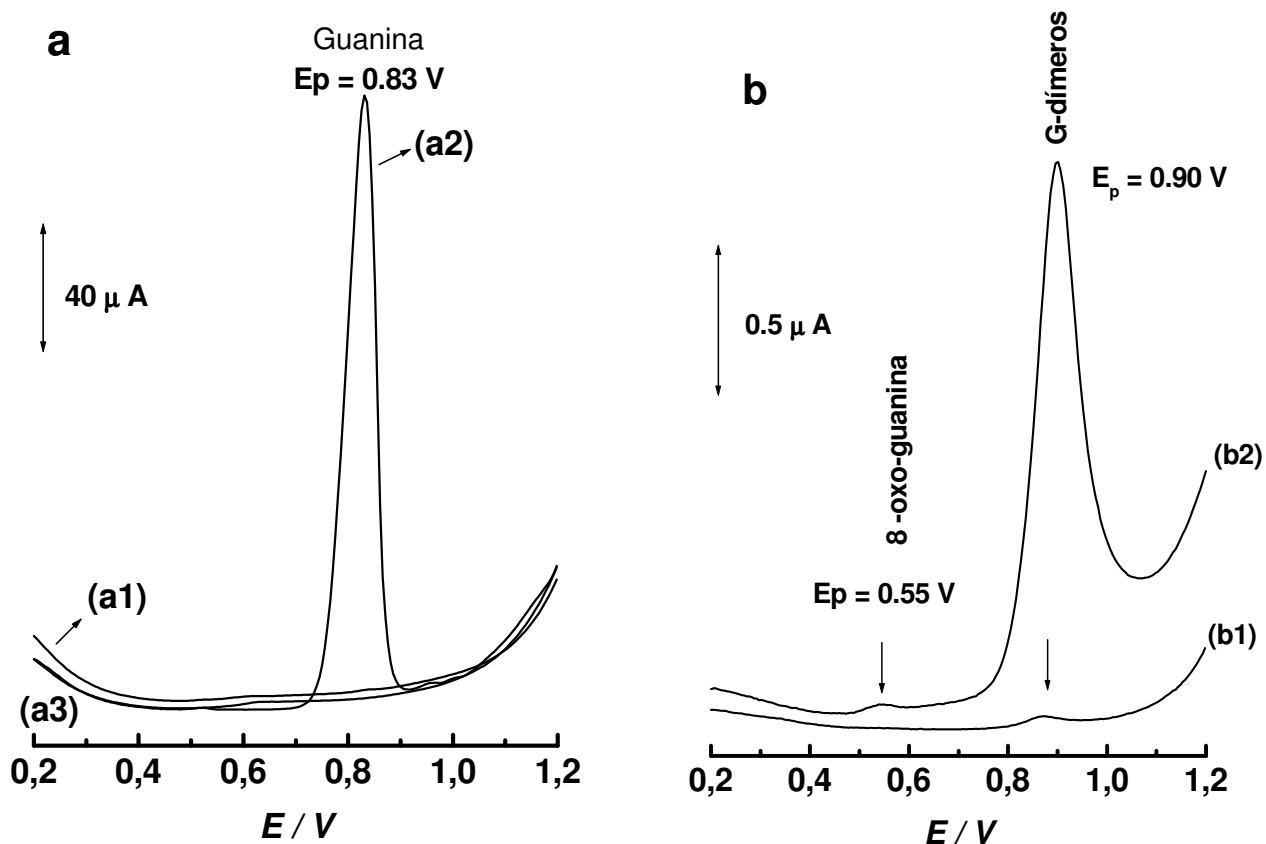


Figura 3.3. a) VPD registrados com **EPC pH 4,5** (modificado em tampão acetato durante 12 minutos a 1,1 V) em solução de: (a1) tampão acetato, pH 4.5. (a2) Guanina, $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ (5ª varredura) (3) tampão acetato, pH 4.5 após (2); b) VPD registrados em tampão acetato, pH 4,5 utilizando: (b1) **EPC-G pH 4,5** pré-tratado em solução de guanina, $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ (2) **EPC-G pH 4,5** pré-tratado em solução de guanina, $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, ambos modificados a + 1,1 V por 12 min. Condições experimentais: veja **figura 3.1**

3.1.3. Monitoramento do recobrimento do eletrodo de pasta de carbono modificado por filmes produzidos a partir da oxidação de guanina

A maneira mais simples encontrada para verificar se a superfície do eletrodo de pasta de carbono era recoberta pelo filme polimérico produzido foi utilizar o próprio tampão PIPES, como parâmetro de referência. Este tampão apresenta um pico característico de oxidação ou dessorção a + 1,1 V, em eletrodos de pasta de carbono sem prévia modificação, **Figura 3.4.a**. O desaparecimento deste pico ou deslocamento para potências mais positivas, pode ser utilizado como parâmetro de formação de um filme e de recobrimento total da superfície de carbono. Eletrodos que foram pré-tratados em solução de guanina (**Figuras 3.4.d**), não apresentaram este pico (oxidação ou dessorção do PIPES), mostrando um total recobrimento superficial do eletrodo, enquanto eletrodos modificados em solução de 8-oxo-guanina, continuaram a registrar este pico a + 1,1 V indicando que não foi possível formar um filme que recobrisse toda a superfície do eletrodo de pasta de carbono. Como pode ser observado nas **Figuras 3.4.b e 3.4.c**, após a modificação houve apenas um aumento nos níveis de corrente do pico registrado no tampão. Assim, o filme polimérico responsável pelo recobrimento total da superfície do eletrodo só foi obtido quando a modificação foi realizada em solução de guanina. Por outro lado, vale ressaltar que embora o recobrimento total da superfície com guanina possa ser obtido por tratamento eletroquímico do eletrodo de trabalho a + 0.4 e 1,1 V, somente no último caso obtém-se superfícies adequadas para detecção dos analitos propostos.

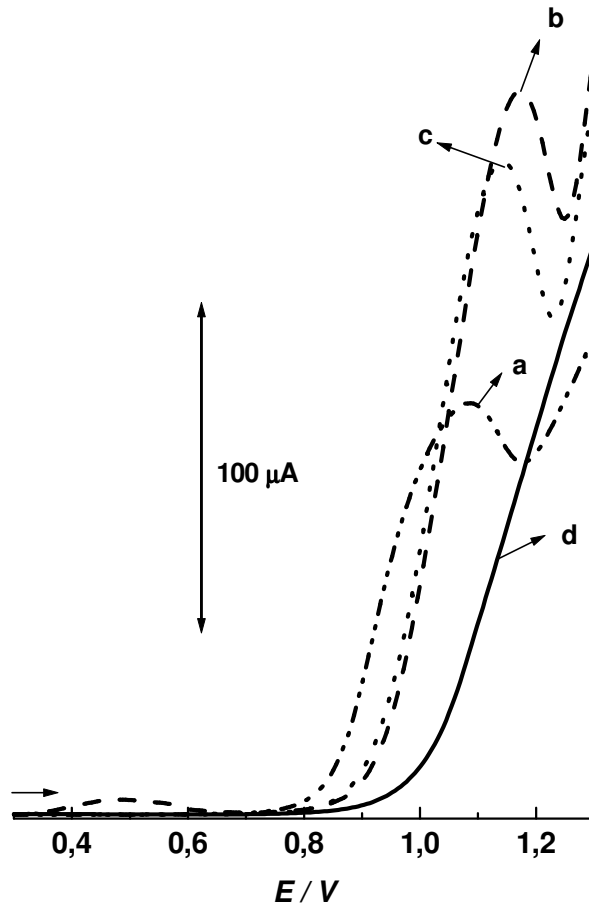


Figura 3.4. VPD registrados em tampão PIPES, pH 7,0 usando: (a) EPC sem modificação. (b) **EPC-8-oxo pH 7.0** modificado sob potencial de 0.2 V durante 12 min. (c) **EPC-8-oxo pH 7.0** modificado sob potencial de 1.1 V durante 12 min. (d) **EPC-G pH 7.0** modificado sob potencial de 1.1 V durante 12 min. Condições experimentais veja a **figura 3.1**.

3.1.4. Influência do pH no processo de modificação

Para avaliar o efeito do pH durante o processo de modificação, eletrodos de pasta de carbono foram pré tratados em solução de guanina $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ a 1,1 V, porém em valores de pH de 4,5, 7,0 e 8,0. Soluções de NADH continuaram sendo usadas para avaliação das características do filme formada. Como pode ser observado na **Figura 3.5**, quando a modificação foi realizada em pH 8,0, os níveis de corrente de oxidação de

NADH foram maiores do que aqueles obtidos com eletrodos modificados em solução de guanina com pH em valores mais baixos.

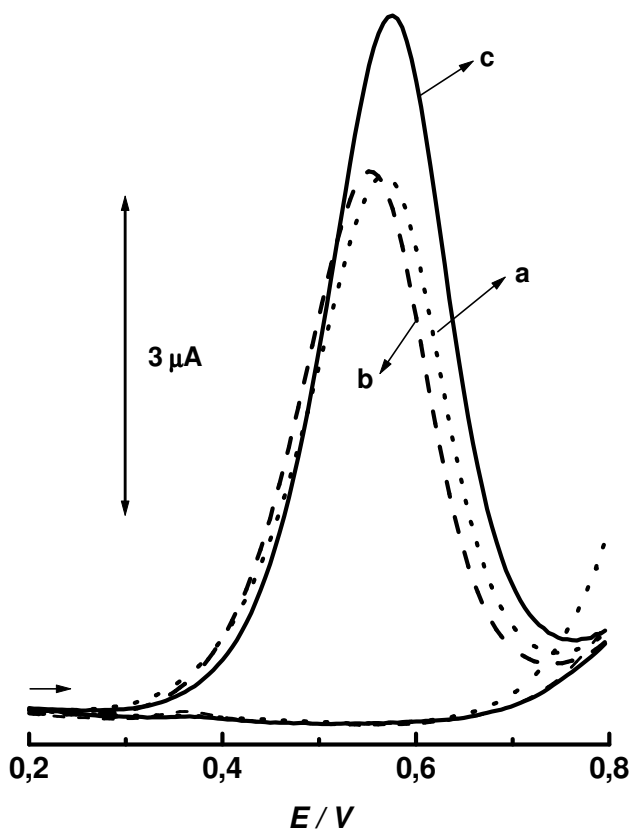


Figura 3.5. VPD registrados em solução de NADH 4.2×10^{-4} mol L⁻¹ em tampão PIPES, pH 7,0 usando: (a) EPC-G pH 4,5; (b) EPC-G pH 7,0 e (c) EPC-G pH 8,0 modificados sob potencial de 1.1 V durante 12 min. Condição experimentais veja **Figura 3.1**.

De acordo com os dados experimentais apresentados, as melhores condições para a modificação do eletrodo de pasta de carbono foram: solução $5,0 \times 10^{-4}$ mol l⁻¹ de guanina, pH 8,0 e potencial aplicado de 1,1 V por um período de 12 minutos. Uma última etapa que deve ser impreterivelmente realizada, após a modificação superficial do eletrodo é a realização de vários voltamogramas de pulso diferencial em solução

tampão até obtenção de linha base estável. Esta etapa garante que a guanina e/ou seus produtos de oxidação, previamente adsorvidos na superfície do eletrodo, sejam incorporados ao filme não interferindo nas medidas analíticas a serem realizadas.

3.1.5. Determinação analítica de NADH, NADPH, 8-oxo-guanina e ácido úrico utilizando EPC e EPC-G, pH 8,0.

Os resultados obtidos foram comparados e apresentados nas **Figuras 3.6, 3.7, 3.8, 3.9 e Tabela V**. As curvas apresentadas na **Figura 3.6 a 3.9**, contêm 14 pontos, referentes a valores crescentes de concentração para cada analito, na faixa de concentração de $7,5 \times 10^{-6} \leq [\text{analito}] \leq 8,1 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Foram realizadas duas curvas analíticas consecutivas, registrando-se três voltamogramas para cada valor de concentração. Os valores de limite de detecção^[116] e sensibilidade foram estimados utilizando a média dos valores de corrente das duas curvas analíticas, restringindo a faixa de concentração $7,5 \times 10^{-6} \leq [\text{analito}] \leq 7,5 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$.

Em suma, foram registrados 84 voltamogramas, usando o mesmo eletrodo modificado para cada analito sem a necessidade de limpeza ou renovação superficial entre o registro das curvas analítica.

Tabela V. Sensibilidade, limite de detecção e variação do potencial de pico de oxidação, obtidos pela média de duas curvas analíticas consecutivas com EPC e EPC-G pH 8,0

Analito	Electrodo	ΔE_p (V)	Sensibilidade ($\text{A mol}^{-1} \text{l cm}^{-2}$)	Limite de detecção ($\text{mol l}^{-1} \text{M} \times 10^{-6}$)
NADH	CPE / G pH 8,0	0.56 – 0.53	0.13 ± 0.04	3.3
	CPE pH 8,0	0.48 – 0.69	0.04 ± 0.01	5.8
NADPH	CPE /G pH 8,0	0.61 – 0.60	0.10 ± 0.01	3.7
	CPE pH 8,0	0.52 – 0.71	0.01 ± 0.01	14
Ácido úrico	CPE /G pH 8,0	0.41 – 0.42	0.26 ± 0.06	6.6
	CPE pH 8,0	0.41 – 0.55	0.13 ± 0.11	13
8-oxo-guanina	CPE / G pH 8,0	0.39 – 0.41	0.40 ± 0.08	2.0
	CPE pH 8,0	0.36 – 0.42	0.36 ± 0.13	3.7

VPD registrados em triplicata em solução tampão PIPES pH 7,0 com sucessivas adições do respectivo analito, na faixa de concentração: $7,5 \times 10^{-6} \leq [\text{analito}] \leq 8,1 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, porém as sensibilidades e os limites de detecções estimados foram calculados pela média dos valores na faixa de concentração de $7,5 \times 10^{-6} \leq [\text{analito}] \leq 7,3 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$.

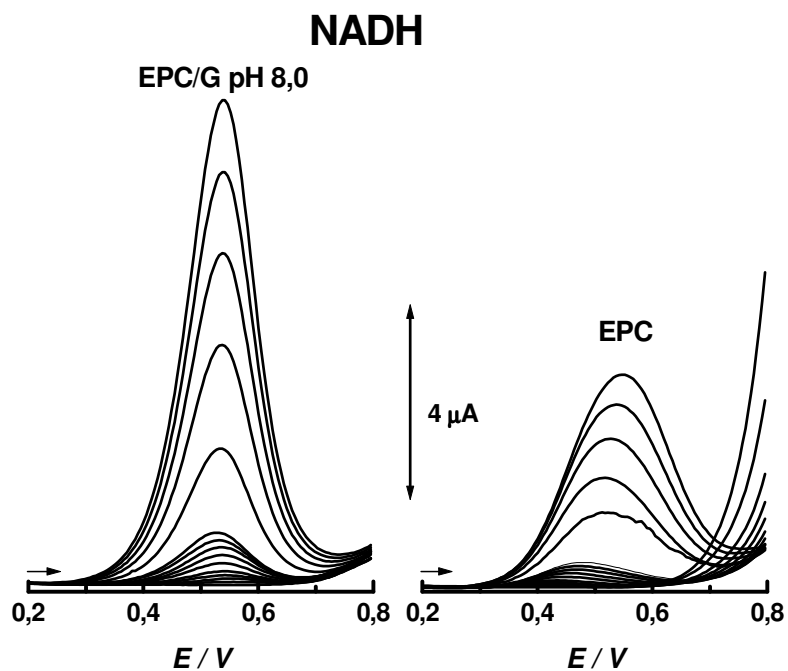


Figura 3.6. VPD registrados com eletrodos **EPC-G pH 8,0** e **EPC** em tampão PIPES, pH 7,0 (branco) e em concentrações crescentes de NADH. Condições experimentais veja a **Figura 3.1**.

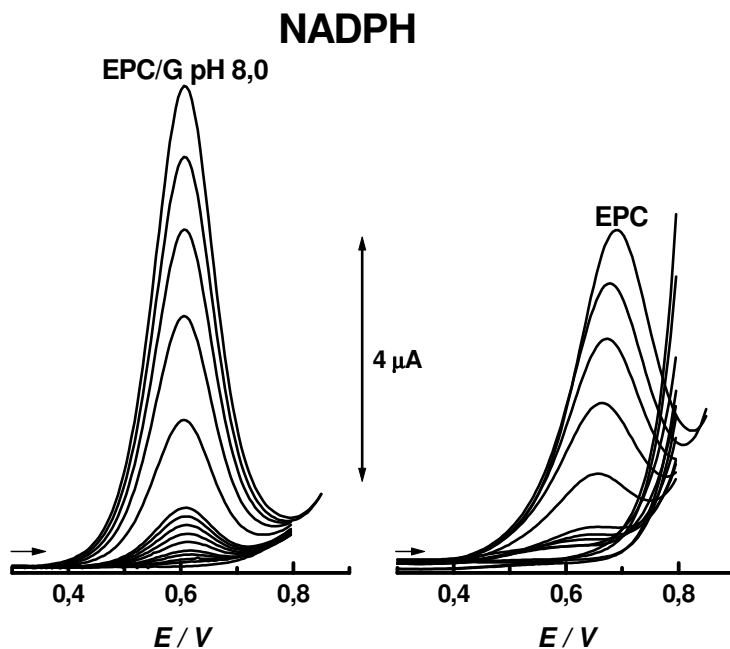


Figura 3.7. VPD registrados com eletrodos **EPC-G pH 8,0** e **EPC** em tampão PIPES, pH 7,0 (branco) e em concentrações crescentes de NADPH. Condições experimentais veja a **Figura 3.1**.

Ácido Úrico

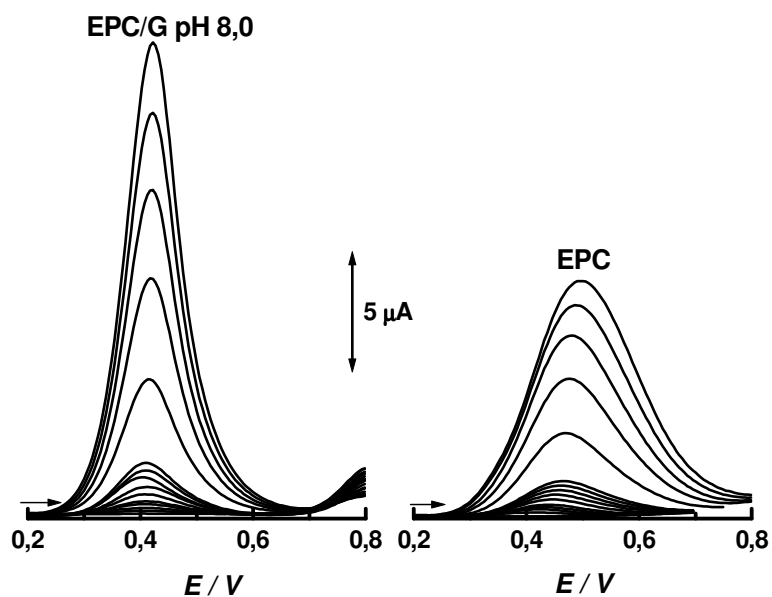


Figura 3.8. VPD registrados com eletrodos **EPC-G pH 8,0 e EPC** em tampão PIPES, pH 7,0 (branco) e em concentrações crescentes de ácido úrico. Condições experimentais veja a **Figura 3.1**.

8-Oxo-Guanina

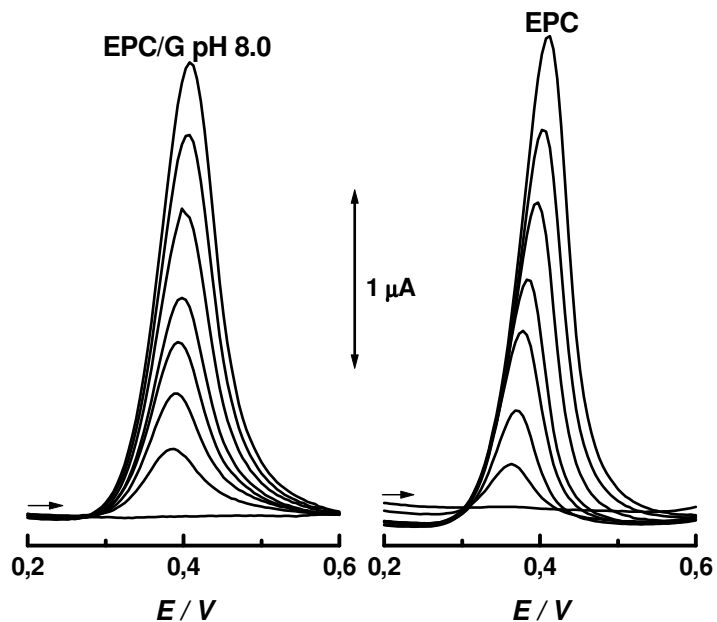


Figura 3.9. VPD registrados com eletrodos **EPC-G pH 8,0 e EPC** em tampão PIPES, pH 7,0 (branco) e em concentrações crescentes de 8-oxo-guanina. Condições experimentais veja a **Figura 3.1**.

Uma larga classe de enzimas desidrogenases dependentes de NAD(P)⁺ podem ser utilizadas na construção de biossensores amperométricos. Isto é possível se um mediador redox apropriado catalisar a transferência do elétron de NAD(P)H à superfície do eletrodo. Diversos compostos foram testados para esta finalidade e eletrodos sólidos modificados com materiais redox catiônicos^[117-123], bem como filmes condutores derivados de poli-*p*-fenilenodiamina^[124], poli (*o*-aminofenol) e poli (*o*-fenilenodiamina)^[125], mostraram bom desempenho para oxidação de NADH, com detecção a baixos potenciais, condições necessárias para se utilizar biossensores em análises de fluidos biológicos, sem a necessidade, do uso de técnicas de separação. Muitas vezes, uma excelente propriedade eletrocatalítica para oxidação de NADH é obtida^[126], mas uma rápida degradação de sinal do co-fator é observada, caso o seu produto de oxidação gerado não for removido. Recentemente, Santos-Álvarez *et al*^[127] determinaram eletrocaliticamente NADH com potencial de oxidação a 50 mV (*vs* Ag/AgCl, KCl_{sat.}), usando eletrodo de grafite modificado com uma espécie de quinona-imina derivada do produto de oxidação do nucleotídeo 2,8-dihidroxiadenina. Medidas analíticas foram feitas com níveis de concentração abaixo de $1,0 \times 10^{-6}$ mol l⁻¹ com limite de detecção estimado em $1,3 \times 10^{-7}$ mol l⁻¹ usando o eletrodo por 100 horas de vida operacional.

Os dados apresentados na **Tabela V** mostram que eletrodos **EPC-G pH 8,0**, ou seja, modificados em solução de guanina, não apresentaram efeito catalítico para oxidação de NAD(P)H, porém a superfície modificada evitou efeitos de envenenamento produzidos pelos produtos de oxidação dos analitos, contribuindo assim, para melhorar a sensibilidade e o limite de detecção na determinação de NAD(P)H, 8-oxo-guanina e ácido úrico. É possível que as estruturas diméricas de guanina evitem a formação de espécie derivadas de 8-oxo-guanina, que em princípio, poderiam apresentar

propriedades catalíticas, como aquelas apresentadas pelos filmes formados por derivados de 2,8-dihidroxi-adenina^[127].

A aplicação deste eletrodo, para projetar novos biossensores, está condicionada a utilização de enzimas (ou outro componente biológico) incorporados junto a pasta de carbono, bem como a preparação similar da superfície modificada na presença de um mediador de elétrons eficiente.

Por outro lado, há diversos estudos biológicos, que são realizados apenas em matrizes complexas, onde só é possível trabalhar com potencial elevado, utilizando, portanto, sensores que tenham um tempo de vida longo. Sob este ponto de vista, nosso sensor é fácil de preparar, tem boa estabilidade e sensibilidade. Além disso, poderia ser usado como um detector eletroquímico (ED) em Cromatografia líquida de alta eficiência.

A quantificação eletroquímica de 8-oxo-guanina —importante por ser o maior produto de degradação das bases do DNA, produzido por danos oxidativos^[128-130]— como também, a quantificação de níveis baixos de ácido úrico nos tecidos do cérebro —que pode relacionar-se à doença de Alzheimer^[131]— são exemplos importantes de problemas analíticos e clínicos a serem resolvidos. Neste caso, a utilização de HPLC com o sensor desenvolvido, utilizado como detector eletroquímico, seria um método apropriado.

3.2. Segunda parte: Eletrodos de grafite pirolítico modificados em solução de dopamina utilizados na determinação de dopamina, ácido ascórbico e ácido úrico

3.2.1. Eletrodos de grafite pirolítico ativados (EGP-Ativado)

Os EGP previamente ativados em NaOH (**EGP-Ativado**) foram utilizados na determinação de AA, DA e AU isoladamente e, numa mistura dos três analitos. A **Figura 3.10** mostra o terceiro voltamograma de pulso diferencial consecutivo realizado em solução isolada de cada um dos analitos, como também em solução contendo a mistura dos mesmos. Quando os voltamogramas foram registrados na presença dos três analitos, houve inibição da oxidação do AA e AU, acompanhada de uma ligeira queda nos níveis de corrente de pico de oxidação da DA.

Estes resultados podem ser explicados em função da limpeza e ativação eletroquímica prévia dos eletrodos de grafite em solução de NaOH. Durante este procedimento, grupos funcionais $-OH$ e $C=O$ são incorporados na superfície do eletrodo de grafite ^[83,99], de modo que esta se encontra com alta densidade de carga negativa. Desde que em pH 6,5, os ácidos ascórbico e úrico encontram-se predominantemente desprotonados ($\alpha = 99,6\%$ e $84,9\%$ respectivamente), estas espécies são repelidas da superfície por exclusão de carga, enquanto a dopamina, predominantemente protonada neste pH ($\alpha = 99,6\%$), é pré-concentrada na superfície do eletrodo. Assim, eletrodos previamente tratados eletroquimicamente em solução de NaOH atraem, preferencialmente, espécies positivamente carregadas, como a dopamina.

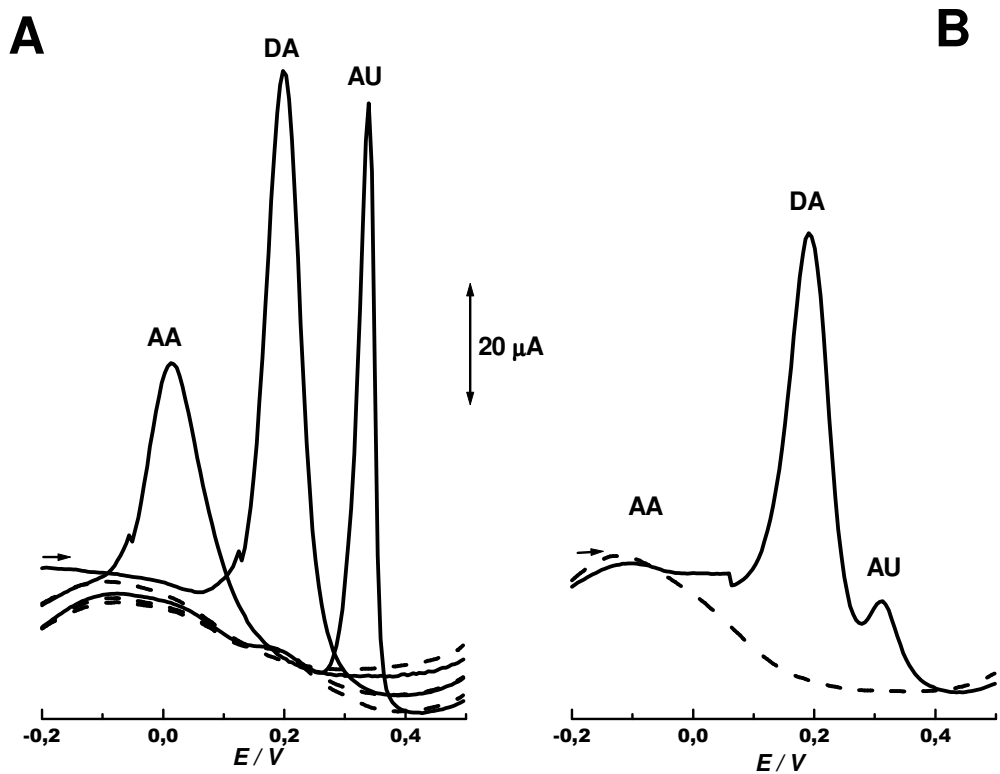


Figura 3.10. Voltamogramas de pulso diferencial registrados em: TF $0,1 \text{ mol l}^{-1}$, pH 6,5 (-----) e em soluções de ácido áscorbico (AA) $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$; Dopamina (DA) $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ e/ou ácido úrico (AU) $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ em TF $0,1 \text{ mol l}^{-1}$, pH 6,5 (—), com eletrodo **EGP-Ativado**; (a) Analitos registrados isoladamente, (b) mistura dos três analitos nas condições indicadas em A. Condições experimentais: amplitude de pulso 50mV, largura do pulso 70 ms e $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

Após a utilização do eletrodo em solução contendo a mistura dos três analitos, efetuou-se a lavagem da superfície do mesmo, com água deionizada e, novos voltamogramas de pulso diferencial foram realizados em solução de eletrólito suporte. Dois picos nítidos de oxidação de DA e AU foram detectados, indicando que os dois analitos ficaram adsorvidos na superfície do eletrodo. Repetindo-se o processo com o objetivo de limpar a superfície, os picos de oxidação de ambos os analitos diminuiriam gradativamente até desaparecer por completo. Após nova adição dos analitos ao

eletrólito suporte, não foi possível detectar nenhum sinal voltamétrico (dados não mostrados). Deste modo, os produtos de oxidação da DA e AU também adsorvem na superfície do eletrodo e, eventualmente, em maior extensão do que os próprios reagentes, bloqueando totalmente a superfície do mesmo, fato este que, também deve igualmente contribuir para o desaparecimento do sinal do AA e diminuição do sinal de oxidação do AU observados na **Figura 3.10.B**.

3.2.2 Eletrodos de grafite pirolítico modificados em solução de dopamina

De acordo com a literatura, eletrodos de carbono podem ser quimicamente modificados com filmes de melanina, formados *in situ*, a partir da eletropolimerização em soluções de L(-)-DOPA (L-B-3,4-dihydroxyphenyl-alanine) [33,132,133]. Assim decidiu-se avaliar a possibilidade de modificar os eletrodos **EGP-ativado** em solução de DA como descrito na seção experimental. Os eletrodos que foram modificados em solução de DA em TF 0,1 mol l⁻¹, pH 10 foram denominados de **EGP-DA 10** e utilizados na determinação simultânea de AA, DA e AU. O voltamograma registrado na solução contendo a mistura dos três analitos é apresentado na **Figura 3.10**.

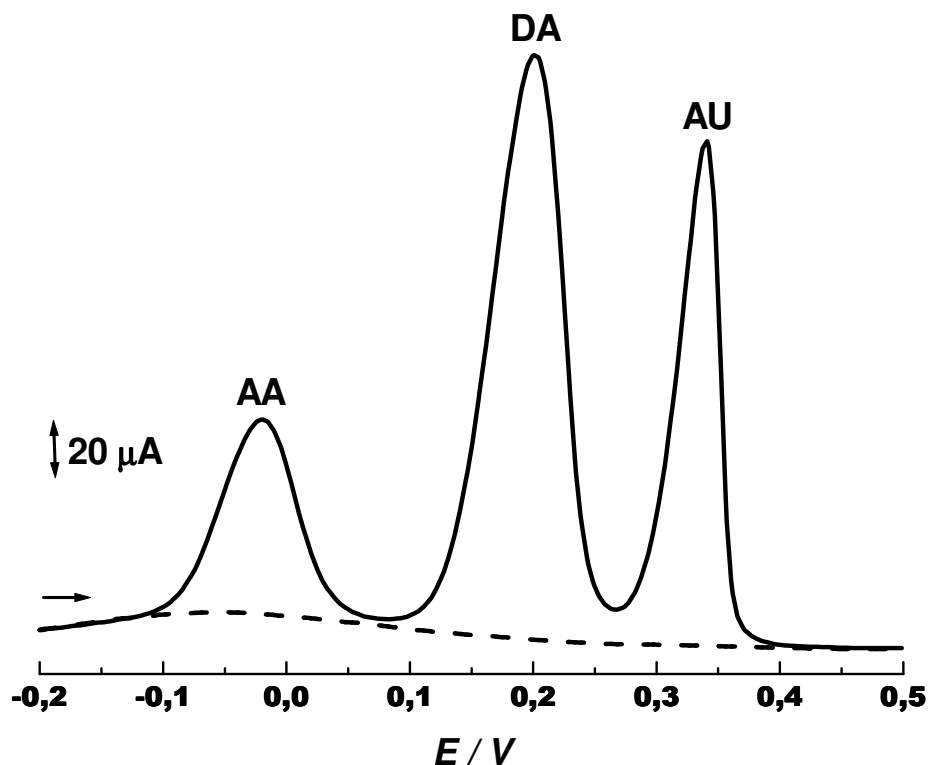


Figura 3.11 Voltamogramas de pulso diferencial registrados em TF pH 6.5 (-----) e em solução contendo simultaneamente ácido ascórbico (AA) $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$; dopamina (DA) $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ e ácido úrico (AU) $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ em tampão fosfato pH 6,5 (—), com eletrodo **EGP-DA 10**. Pré-concentração de 10 s a + 1.5 V, demais condições ver **Figura 10**

Comparando-se os níveis de corrente obtidos com o **EGP-ativado** (figura 3.10 B) com aqueles obtidos com o eletrodo **EGP-DA 10** (Figura 3.11) observa-se que neste último, os níveis de corrente obtidos para oxidação de AU foram 30 vezes superiores, enquanto que para DA o aumento foi de 4 vezes, (Tabela VI). Além disso, o pico de oxidação do AA, ausente quando se utilizou o **EGP-ativado**, foi visivelmente detectado e com altos níveis de corrente. Apesar do deslocamento de potenciais de pico de oxidação da DA e do AU para potenciais mais positivos (cerca de 10 e 30 mV, respectivamente), houve maior resolução na separação dos picos.

Estes resultados indicam que a superfície do eletrodo de grafite pirolítico foi quimicamente modificada, provavelmente, pela obtenção de um filme condutor, que evitou a adsorção dos produtos de oxidação de AU e DA, permitindo a obtenção de picos mais definidos e com maiores correntes anódicas. Diferentemente do filme eletrogerado por Rubianes e Rivas ^[33,133] a partir de DOPAC, que por exclusão de cargas, elimina o pico de oxidação do ácido ascórbico, o filme eletrogerado em solução de DA não só permitiu a oxidação de AA em presença de DA e AU, como apresentou ligeiro efeito catalítico: o ácido ascórbico foi detectado na região negativa de potencial.

Tabela VI. Sinais de corrente e potenciais de pico de oxidação obtidos em solução contendo simultaneamente, ácido ascórbico (AA) $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$, dopamina (DA) $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ e ácido úrico AU $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol l}^{-1}$, pH 6,5 com eletrodos de grafite pirolítico submetidos a diferentes tratamentos eletroquímicos.

Analito	AA		DA		AU	
	Ep (mV)	Ip (μA)	Ep (mV)	Ip (μA)	Ep (mV)	Ip (μA)
EGP-ativado	----	----	+ 191 \pm 0	50 \pm 2	+ 313 \pm 0	5,9 \pm 0,1
EGP-TF 6.5	----	----	+ 196 \pm 0	46 \pm 1	+ 321 \pm 3	10 \pm 0,1
EGP-TF 10	+ 13 \pm 0	24 \pm 1	+ 203 \pm 0	98 \pm 2	+ 335 \pm 0	57 \pm 3
EGP-DA 6.5	+ 6 \pm 2	40 \pm 3	+ 201 \pm 0	111 \pm 4	+ 342 \pm 0	113 \pm 8
EGP-DA 10	-21 \pm 5	74 \pm 2	+ 201 \pm 0	202 \pm 5	+ 339 \pm 3	175 \pm 9

Valores obtidos pela média de seis voltamogramas registrados consecutivamente

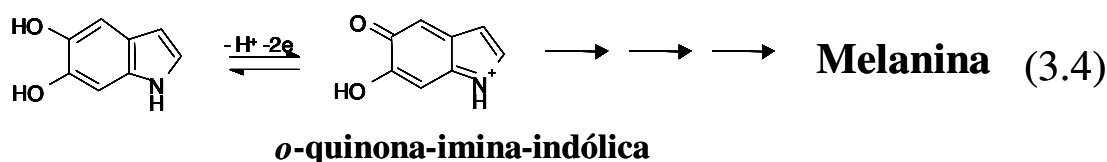
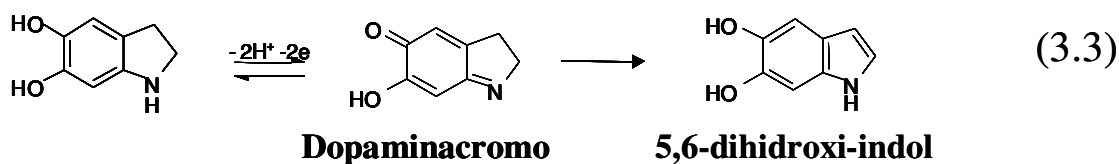
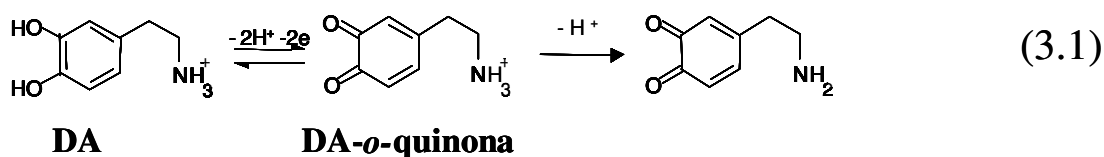
3.2.3 Eletrodos de grafite pirolítico modificados em tampão fosfato

Uma vez que o eletrólito suporte, tampão fosfato, pode contribuir para a obtenção de superfícies modificadas, utilizaram-se para efeito de comparação, soluções modificadoras compostas apenas por **TF**, pHs 6,5 e 10. Assim os **EGP-ativados** foram modificados apenas em solução tampão fosfato e receberam as seguintes denominações, **EGP-TF 6,5** e **EGP-TF 10**. Comparando-se as correntes de oxidação dos analitos, obtidas em eletrodos previamente ativados em NaOH, com aquelas obtidas após modificação do eletrodo em TF pH 6.5 (**EGP-TF 6,5**), observa-se um aumento significativo de corrente apenas para o ácido úrico. Por outro lado, realizando a modificação do eletrodo em tampão fosfato pH 10 (**EGP-TF 10**), o sinal de oxidação do ácido ascórbico passa a ser detectado (**Tabela VI**). É nítido, portanto que o pH do eletrólito influencia no processo de modificação superficial do eletrodo e que a solução de **TF**, pH 10 é o eletrólito mais recomendado.

Com base nestes resultados pode-se inferir que a superfície do eletrodo de grafite pirolítico, previamente ativado, sofre modificação na presença das espécies encontradas no tampão fosfato e que a espécie HPO_4^{2-} ($\alpha = 99\%$ em pH 10) é mais efetiva na modificação superficial do eletrodo, do que a espécie H_2PO_4^- ($\alpha = 84\%$ em pH 6,5). A introdução de DA na solução do eletrólito, antecipa a oxidação do ácido ascórbico em cerca de 35 mV e provoca aumento significativo nos níveis de corrente anódica dos três analitos. Deste modo as espécies HPO_4^{2-} e dopamina parecem ter participação decisiva no processo de modificação superficial.

3.3.4 Formação do filme condutor

A provável composição do filme presente na superfície do eletrodo é um polímero eletrogerado pela oxidação da dopamina e de seus produtos de oxidação. O provável mecanismo para formação deste filme segue as seguintes etapas: a primeira etapa consiste na ativação da superfície de carbono em NaOH, produzindo grupos quinônicos e fenólicos. A segunda etapa consiste na interação entre a superfície do eletrodo e íons HPO_4^{2-} presentes no tampão fosfato, durante a qual os íons fosfatos devem ligar-se à superfície do eletrodo por meio de pontes de hidrogênio. Na terceira etapa, a dopamina é adicionada e o potencial de + 1,5 V é novamente aplicado. Nesta etapa, a dopamina é pré-concentrada e oxidada no eletrodo, com posterior oxidação, onde esta e seus produtos de oxidação formam um filme polimérico condutor. Este, como proposto na literatura^[134], pode ser um filme de melanina formado principalmente pela polimerização oxidativa de 5,6-dihidroxi-indol via quinona-imina e pela intercondensação entre outros intermediários eletrofílicos com outras moléculas percussoras^[135].



Esquema 3.1 – Mecanismo de oxidação da dopamina

Estudos realizados com diversos catecóis ^[134-136] indicam que o mecanismo de polimerização da dopamina, gerando melanina, ocorre via etapas eletroquímicas e químicas, como mostrado no esquema 1. O pH da solução e a aplicação do potencial contribuem para facilitar as etapas eletroquímicas. Primeiramente a dopamina é oxidada a DA-*o*-quinona num processo envolvendo dois prótons e dois elétrons, seguido da desprotonação parcial da etilamina da cadeia lateral (**reação 3.1**). Os íons HPO_4^{2-} presentes na superfície do eletrodo, provavelmente participam da etapa química, via formação de um complexo ativado^[137], favorecendo a ciclização da dopaminaquinona, que origina 5,6 dihidroxi-indolina (**reação 3.2**). Esta espécie é oxidada produzindo uma quinol-imina, a dopaminocromo (**reação 3.3**), que sofre

rearranjo formando 5,6-dihidroxi-indol que é imediatamente oxidado na superfície do eletrodo, formando a *o*-quinona-imina-indólica (**reação 3.4**). O filme condutor de melanina gerado pode ser formado principalmente pela polimerização oxidativa deste último par redox reversível e pela intercondensação de outros intermediários e outras moléculas percussoras, **Esquema 3.1**.

Deste modo se obtém um eletrodo com a superfície quimicamente modificada contendo o par redox dopaminacromo / 5,6-dihidroxi-indolina ou *o*-quinona-imina-indólica / 5,6-dihidroxi-indol. Esta proposta de modificação é corroborada pelo aparecimento e persistência de um par redox nas medidas voltamétricas realizadas apenas em solução de eletrólito suporte, logo após a modificação superficial do eletrodo, **Figura 3.12**.

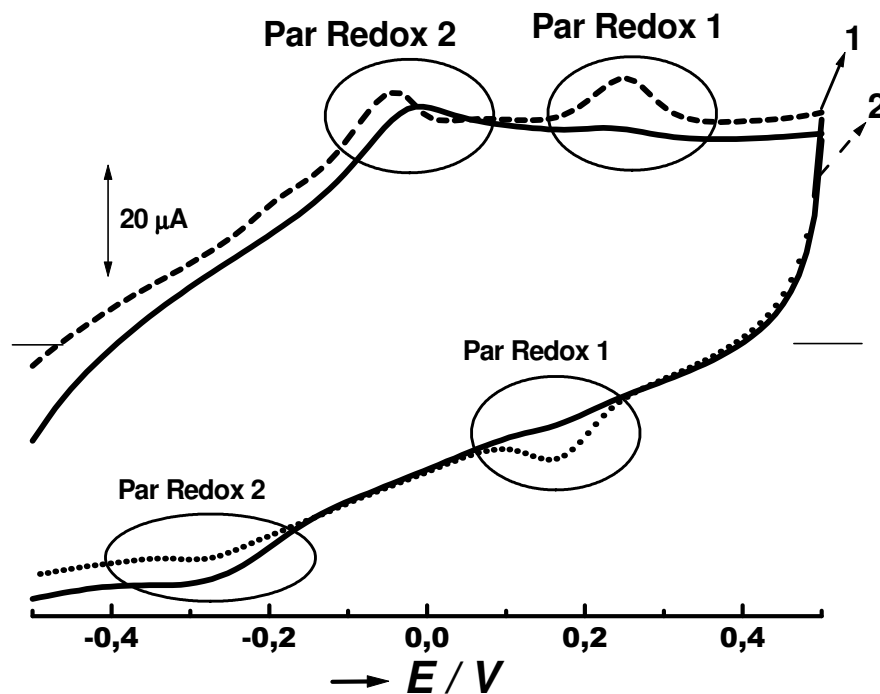


Figura 3.12. Voltamogramas cíclicos registrados em TF $0,1 \text{ mol l}^{-1}$, pH 6,5 com **EGP-DA 10** após modificação: **(1)** sem condicionamento e **(2)** após 10 s de condicionamento a 1,5 V. $E_i = -0,6 \text{ V}$; $E_{inv} = 0,5 \text{ V}$; $E_f = -0,6 \text{ V}$ e $v = 50 \text{ mVs}^{-1}$.

O par redox 1 desaparece após aplicação de 1,5 V no eletrólito suporte, por outro lado, o par redox 2, registrado em regiões menos positivas de potencial permanece imobilizado na superfície do eletrodo em região de potencial típica dos pares quinona / imina.

3.2.5 Determinação simultânea de dopamina e dos ácidos ascórbico e úrico

Eletrodos **EGP-DA 10** foram utilizados na determinação simultânea de AA, DA e AU. Os voltamogramas apresentados na **Figura 3.13.A** foram obtidos após adição de concentrações crescentes de solução de AU ($2,5 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ a $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$) à célula eletroquímica contendo solução de AA $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ e DA $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$, em TF $0,1 \text{ mol l}^{-1}$, pH 6,5.

Para a construção das curvas analíticas, realizaram-se oito adições de solução padrão, registrando-se três voltamogramas consecutivos, após cada adição. Utilizou-se para a construção da curva analítica, o valor mediano de corrente da série em triplicata. Foram obtidas três curvas analíticas consecutivas sem que houvesse necessidade de renovação da superfície do eletrodo. Após o registro de 81 voltamogramas não se observou sobreposição dos picos de oxidação dos três analitos, **Figura 3.13.B**. Resultados semelhantes foram obtidos na construção de curvas analíticas para solução de DA ($1,0 \times 10^{-6} \leq [\text{DA}] \leq 2,0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$), mantendo-se constante a concentração dos interferentes AA ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$) e de AU ($5,0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$) em TF $0,1 \text{ mol l}^{-1}$, pH 6,5 e AA ($2,5 \times 10^{-5} \leq [\text{AA}] \leq 5,0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$), onde as concentrações dos interferentes DA e de AU foram mantidas constantes ($1,0 \times 10^{-4}$ e $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, respectivamente) em TF $0,1 \text{ mol l}^{-1}$, pH 6,5. Os limites de detecção calculados^[116] para AU, AA e DA foram respectivamente de $1,4 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$, $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ e $1,1 \times 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$.

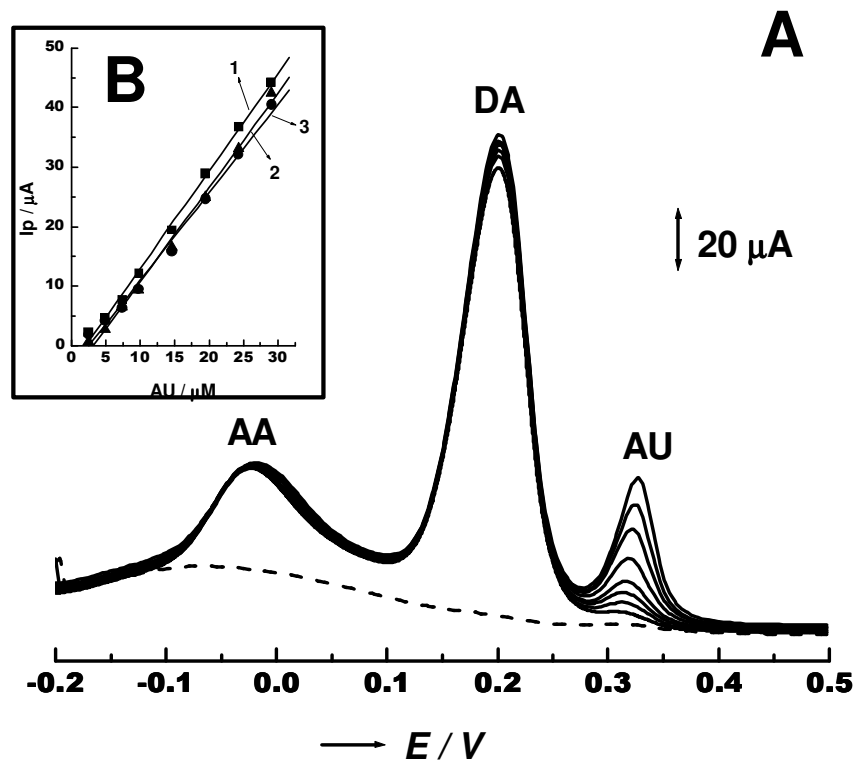


Figura 3.1.3 a) Voltamogramas de pulso diferencial registrados em solução de AA $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$, DA $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ e $2,5 \times 10^{-6} \leq [\text{AU}] \leq 2,0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ em TF pH 6,5, com eletrodo **EGPD 10** para construção de curva analítica. b) Curvas analíticas consecutivas na determinação de AU, monitorando corrente de pico de oxidação *versus* concentração do analito.

3.2.6 Determinação voltamétrica de ácido úrico em amostras de urina, sangue e soro

Os eletrodos **EGP-DA 10** foram utilizados para determinação de ácido úrico em amostras de urina, sangue e soro. Os resultados obtidos para cada amostra bem como aqueles obtidos para os testes de recuperação são apresentados nas **Tabelas VII e VIII**. Decorre dos resultados, que a concentração de AU na urina foi aproximadamente 10 vezes maior do que os valores obtidos em amostras de soro e sangue, estes resultados são concordantes com aqueles obtidos por Aguilar *et al* ^[93]. A concentração de AU determinada em soro sangüíneo foi 4,3 mg dl⁻¹ valor que se encontra em boa concordância com o método oficial (colorimétrico enzimático)

Tabela VII - Determinação de ácido úrico (AU) em amostras de urina, soro e sangue humano diluídas em tampão fosfato 0,1 mol l⁻¹ pH 6,5 utilizando eletrodos EGP-DA 10

Amostra	Diluição em TF (v/v)	Método Voltamétrico AU / mg dl⁻¹	Método Padrão^a AU / mg dl⁻¹
Urina 1	1 : 3000	51 ± 1	--
Urina 2	1 : 3000	57 ± 2	--
Sangue	1 : 500	6.6 ± 0,6	--
Soro	1 : 250	4,1 ± 0,2	4,3

^a Método colorimétrico enzimático realizado pelo Laboratório de Análises Clínicas do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Tabela VIII - Teste de recuperação de ácido úrico (AU) em amostras de urina, soro e sangue humano

Amostra	Adicionado AU / μM	Obtido AU / μM	Recuperação (%)
Urina 1	1.00	1.02	102%
Urina 2	3.30	3.40	103%
Sangue	1.10	1.01	92%
Soro	1.10	1.05	96%

3.2.7 Estudo da interferência de xantina e glicose

Um dos produtos de oxidação eletroquímica da xantina (XA) é o ácido úrico ^[138], que é oxidado voltametricamente a + 0,34 V, **Tabela VI e Figura 3.14.A**. Desde que o método aqui proposto preconiza etapas de pré-concentração a + 1,5 V, a XA representa um interferente em potencial, pois atua como uma fonte de produção eletroquímica de ácido úrico via XA. A fim de verificar se o teor de ácido úrico produzido via oxidação do interferente poderia causar erros apreciáveis na determinação de AU, avaliou-se o sinal voltamétrico deste analito na ausência e presença de XA, **Figura 3.14.B**.

Inicialmente registrou-se o voltamograma em solução contendo AA, DA e AU na janela de potencial de – 0,2 a 0,5 V, após pré-concentração de 10 segundos a 1,5 V, **Figura 3.14.B-(—)**. Em seguida, adicionou-se XA à célula eletroquímica e efetuou-se nova etapa de pré-concentração a 1,5 V registrando-se novo voltamograma (AU é

produzido, via oxidação de XA), **Figura 3.14.B-(---)**, em seguida estendendo-se até o potencial final para 0,8 V, **Figura 3.14.B-(.....)**. Como pode ser visto pelos níveis de corrente obtidos, o ácido úrico produzido via XA interfere muito pouco no sinal quando AU e XA encontram-se em concentrações iguais.

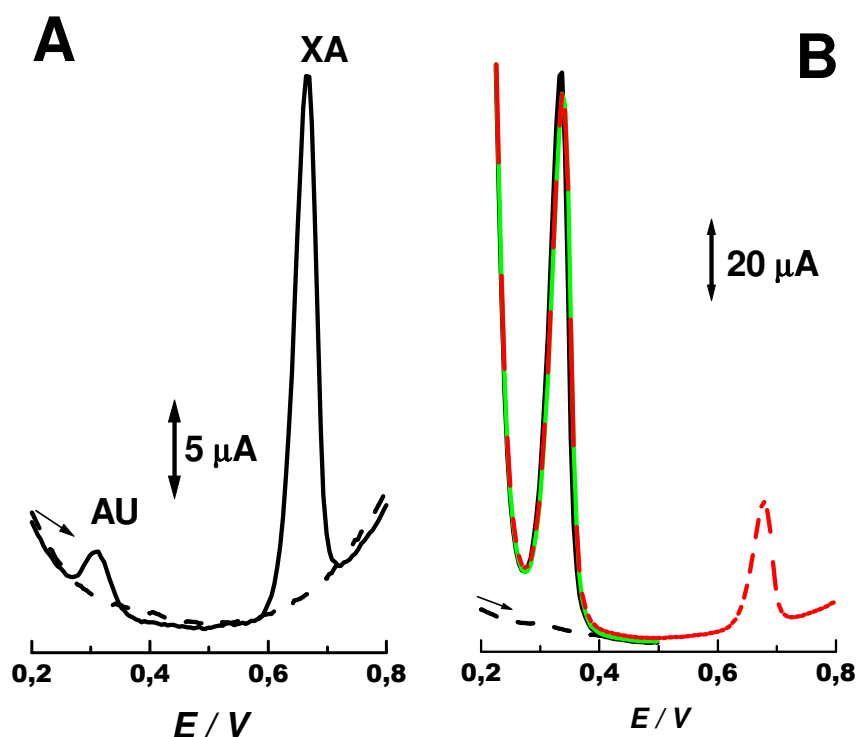


Figura 3.14. Voltamogramas de pulso diferencial registrados com **EGP-DA 10**, em: (A) (----) tampão fosfato pH 6,5, (—) solução de xantina $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ em TF, pH 6,5. (B) (—) solução contendo simultaneamente AA $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$, DA $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ e AU $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ em TF pH 6,5 após 10s de pré-concentração a +1,5 V ($E_{\text{final}} = 0,5\text{V}$; apenas sinal do AU), (---): solução anterior na presença de XA $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ ($E_{\text{final}} = 0,5\text{V}$, sinal do AU inicial + AU gerado eletroquimicamente) e (.....): mesmo que anterior mas com $E_{\text{final}} = 0,8 \text{ V}$ (visualização dos sinais de oxidação do ácido úrico e da XA). Branco em TF $0,1 \text{ mol l}^{-1}$, pH 6,5 (linha pontilhada). Demais condições, vide **Figura 3.10**.

A eventual interferência de glicose foi igualmente avaliada. Em solução contendo $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ de glicose, nenhum sinal de oxidação foi registrado, indicando que o filme formado impede a chegada deste analito à superfície do eletrodo e sua posterior oxidação.

4. CONCLUSÕES

ELETRODOS DE PASTA DE CARBONO PRÉ-TRATADOS EM SOLUÇÃO DE GUANINA, pH 8,0, sob potencial de + 1,1 V (**EPC-G, pH 8,0**) apresentaram melhores resultados para a detecção de NADH, NADPH e ácido úrico, entre eles maior sensibilidade e menor limite de detecção, em relação a eletrodos pré-tratados em tampão universal, pH 8,0, com potencial aplicado de + 1,1 V (**EPC, pH 8,0**), solução de guanina (com potencial aplicado de + 0,4 V) ou modificados em solução de 8-oxo-guanina, (com potencial aplicado de + 0,2 ou 1,1 V),

Ao contrário dos resultados com **EPC**, o potencial de pico para oxidação de NAD(P)H ou ácido úrico com **EPC-G, pH 8,0** não foi deslocado para valores mais positivos após sucessivos voltamogramas. Os altos valores de correntes obtidos podem ser atribuídos a uma camada superficial de dímeros ou trímeros de guanina que deve permitir a pré-concentração dos analitos, além de evitar a adsorção dos produtos de oxidação formados na superfície do eletrodo. Bons resultados foram obtidos com **EPC** para a oxidação de 8-oxo-guanina, provavelmente devido à ausência de adsorção dos produtos da oxidação na superfície do eletrodo sem modificação.

Os **EPC-G, pH 8,0** não apresentaram efeitos eletrocatalíticos, mas apresentaram boa estabilidade e poderiam ser eventualmente utilizados como detectores eletroquímicos acoplados a outras técnicas como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ou análise por injeção em fluxo (FIA).

Assim como os **EPC-G, pH 8,0**, os eletrodos de grafite pirolítico modificados em solução de dopamina, **EGP-D pH 10**, podem ser preparados de modo fácil e rápido. Além disso, o método para obtenção de **EGP-D pH 10** é reprodutível e atrativo, uma vez que os reagentes necessários são exatamente os mesmos que seriam utilizados para determinação do analito, por qualquer outro método escolhido.

A composição do filme eletrogerado em solução de DA difere do filme melanina-DOPAC, descrito por Rubianes e Rivas ^[33,133], uma vez que o filme não inibe a oxidação de espécies como ascorbato e ureato.

A metodologia aqui descrita permitiu a determinação simultânea de AU, DA e AA, sem a necessidade do uso conjunto de técnicas de separação. Os limites de detecção calculados foram de $1,1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, $1,4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para DA, AU e AA, respectivamente. Dessa forma, portanto, foi possível efetuar a determinação de ácido úrico em amostras de sangue, soro e urina, com os resultados apresentando boa concordância com aqueles obtidos pelo método colorimétrico - enzimático oficial.

4. Perspectivas Futuras

As moléculas biológicas empregadas como agentes modificadores, bem como os métodos de modificação aqui descritos, permitem o emprego de outros materiais de eletrodos que podem apresentar resultados e aplicações até mais interessantes do que as aqui apresentadas. Dos materiais eletródicos disponíveis, os nanotubos de carbono de parede múltipla são aqueles que mais despertam interesse, não só pela dimensão, mas também pela possibilidade de efetuar imobilização dos compostos de interesse entre as diversas paredes que compõem a estrutura do material.

Suportar a estrutura de nanotubos sobre transdutores constituídos de filmes de diamante dopado com boro nos parece ainda mais viável do que fazê-lo sobre carbono vítreo, por exemplo, uma vez que a ampla janela de trabalho e as baixas correntes de fundo do diamante, devem fornecer ao conjunto como um todo, características muito interessantes para aplicações analíticas.

A partir dos resultados obtidos nesta Dissertação, pretende-se agora imobilizar não só a guanina na superfície dos nanotubos, mas também as demais bases do DNA, e estudar a interação entre compostos biológicos e/ou poluentes ambientais com cada uma das bases imobilizadas, de modo a mapear o sítio de maior probabilidade de interação do composto biológico ou poluente com a molécula do ácido desoxirribonucléico, DNA. Para isso, a modificação superficial em solução de cada uma das bases deve ser feita em potencial inferior ao potencial de oxidação, de modo a garantir a integridade da base evitando assim a formação de filmes poliméricos, como os obtidos ao longo deste trabalho. Seguir a interação não será tarefa difícil uma vez que, pretende-se utilizar compostos capazes de gerar, por redução ou oxidação, radicais livres aniônicos ou catiônicos que podem ceder ou abstrair elétrons das bases imobilizadas na superfície do eletrodo ou ainda, formar adutos com as mesmas. A

formação de intermediários eletroativos permitirá então acompanhar a interação desejada.

Já os resultados obtidos com superfícies modificadas em solução de dopamina abrem a perspectiva de empregar estas mesmas superfícies para a determinação simultânea de diversos neurotransmissores (dopamina, noradrenalina, serotonina) e outros compostos, cujos potenciais de oxidação são relativamente próximos e os produtos, sabidamente causam envenenamento superficial em eletrodos limpos.

REFERÊNCIAS

- [01]** ÖZKAN, S. A.; USLU, B.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Analysis of pharmaceuticals and biological fluids using modern electroanalytical techniques. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* . v. 33, n. 3, p. 155-181, 2003.
- [02]** BAREK, J.; FOGG A. G.; MUCK, A.; ZIMA, J. Polarography and voltammetry at mercury electrodes. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* v. 31, n. 4, p.291-309, 2001.
- [03]** STRADIOTTO, N. R.; YAMANAKA, H.; ZANONI, M. V. B. Electrochemical sensors: a powerful toll in analytical chemistry. *J. Braz. Chem. Soc.* v.14, n. 2, p.159-173, 2003.
- [04]** MARINO, A; BRAJTER-TOTH, A. Ionic surfactants a molecular spacers ay graphite electrodes. *Analytical Chemistry*. v. 65, p. 370-374, 1993.
- [05]** VENTON, B. J; TROYER, K. P; WIGHTMAN, R. M. Response times of carbon fiber microelectrodes to dynamic changes in catecholamine concentration. *Anal. Chem.* v. 74, p. 539-546, 2002.
- [06]** BEILBY A. L; SASAKI, T. A; STERN H. M. Electrochemical Pretreatment of carbon electrodes as a function of potential, ph, and time. *Analytical Chemistry*. v. 67, p. 976-980, 1995.
- [07]** KEPLEY, L. J.; BARD, A. J. Ellipsometric, electrochemical, and elemental characterization of the surface phase produced on glassy carbon electrodes by electrochemical activation. *Analytical Chemistry*. v. 60, p. 459-1467, 1988.
- [08]** FAGAN, D. T.; HU, I-F.; KUWANA, T. Vaccum heat treatment for activation of glassy carbon electrodes. *Anal. Chem.* v. 57, p. 2759-2763, 1985.
- [09]** ANJO, D. M.; KAHR, M.; KHODABAKHSH, M. M.; NOWINSKI, S.; WANGER, M. Electrochemical Activation of carbon electrodes in base: minimization of dopamine adsorption and electrode. *Anal. Chem.* v. 61, p. 2603-2608, 1989.
- [10]** COX, J. A.; JAWORSKI, R. K.; KULESZA, P. J. Eletroanalysis with electrodes modified by organic films. *Electroanalysis*. v. 3, p. 869-877, 1991.
- [11]** LAWRENCE, N. S.; BECKETT, E. L.; DAVIS J.; COMPTON, R. G. Advances in the voltammetric analysis of small biologically relevant compounds. *Analytical Biochemistry*. v. 303, p. 1-16, 2002.
- [12]** PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. S.; KUBOTA, L. T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. *Química Nova*. v. 25, n. 6, p.1012-1021, 2002.
- [13]** ZEN, J-M.; KUMAR, A. S.; TSAI, D-M. Recent updates of chemically modified electrodes in analytical chemistry. *Electroanalysis*. v.15, n. 13, p.1073-1087, 2003.

- [14] Freire, R. S.; Pessoa, C. A.; Kubota, L. T. Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. *Química Nova*. v. 26, n. 3, p. 381-389, 2003.
- [15] WALCARIUS, A. Zeolite-modified electrodes: analytical applications and prospects. *Electroanalysis*. v. 8, n. 11, p. 971-986, 1996.
- [16] PONTIÉ, M.; GOBIN, C.; PAUपोर्टÉ, T.; BEDIQUI, F.; DEVYNCK, J. Electrochemical nitric oxide microsensors: sensitivity and selectivity characterization. *Anal. Chim. Acta*. v. 411, p. 175-185, 2000.
- [17] ZEN, J-M.; CHEN, I-L.; SHIH, Y. Voltammetric determination of serotonin in human blood using a chemically modified electrode. *Anal. Chim. Acta*. v. 369, p.103-108, 1998.
- [18] GERARD, M.; CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. D. Application of conducting polymers to biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*. v.17, p. 345-359, 2002.
- [19] BRETT A. M. O.; SERRANO, S. H. P.; MACEDO T. A.; RAIMUNDO, D.; MARQUES, M. H.; LA-SCALAE M. A. Electrochemical determination of carboplatin serum using a DNA-modified glassy carbon electrode. *Electroanalysis*. v. 8, n. 11, p. 992-995, 1996.
- [20] DANTONI, P.; SERRANO, S. H. P.; Brett, A. M. O.; GUTZ, I. G. R. Flow-injection determination of catechol with a new tyrosinase/DNA biosensor *Anal.Chim. Acta*, 366, 137 - 145 (1998).
- [21] BRETT, A. M. O.; SERRANO, S. H. P.; GUTZ, I. G. R.; LA-SCALAE M. A.; CRUZ, M. L. Voltammetric behavior of a nitromidazoles at a DNA-biosensor. *Electroanalysis*. v. 9, n. 14, p. 1132-1137, 1997.
- [22] DRYHURST, G.; PACE, G. F. Electrochemical oxidation of guanine at the pyrolytic graphite electrode. *Polycrystalline Platinum Electrode*. v. 117, n. 10, p. 1259-1264,1970.
- [23] Brajter-Toth, A.; Goyal R. N.; Wrona, M. Z.; Lavaca, T.; Dryhurst, G. Electrochemical and enzymic oxidation of biological purines. *Bioelectrochem and Bioenerg.*, v. 8, p. 413-435, 1981.
- [24] STEENKEN, S. Purine bases, nucleosides, and nucleotides: aqueous solution redox chemistry and transformation reactions of their radical cations and e⁻ and OH adducts. *Chem Rev*. v. 89, p. 503-520, 1989.
- [25] SILVA, R. P.; SERRANO, S. H. P. Electrochemical oxidation of biological molecules at carbon paste electrodes pre-treated in guanine solutions. *J. of Pharm. and Biom. Anal.* v. 33, p. 735-744, 2003.

- [26] ENGSTROM, R.C.; STRASSER, V.A. spatial-resolution of electrode heterogeneity using iontophoresis. *Anal. Chem.*, **56**, 890 – 894 (1984).
- [27] KATEKAWA, E.; MAXIMILIANO F.; RODRIGUES L. L.; DELBEM, M. F.; SERRANO, S. H. P. Electrochemical oxidation of NADH at a bare glassy carbon electrode em different supporting electrolytes. *Anal. Chim. Acta.* v. 385, p. 342–352, 1999.
- [28] ÁLVAREZ, N. S.; ORTEA, P. M.; PAÑEDA, A. M.; CASTAÑÓN, M. J. L.; ORDIERES, A. J. M; TUÑÓN-BLANCO, P. A comparative study of different adenine derivatives for the electrocatalytic oxidation of β -nicotinamide adenine dinucleotide. *J. Electroanal. Chem.* v. 502, p. 109-117, 2001.
- [29] SUBRAMANIAN, P.; DRYHURST, G. Electrochemical oxidation of guanosine formation of some novel guanine oligonucleosides. *J. Electroanal. Chem.* v. 224, p. 137-162, 1987.
- [30] FEI, J. J.; LUO, L. M.; HU, S. S.; GAO, Z. Q. Amperometric determination of ascorbic acid at a electrodeposited redox polymer film modified gold electrode. *Electroanalysis.* v. 16, n. 4, p. 319-323, 2004.
- [31] ÁLVAREZ, P. S.; CASTAÑÓN, M. J. L.; ORDIERES, A. J. M.; TUÑÓN-BLANCO, P. Electrochemistry of nucleic acids at solid electrodes and its applications. *Electroanalysis.* v. 16, n.15, p.1193-1203, 2004.
- [32] GAO, Z.; SIOW, K. S.; NG, A.; ZHANG, Y. Determination of ascorbic acid in a mixture of ascorbic acid and uric acid at a chemically modified electrode. *Anal. Chim. Acta.* v. 343, p.49-57, 1997.
- [33] RUBIANES, M. D.; RIVAS, G. Amperometric quantification of dopamine using different carbon electrodes modified with a melanin-type polymer. *Anal. Letters* v. 36, n. 2, p.329-345, 2003.
- [34] BARHAM, D.; TRINDER, P. An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. *Analyst.* v. 97, p. 142-145, 1972.
- [35] FOSSATI, P; PRENCIPE, L; BERTI, G. Use of 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid-4-aminophenazone chromogenic system in direct enzymic assay of uric-acid in serum and urine. *Clin. Chem.* 26 (2), 227-231 (1980).
- [36] THEFELD, W; HOFFMEIS.H; BUSCH, EW; KOLLER, PU; VOLLMAR, J. Normal values of serum uric-acid determined by a new enzymatic uric-acid color test and related to age and sex. *Dtsch. Méd. Wschr.* 98, 380 - 384 (1973).
- [37] DRYHURST, G. *Electrochemistry of Biological Molecules*. New York: Academic Press, 1977.

- [38] CHIORCEA, A. M.; BRETT, A. M. O. AFM of guanine adsorbed on hopg under electrochemical control. *Scanning probe Microscopy: Characterization, Nanofabrication and Device Application of Functional Materials*. Netherlands: Academic Publishers, 2005. p. 467-473.
- [39] HARPER, H. A. *Review of Physiological Chemistry*. 13th ed. Los Altos, CA: Lange Medical Publications, 1977. 406p.
- [40] JACOBS, DAVID S. (editor-in-chief) [et al.]. *Laboratory Test Handbook*. 4th ed. New York: Lexi-Comp Inc., 1996.
- [41] Wikipédia a enciclopédia livre, Dopamina. Acesso em 16 de junho de 2007. Disponível em <http://med.javeriana.edu.co/fisiologia/fw/c561.htm>
- [42] VOET, D.; VOET, J. G. *Biochemistry*. 2nd ed. New York: J. Wiley & Sons, 1995, p. 24.
- [43] MALINAUSKAS, A.; GARJONYTĖ, R.; MAŽEIKIENĖ, R.; JUREVIČIŪTĖ, I. Electrochemical response of ascorbic acid at conducting and electrogenerated polymer modified electrodes for electroanalytical applications: a review. *Talanta*. v. 64, p. 121-129, 2004.
- [44] DILIBERTO EJ JR, DANIELS AJ, VIVEROS OH. Multicompartmental secretion of ascorbate and its dual role in dopamine B-hydroxylation. *Am J Clin Nutr* 54:S1163-S1172, 1991.
- [45] FOJTA, M. Electrochemical sensors for DNA interactions and damage. *Electroanalysis*. v. 9, n. 21, p. 1449-1463, 2002.
- [46] BRETT A. M. O.; VIVIAN M.; FERNANDES I. R.; PIEDADE, J. A. P. Electrochemical detection of in situ adriamycin oxidative damage to DNA. *Talanta*. v. 56, p. 959-970, 2002.
- [47] BRETT A. M. O.; DICULESCU, V. C. Electrochemical study of quercetin-DNA interactions Part. II. In situ sensing with DNA biosensors. *Bioelectrochemistry*. v. 64, p. 143-150, 2004.
- [48] MELLO, L. M.; HERNANDEZ, S.; MARRAZZA, G.; MASCINI, M.; KUBOTA, L. T. Investigations of the antioxidant properties of plant extracts using a DNA-electrochemical biosensor. *Biosensors & Bioelectronics*. v. 21, p. 1374-1382, 2006.
- [49] BRETT A. M. O.; SERRANO, S. H. P.; GUTZ, I. G. R.; LA-SCALAE M. A. Electrochemical reduction of metronidazole at a DNA-modified glassy carbon electrode. *Bioelectrochem and Bioenerg*. v. 42, p. 175, 1997.
- [50] BRETT A. M. O.; SERRANO, S. H. P. DNA modified electrodes. *Portugalia e Eletrochimica Acta*. v. 13, p. 467-470, 1995.

- [51] KORBUT, O.; BUČKOVÁ, M.; LABUDA, J.; GRÜNDLER, P. Voltammetric detection of antioxidante properties of flavonoids using electrically heated DNA modified carbon paste electrode. *Sensors*, v. 3, p. 1-10, 2003.
- [52] JIANG, X.; LIN, X. Overoxidized polypyrrole film direcyted DNA immobilization for construction of electrochemical micro-biosensors and simultaneous determination of serotonin and dopamine. *Anal. Chim Acta*. v. 537, p. 145-151, 2005.
- [53] BRETT A. M. O.; SERRANO, S. H. P.; PIEDADE, J. A. P. *Compreensive Chemical Kinetics*. Oxford: Oxford University Press, em impressão, 1999. v. 37 cap.. 3, p.91-119.
- [54] ÁLVAREZ, P. S.; CASTAÑÓN. M. J. L.; ORDIERES, A. J. M.; TUÑÓN-BLANCO, P. Current strategies for electrochemical detection of DNA with solid electrodes. *Anal. Biochem. Chem*. v. 378, p. 104-118, 2004.
- [55] LA-SCALAE M. A.; SERRANO, S. H. P., GUTZ, I. G. R. eletrodos modificados com DNA: uma nova alternativa em eletroanálise. *Química Nova*, v. 22, n. 3, p. 417 – 422, 1999.
- [56] YANG, W.; AUCIELLO, O.; BUTLER, J. E.; CAI, W.; CARLISLE, J. A.; GERBI, J. E.; GRUEN, D. M.; KNICKERBOCCKER, T.; LASSETER, T. L.; RUSSELL JR., J. N.; SMITH, L. M.; HAMERS, R. J. DNA-modified nanocrystalline diamond thin-films as stable, biologically substrates. *Nature Materials*. v.1, p. 253–257, 2002.
- [57] YE, Y.; JU, H. DNA electrochemical behaviours, recognitions and sensing by combining with PCR technique. *Sensors*. v. 3, p. 128-145, 2003.
- [58] DRYHURST, G.; ELVING, P. J. Electrochemical oxidation-reduction paths for pyrimidine, cytosine, purine and adenine: correlation and application. *Talanta*. v. 16, p. 855-874, 1969.
- [59] PALECEK, E. Polarography of bio-polymers *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 8 (4), 469 – 477, 1981.
- [60] VALENTA, P.; NÜRNBERG, H. W. J. Electrochemical behaviour of natural and biosynthetic polynucleotides at the mercury electrode: part II. Reduction of denatured DNA at stationary and dropping mercury electrodes. *Electroanal. Chem*. v. 49, p. 55-75, 1974.
- [61] PALECEK, E. Oscillographic polarography of highly polymerized deoxyribonucleic acid. *Nature*. v. 188, p. 656, 1960.
- [62] PALECEK, E. Oscillographic polarography of deoxyribonucleic acid degradation products. *Biochim. Biophys. Acta*, 51, 1 - & (1961).

- [63] PALECEK, E.; JELEN, F.; TRNKOVÁ, L. Cyclic voltammetry of dna at a mercury-electrode - an anodic peak specific for guanine. *Gen Physiol. Biophys.*, 5, 315 - 329 (1986).
- [64] JELEN, F.; PALECEK, E. Chemically reversible electroreduction of guanine in a polynucleotide chain. *Biophys. Chem.*, 24 (3), 285 - 290 (1986).
- [65] CANTAROW, A.; SCHEPARTZ, B. *Biochemistry*. Philadelphia: Saunders, 1957. p. 744 e 778.
- [66] HARRISON, G. A. *Chemical Methods in Clinical Medicine*. London: Churchill, 1947. p. 292
- [67] FALAT, L.; CHENG, H. Y. Voltammetric differentiation of ascorbic acid and dopamine at an electrochemically treated graphite/epoxy electrode. *Anal. Chem.* v. 54, p. 2108-2031, 1982.
- [68] ERNST, H.; KNOLL, M. Chemically reversible electroreduction of guanine in a polynucleotide chain. *Anal. Chim. Acta* 449 (1-2), 129-134, 2001.
- [69] SALIMI, A.; ALIZADEH, V.; COMPTON R. G. Disposable amperometric sensor for neurotransmitters based on screen-printed electrodes modified with a thin iridium oxide film. *Analytical Sciences*. v. 21, p.1275-1280, 2005.
- [70] CHEN, J. C.; CHUNG, H. H.; HSU, C. T; TSAI, D.M.; KUMAR, A. S.; ZEN, J. M. A disposable single-use electrochemical sensor for the detection of uric acid in human whole blood. *Sensor and Actuators B*. v. 110, p. 364-369, 2002.
- [71] O'NEIL, R. Long-term monitoring of brain dopamine metabolism *in vivo* with carbon paste electrodes. *Sensors*. v. 5, p.317-342, 2005.
- [72] HUANG, W-H.; PANG, D-W.; TONG, H.; WANG, Z-L.; CHENG, J-K. A method for the fabrication of low-noise carbon fiber nanoelectrodes. *Analytical Chemistry*. v. 73, n. 5, p. 1048-1052, 2001.
- [73] BROWN, F. O.; LOWRY, J. P. Microelectrochemical sensors for *in vivo* brain analysis: an investigation of procedures for modifying Pt electrodes using Nafion. *Analyst*. v. 128, p. 700-705, 2003.
- [74] MASON, P. A.; DEV, B. R.; FREED, C. R. Ascorbic acid concentration in the lateral hypothalamus is related to plasma osmolality. *Brain Research Bulletin*. v. 37, n. 3, p. 305-309, 1995.
- [75] ZHANG, S.; XU, Q.; ZHANG, W.; JIN, L.; JIN, J-Y. *In vivo* monitoring of the monoamine neurotransmitters in rat brain using microdialysis sampling with liquid chromatography electrochemical detection. *Analytica Chimica Acta*. v. 427, p. 45-53, 2001.

- [76] ZHANG, W.; WAN, F.; XIE, Y.; GU, J.; WANG, J.; YAMAMOTO, K.; JIN, L. Amperometric determination of (R)-salsolinol, (R)-N-methylsalsolinol and monoamine neurotransmitters with liquid chromatography using functionalized multi-wall carbon nanotube modified electrode in Parkinson's patient's cerebrospinal fluid. *Analytica Chimica Acta*. v. 512, p. 207-214, 2004.
- [77] WANG, H-S.; LI, T-H.; JIA, W-L.; XU, H-Y. Highly selective and sensitive determination of dopamine using a nafion/carbon nanotubes coated poly(3-methylthiophene) modified electrode. *Biosensors and bioelectronics*. n. 22, p. 664-669, 2006.
- [78] ZEN, J-M.; HSU, C-T.; HSU, Y-L.; SUE, J-W.; CONTE, E. D. Voltammetric peak separation of dopamine from uric acid in the presence of ascorbic acid at greater than ambient solution temperatures. *Anal. Chem.* v. 76, p. 4251-4255, 2004.
- [79] MATOS, R. C.; AUGELLI, M. A.; LAGO, C. L.; ANGNES, L. Flow injection analysis-amperometric determination of ascorbic acids in urine arrays of gold microelectrodes modified by electrodeposition of palladium. *Anal. Chim. Acta*. v. 404, p. 151-157, 2000.
- [80] MATOS, L.; ANGNES, L.; ARAÚJO, C. U.; SALDANHA, T. C. B. Modified microelectrodes and multivariate calibration for flow injection amperometric simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, epinephrine and dipirone. *Analyst*. v. 125, p. 2011-2015, 2000.
- [81] NAKAZATO, T., AKIYAMA A. High-speed voltammetry: dual measurement of dopamine and serotonin. *J. of Neuroscience Methods*. v. 89, p. 105-110, 1999.
- [82] HSUEH, C. C.; BRAVO, R.; JARAMILLO, A. J.; BRAJTER-TOTH, A. Surface and kinetic enhancement of selectivity in analysis with fast scan voltammetry at scan rates above 1000 V/s. *Anal. Chim. Acta*. v. 349, p. 67-76, 1997.
- [83] NOWALL, W. B.; KUHR, W. G. Electrocatalytic surface for the oxidation of NADH and other anionic molecules of biological significance. *Anal. Chem.* v. 67, p. 3553-3588, 1995.
- [84] XIAO, L.; CHEN, J.; CHA, C-S. Elimination of the interference of ascorbic acid in the amperometric detection of biomolecules in body fluid samples and the simple detection of uric acid in human serum and urine by using the powder microelectrode technique. *J. of Electroanal. Chem.* v. 495, p. 27-35, 2000.
- [85] SHIN, D.; SARADA, B. V.; TRYK, D. A.; FUJISHIMA, A. Application of diamond microelectrodes for end-column electrochemical detection in capillary electrophoresis *Anal. Chem.* v. 75, p. 530-534, 2003.
- [86] VANDAVEER, W. R.; WOODWARD, D. J.; FRITSH, D. A.; FUJISHIMA, A. Redox cycling measurements of a model compound and dopamine in ultrasmall volumes with a self-contained microcavity device. *Electrochim. Acta*. v. 73, p. 530-534, 2003.

- [87] MALEN, F.; MANDLER D. Self-assembled monolayers in electroanalytical chemistry: application of ω -mercapto carboxylic acid monolayers for the electrochemical detection of dopamine in the presence of a high concentration of ascorbic acid. *Anal. Chem.* v. 55, p. 37-41, 1993.
- [88] LIU, Z.; LI, J.; DONG S.; WANG, E. Improvements in the selectivity of electrochemical detectors for liquid chromatography and flow injection analysis using the self-assembled n-alkanethiol monolayer-modified au electrode. *Anal. Chem.* v. 68, p. 2432-2436, 1996.
- [89] RAJ, C. R.; OHSAKA, T. Voltammetric detection of uric acid in the presence of ascorbic acid at a gold electrode modified with a self-assembled monolayer of heteroaromatic thiol. *J. Electroanal. Chem.* v. 540, p. 69-77, 2003.
- [90] AGUILAR, R.; DÁVILA, M. M.; ELIZALDE, M. P.; MATTUSCH, J.; WENRICH R. Capability of a carbon-polyvinylchloride composite electrode for the detection of dopamine, ascorbic acid and uric acid. *Electrochimica Acta.* v. 49, p. 851-859, 2004.
- [91] WANG, J.; LI, M.; SHI, Z.; LI, Z.; GU, Z. Investigation of the electrocatalytic behavior of single-wall carbon nanotube films on an AU electrode. *Microchem. Journal.* v. 73, p. 530-534, 2003.
- [92] YE, J-S.; WEN, Y.; ZHANG, W. D.; GAN L. M.; XU G. Q.; SHEU, F-S. Selective voltammetric detection of acid uric in the presence of ascorbic acid at well-aligned carbon nanotube electrode. *Electroanalysis.* v. 15, n. 21, p. 1693-1698, 2003.
- [93] SUN, Y.; FEI, J.; WU, K.; HU, S. Simultaneous electrochemical determination of xanthine and uric acid at a nanoparticle film electrode. *Anal. Bioanal. Chem.* v. 375, p. 544-549, 2003.
- [94] WU, K.; HU, S. Electrochemical study and selective determination of dopamine at a multi-wall carbon nanotube-nafion film coated glassy carbon electrode. *Microchim. Acta.* v. 144, p. 131-137, 2004.
- [95] Zen, J-M.; Chen P-J. A selective voltammetric method for uric acid and dopamine detection using clay-modified electrodes. *Anal. Chem.* (69), 5067-5093, 1997.
- [96] ROVER JÚNIOR, L.; FERNANDES, J. C B.; OLIVEIRA NETO, G.; KUBOTA, L. T. Development of a new FIA-potentiometric sensor for dopamine based on EVA-cooper(II) ions. *J. Electroanal. Chem.* v. 481, p. 34-41, 2000.
- [97] SOTOMAYOR, M. P. T.; TANAKA, A. A.; KUBOTA, L. T. Development of an amperometric sensor highly selective for dopamine and analogous compounds determination using bis(2,2'-bipyridil) cooper(II) chloride complex. *Electroanalysis.* v. 15, n. 9, p. 787-796, 2003.

[98] ANGNES, L.; AZEVEDO, C. M. N.; ARAKI, K.; TOMA, H. E. Electrochemical detection of NADH and dopamine in flow analysis based on tetra-ruthenated porphyrin modified electrodes. *Anal. Chim. Acta.* v. 329, p. 91-96, 1996.

[99] LIN, X.; GONG, J. Electrocatalytic oxidation of dopamine at a 5,5-ditetradecyl-2-(2-trimethyl-ammonioethyl)-1,3-dioxane bromide self-assembled bilayer membrane modified glassy carbon electrode. *Anal. Chim. Acta.* v. 507, p. 255-261, 2004.

[100] LEITE, O. D.; FATIBELLO-FILHO, O.; BARBOSA, A. M. J. Determination of catecholamines in pharmaceutical formulations using a biosensor modified with a crude extract of fungus laccase (*Pleurotus ostreatus*). *Chem. Soc.* v. 14, n. 2, p. 297-303, 2003.

[101] LEITE, O. D.; LUPETTI, K. O.; FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I. C.; BARBOSA, A. M. Synergic effects studies of the bi-enzymatic system laccase-peroxidase in a voltammetric biosensor for catecholamines. *Talanta.* v. 59, p. 889-896, 2003.

[102] LIMA, A. W. O.; VIDSIUNAS, E. K.; NASCIMENTO, V. B.; ANGNES, L. Vegetable tissue from *Latania* sp.: an extraordinary source of naturally immobilized enzymes for detection of phenolic compounds. *The Analyst.* v. 123, p. 2377-2382, 1998.

[103] JIN, G-P.; LIN X-Q.; GONG J-M. Novel choline and acetylcholine modified glassy carbon electrodes for simultaneous determination of dopamine, serotonin and ascorbic acid. *J of Electroanal. Chem.* v. 569, p. 165-142, 2004.

[104] ZHANG L.; LIN, X. Covalent modification of glassy carbon electrodes with glycine for voltammetric separation of dopamine and ascorbic acid. *Fresenius J. Anal. Chem.* v. 370, p. 956-962, 2001.

[105] ZHANG, L.; SUN, Y-G. Covalent modification of glassy carbon electrodes with β -alanine for voltammetric separation of dopamine and ascorbic acid. *Anal. Sciences.* v. 17, p. 939-943, 2001.

[106] SELVARAJU T.; RAMARAJ, R. Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and serotonin at poly(phenosafranin) modified electrode. *Electrochem. Communications.* v. 5, p. 667-672, 2003.

[107] XUN, Z.; CAI, C.; XING, W.; LU, T. Electrocatalytic oxidation of dopamine at a cobalt hexacyanoferrate modified glassy carbon electrode prepared by a new method. *J. Electroanal. Chem.* v. 545, p. 19-27, 2003.

[108] ZHANG, L.; LIN X. Covalent modification of glassy carbon electrode with glutamic acid for simultaneous determination of uric acid and ascorbic acid. *Analyst.* v. 126, p. 367-370, 2001.

[109] ROY, P. R.; OKAJIMA, T.; OHSAKA, T. J. Simultaneous electrochemical detection of uric acid and ascorbic acid at a poly(n,n-dimethylaniline) film-coated glassy carbon electrode. *Electroanal. Chem.* v. 561, p. 75-82, 2004.

[110] GAO, Z.; SIOW, K. S.; NG, A.; ZHANG, Y. Determination of ascorbic acid in a mixture of ascorbic acid and uric acid at a chemically modified electrode. *Anal. Chim. Acta.* v. 343, p. 49-57, 1997.

[111] PERRIN, D. D.; DEMPSEY, B. *Buffers for pH and Metal Ion Control*. New York: Chapman and Hall, 1983.

[112] LURIE, J. *Handbook of Analytical Chemistry*. Moscow: Mir Publishers, 1975.

[113] GOYAL, R. N.; DRYHURST, G. J. Redox chemistry of guanine and 8-oxyguanine and a comparison of the peroxidase-catalyzed and electrochemical oxidation of 8-oxyguanine. *Electroanal. Chem.*, v. 135, p. 75-91, 1982.

[114] BRETT A. M. O.; PIEDADE, J. A. P.; SERRANO, S. H. P. Electrochemical oxidation of 8-oxoguanine. *Electroanal.*, v. 12, p. 969-973, 2000.

[115] BRETT A. M. O.; DICULESCU, V. C.; PIEDADE, J. A. P. Electrochemical oxidation mechanism of guanine and adenine using a glassy carbon microelectrode. *Bioelectrochemistry*, v. 55, p. 61-62, 2002.

[116] MILLER, J. C.; MILLER, J. N. *Statistics for analytical chemistry*. 2nd ed. Chichester: Ellis H. Halsted Press Limited, 1988. p. 115.

[117] GRUNDIG, B.; WITTSTOCK, G.; RUDEL, U.; STREHLITZ, B. Mediator-modified electrodes for electrocatalytic oxidation of nadh. *J. Electroanal. Chem.* v. 395, p. 143-157, 1995.

[118] SCHLERETH, D. D.; KATZ, E.; SCHMIDT, H.-L. Surface-modified gold electrodes for electrocatalytic oxidation of nadh based on the immobilization of phenoxazine and phenothiazine-derivatives on self-assembled monolayers. *Electroanal.* v. 7, p. 46-54, 1995.

[119] SILBER, A.; HAMPP, V.; SCHUMANN, W. Poly(methylene blue)-modified thick-film gold electrodes for the electrocatalytic oxidation of nadh and their application in glucose biosensors. *Biosensors Bioelectron.* v. 11, p. 215-223, 1996.

[120] AVRAMESCU, A.; NOGUER, T.; AVRAMESCU, M.; MARTY, J-L. Screen-printed biosensors for the control of wine quality based on lactate and acetaldehyde determination. *Anal. Chim. Acta.* v. 458, p. 203-213, 2002.

[121] SANTOS, A. S.; GORTON, L.; KUBOTA, L. T. Electrocatalytic NADH oxidation using an electrode based on Meldola blue immobilized on silica coated with niobium oxide. *Electroanal.* v. 14, p. 805-812, 2002.

[122] ZHOU, D-M.; FANG, H-Q.; CHEN, H-Y.; JU, H-Y.; WANG, Y The electrochemical polymerization of methylene green and its electrocatalysis for the oxidation of NADH. *Anal. Chim. Acta.* v. 329, p. 41-48, 1996.

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

[124] RUBINSON, J. F.; MARK, H. B.; GALAL, A.; ATTA N. F. Characterization and investigation of the electrocatalytic properties of poly-p-phenylene modified electrodes. *J. Electroanal. Chem.* v. 384, p. 19-23, 1995.

[125] LOBO, M. J.; MIRANDA, A. J.; LOPEZ-FONSECA, J. M.; TUNON, P. Electrocatalytic detection of nicotinamide coenzymes by poly(o-aminophenol)- and poly(o-phenylenediamine)-modified carbon paste electrodes. *Anal. Chim. Acta.* v. 325, p. 33-42, 1996.

[126] MANO, N.; KUHN, A. Electrodes modified with nitrofluorenone derivatives as a basis for new biosensors. *Biosensors Bioelectron.* v. 16, p. 653-660, 2001.

[127] DE-LOS-SANTOS-ÁLVAREZ, N.; CASTAÑÓN, M. J. L.; ORDIERES, A. J. M; TUÑÓN-BLANCO P. Amperometric determination of serum lactate dehydrogenase activity using an ADP-modified graphite electrode. *Anal. Chim. Acta.* v. 457, p. 275-284, 2002.

[128] MASUDA, T.; ITO, J.; AKUZAWA, S.; ISHII, K.; TAKAGI, H.; UENO, Y. Hepatic accumulation and hepatotoxicity of luteoskyrin in mice. *Toxicol. Lett.* v. 61, p. 9-20, 1992.

[129] CADET, J.; ĐHAM, C.; DOUKI, T.; POUGET, J-P.; RAVANAT, J-L.; SAUVAIGO, S. Facts and artifacts in the measurement of oxidative base damage to DNA. *Free Radical Res.* v. 29, p. 541-550, 1998.

[130] MEI, N.; KUNUGITA, N.; HIRANO, T.; KASAI, H. Acute arsenite-induced 8-hydroxyguanine is associated with inhibition of repair activity in cultured human cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v. 297, p. 924-930, 2002.

[131] HENSLEY, K.; MAIDT, M. L.; YU, ZQ.; SANG, H.; MARKESBERY, W. R.; FLOYD, R. A. Electrochemical analysis of protein nitrotyrosine and dityrosine in the Alzheimer brain indicates region-specific accumulation. *J. Neurosci.* v. 18, p. 8126-8132, 1998.

[132] ROBINSON, G. M.; IWUOHA, E. I.; SMYTH, M. R. Characterisation of electrosynthetic L-dopa-melanin films by electrochemical and spectroelectrochemical techniques. *Anal. Chim. Acta.* v. 43, p. 3489-3496, 1998.

[133] RUBIANES M. D.; RIVAS, G. A. Highly selective dopamine quantification using a glassy carbon electrode modified with a melanin-type polymer. *Anal. Chim. Acta.* v. 440, p. 99-108, 2001.

[134] YOUNG, T. E.; BABBIT, B. W. Electrochemical study of the oxidation of alpha-methyldopamine, alpha-methylnoradrenaline, and dopamine. *J. Org. Chem.* v. 48, p. 562-566, 1983.

[135] ZHANG, F.; DRYHURST G. Oxidation chemistry of dopamine: possible insights into the age-dependent loss of dopaminergic nigrostriatal neurons. *Bioorg. Chem.* v. 21, p. 392-410, 1993.

[136] HAWLEY M. D.; TATAWAWADI S. V.; PIEKARSKI, ADAMS R. N. Additions and corrections - electrochemical studies of the oxidation pathways of catecholamines. *J. Am. Chem. Soc.* v. 89, p. 447-450, 1967.

[137] STREIN, T. G.; EWING A. G. Laser activation of microdisk electrodes examined by fast-scan rate voltammetry and digital simulation. *Anal. Chem.* v. 66, p. 3864-3872, 1994.

[138] DRYHURST, G. Electrochemical oxidation of uric-acid and xanthine at pyrolytic-graphite electrode - mechanistic interpretation of electrochemistry. *J. Electrochem. Soc.*, v. 119, n. 12, p. 1659-1664, 1972.