

Marcelo Francisco Ribeiro dos Santos Rodrigues

Desenvolvimento de um Biossensor para a Detecção de Óxido Nítrico

Dissertação de Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica, orientada pelo Professor Doutor Rui M. Barbosa
e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2013



Este trabalho foi desenvolvido na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, sob a orientação do Prof. Doutor Rui M. Barbosa

Índice

Índice

Abreviaturas.....	7
Resumo	9
Abstract.....	11
I.Introdução.....	14
I.1 Caracterização físico-química do óxido nítrico.....	14
I.2 Reações do óxido nítrico.....	16
I.2.1 Reação com o oxigénio molecular.....	16
I.2.2 Reação com o superóxido.....	17
I.2.3 Reações com metais de transição.....	18
I.3 Fontes e níveis biológicos de óxido nítrico.....	19
I.4 Alvos biológicos e consequências da produção de NO.....	22
I.5 Transporte biológico de óxido nítrico no cérebro.....	25
I.6 Métodos de deteção e quantificação de óxido nítrico.....	28
I.6.1 Colorimetria.....	29
I.6.2 Fluorimetria.....	29
I.6.3 Ressonância paramagnética eletrónica.....	30
I.6.4 Quimiluminescência.....	31
I.6.5 Eletroquímica.....	32
I.7 Biossensores.....	33
I.7.1 Métodos de imobilização de macromoléculas.....	35
I.7.1.1 Adsorção.....	35
I.7.1.2 Encapsulação.....	35
I.7.1.3 Ligação Covalente.....	36
I.8 Nanomateriais.....	38
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
2.1 Reagentes e Soluções.....	40
2.1.1 Soluções de macromoléculas.....	40
2.1.2 Soluções para a caracterização dos eléctrodos.....	41
2.1.3 Eletrólito suporte.....	41
2.2 Soluções padrão de óxido nítrico.....	41
2.3 Processos de imobilização.....	44

2.4 Métodos eletroquímicos.....	47
2.4.1 Voltametria cíclica.....	48
2.4.2 Voltametria Cíclica de varrimento rápido.....	50
2.5 Microscopia de varrimento eletrônico.....	51
2.6 Caracterização da Resposta dos Eléttodos.....	53
2.6.1 Sensibilidade.....	53
2.6.2 Limite de deteção.....	53
2.6.3 Seletividade.....	54
2.6.4 Eléttodos Screen-printing.....	54
2.6.4.1 Modificação da superfície dos eléttodos Screen-printing.....	55
2.6.5 Microeléttodos de fibra de carbono.....	56
2.6.5.1 Modificação da superfície dos microeléttodos de carbono.....	58
2.7 Experiências <i>in vivo</i>	59
2.7.1 Cirurgia estereotáxica.....	59
2.7.2 Modelos animais.....	60
2.7.3 Preparação e inserção do array para medições <i>in vivo</i>	60
2.8 Instrumentação Eletroquímica.....	61
2.9 Análise dos resultados.....	62
3. Resultados e Discussão.....	64
3.1 Estudo eletroquímico dos eléttodos screen-printing.....	64
3.1.1 Área de superfície eletroquímica.....	64
3.1.2 Estudo do comportamento eletroquímico de biomoléculas de grupo Heme....	69
3.1.2.1 Adsorção.....	69
3.1.2.2 Hemina.....	74
3.1.3 Electrocatalise do Óxido Nítrico.....	77
3.1.3.1 Quitosano-EDC.....	77
3.1.3.2 Hemina.....	80
3.1.4 Tecnologia dos eléttodos screen-printing.....	81
3.2 Estudo Eletroquímico com Eléttodos de Carbono Vítreo.....	84
3.2.1 Caracterização da resposta do biossensor a NO.....	86
3.3. Microsensores de fibra de carbono.....	88
3.3.1. Área ativa dos microeléttodos de fibra de carbono.....	88
3.3.2 Caracterização dos filmes de microeléttodos de carbono.....	90

3.3.3 Caracterização Eletroquímica dos Microsensores.....	92
3.3.4 Redução Eletrocatalítica do Óxido Nítrico.....	95
3.4 Seletividade.....	99
3.5. Medição de Óxido Nítrico In Vivo em Cérebro de Rato.....	100
4. CONCLUSÕES.....	103
5. BIBLIOGRAFIA.....	104

Abreviaturas

Ache	acetilcolinesterase
ADN	ácido desoxirribonucleico
AMPA	ácido aminohidroximetil propanoico
atm	atmosfera
AuNPs	nanopartículas de ouro
BH ₄	6R-5,6,7,8 – tetrahydro-biopterina
CaM	calmodulina
CAMP	adenosina monofosfato cíclica
cGMP	guanosina monofosfato cíclica
cGTP	guanosina trifosfato cíclica
CO	monóxido de carbono
DAN	2,3- diaminonaftaleno
DET	<i>direct electron transfer</i>
e ⁻	eléctron
EDC	dimetilamino carboiimida
E _i	potencial inicial
E _f	potencial final
E _λ	potencial de reversão
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial
EPR	Ressonância paramagnética electrónica
FAD	dinucleótido de flavina adenina
FMN	mononucleótido de flavina
GPES	<i>general purpose electrochemical system</i>
Hb	hemoglobina
HPR	peroxidase de horseradish
HbNO	nitrosohemoglobina
iNOS	óxido nítrico sintase indutível
ITO	óxido fino de índio
L-Arg	L-arginina
L-Cit	L-citrulina
Mb	mioglobina

MbNO	nitrosomioglobina
MetHb	metahemoglobina
MWNTs	nanotubos de parede dupla
N_2O_2	dióxido de dinitrogénio
NADPH	fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido
NHS	N - hidroxisuccionamida
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO_2	dióxido de azoto
NOHA	N-hidroxil-L-arginina
NO_i	energia de ionização do NO
nNOS	óxido nítrico sintase neuronal
NOS	óxido nítrico sintase
$ONOO^-$	peroxinitrito
PBS	tampão fosfato salino
PDZ	domínio de atracção proteica
RONs	espécies reativas de oxigénio e azoto
SOD	superóxido dismutase

Resumo

Descoberto nos anos 80s como poluente ambiental devido à formação de espécies reativas de oxigénio e azoto (RONS), o óxido nítrico (NO) despertou maior interesse por parte da comunidade científica devido aos vários processos de sinalização em que está envolvido nos tecidos biológicos. O óxido nítrico é sintetizado pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) que promove a conversão de L-arginina a L-citrulina e NO na presença de inúmeros cofatores (BH_4 , NADPH, FAD, O_2). As particulares características da molécula de óxido nítrico pressupõem a falta de interações específicas com os recetores membranares, o que lhe confere uma grande versatilidade para reações com alvos biológicos. A complexidade das reações com os seus alvos biológicos pode variar desde reações de segunda ordem irreversíveis à formação reversível do complexo nitrosilo. O NO pode modificar a atividade reguladora de proteínas por reação direta com o seu grupo heme ou indireta via S-nitrosilação e nitração dos resíduos de tirosina. Devido à abundância no meio fisiológico, as proteínas hémicas ferrosas adquirem um papel fundamental na compreensão do papel do óxido nítrico.

No cérebro, a sua atuação como neuromodulador está intrinsecamente ligado à ativação do recetor de glutamato dependente de cálcio presente nos neurónios. A isoforma neuronal produz NO no tecido nervoso, tanto central como periférico e realiza um papel na comunicação celular ao associar-se com a membrana plasmática. O alvo melhor caracterizado para o NO é a sGC que por vezes é considerada um recetor específico para NO devido à diminuta interação com os interferentes do NO (O_2 e CO).

Apesar do seu curto tempo de meia vida e baixa concentração, a possibilidade da quantificação do NO *in vivo* e *ex vivo* revela-se um passo crucial na compreensão dos mecanismos a si inerentes. É portanto necessário o desenvolvimento de ferramentas metodológicas capazes de determinar de forma robusta os níveis de NO nos sistemas biológicos. Enquanto os métodos indiretos quantificam o NO segundo os seus produtos de oxidação/redução (colorimetria, EPR, etc), as técnicas eletroquímicas possibilitam uma quantificação direta e em tempo real do NO. Os microsensores acrescentam uma melhor resolução espacial com mínimos danos para os tecidos.

O principal objetivo do trabalho realizado foi o desenvolvimento de microeléctrodos de fibra de carbono para a quantificação de NO através da imobilização de proteínas hémicas. Após resultados preliminares com mioglobina, microperoxidase e hemina em eléctrodos de *screen-printing* e carbono vítreo, a hemina foi a macromolécula que reuniu as melhores condições eletroquímicas para o estudo sistemático em microeléctrodos.

A ligação covalente da hemina com MWNTs e quitosano com o agente *cross-linking* EDC foi o protocolo mais robusto no que diz respeito ao DET e estabilidade para a medição de NO. Os picos redox do par $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ foram determinados por voltametria cíclica com um valor médio de $3.82 \pm 1.95 \text{ nA V}^{-1}$ s enquanto o potencial de redução do NO foi determinado por voltametria de onda quadrada a $-0.762 \pm 0.011 \text{ V}$ na presença de O_2 e a $-0.719 \pm 0.012 \text{ V}$ na ausência de O_2 . Os microsensores hemina/MWNTs/Quit-EDC foram ainda caracterizados em termos de sensibilidade a NO, 1.72 ± 0.67 e $2.61 \pm 1.67 \text{ nA}/\mu\text{M}$ na presença e ausência de O_2 . O seu limite de deteção foi muito semelhante para ambos os meios, $25 \pm 15 \text{ nM}$ em meio anaeróbico e $26 \pm 15 \text{ nM}$ em meio aeróbio.

Após a caracterização dos eléctrodos procedeu-se à quantificação de NO exógeno *in vivo* em cérebro de rato. Os valores obtidos estão de acordo com a calibração prévia do eléctrodo, o que demonstra que o filme de MWNTs/Hemina/Quit-EDC mantém as suas características físico-química após a sua inserção em meio biológico.

Abstract

Discovered in the 80s as an environmental pollutant due to the formation of reactive species of oxygen and nitrogen (RONS), nitric oxide (NO) attracted significant interest from the scientific community due to various signaling processes that are involved in biological tissues. Nitric oxide is synthesized by nitric oxide synthase (NOS) that promotes the conversion of L-arginine to L-citrulline and NO in the presence of various cofactors (BH₄, NADPH, FAD, O₂). The particular characteristics of the nitric oxide molecule presume the absence of specific interactions with membrane receptors, which gives great versatility for reaction with biological targets. The complexity of their reactions with biological targets can range from irreversible second-order reactions to the reversible formation of the nitrosyl complex. NO can modify the activity of regulatory proteins by direct reaction with their heme or indirect via S-nitrosylation and nitration of tyrosine residues. Due to the abundance in physiological media, the ferrous hemic proteins acquire a key role in understanding the role of nitric oxide.

In the brain, acting as a neuromodulator is intrinsically linked to the activation of glutamate calcium-dependent receptor present in neurons. The neuronal isoform produces NO in nervous tissue, both central and peripheral, and performs a role in cellular communication by associating with the plasma membrane. The best characterized target for NO is sGC which is sometimes considered a receptor specific for NO due to the very small interaction with the NO interferences (CO and O₂).

Despite its short half life and low concentration, the possibility of quantification of NO "in vivo" and "ex vivo" proves to be a crucial step in understanding the mechanisms inherent to itself. It is therefore necessary to develop methodological tools able to robustly determine the levels of NO in biological systems. While indirect methods quantify the NO products according to their oxidation / reduction (colorimetry, EPR, etc.), the electrochemical techniques allow quantification of direct and real-time NO. The microsensors add a higher spatial resolution with minimal damage to tissue.

The main aim of the work was to develop carbon fiber microelectrodes for NO measurement by hemic protein's immobilization. After preliminary results with myoglobin, microperoxidase and hemin in screen-printing and glassy carbon electrodes, hemin was the macromolecule that gathered the best electrochemical conditions for the systematic study in microelectrodes. Covalent attachment of chitosan and hemin MWNTs with the cross-linking agent EDC protocol was more robust with respect to DET and stability for NO measurement. The peaks redox pair Fe²⁺ / Fe³⁺ were determined by cyclic voltammetry with

an average value of $-3.82 \pm 1.95 \text{ nA V}^{-1} \text{ s}$ while the reduction potential of NO was determined by square wave voltammetry at $-0.762 \pm 0.011 \text{ V}$ in the presence of O_2 and $-0.719 \pm 0.012 \text{ V}$ in the absence of O_2 . The microsensors hemin / MWNTs / Quit-EDC were further characterized in terms of sensitivity to NO, 1.72 ± 0.67 and $2.61 \pm 1.67 \text{ nA / mM}$ in the presence and absence of O_2 . Its detection limit was very similar for both media, 25 ± 15 in anaerobic and $26 \pm 15 \text{ nM}$ in an aerobic medium.

The characterization of electrodes was proceeded by the quantification of exogenous NO "in vivo" in rat brain. The values obtained are in agreement with previous calibration of the electrode, which demonstrates that the film MWNTs / hemin / EDC-Quit maintains its physical and chemical characteristics after insertion in a biological environment.

Introdução

I. Introdução

I.1 Caracterização físico-química do óxido nítrico

As referências ao óxido nítrico remontam a meados do século XVII por investigadores como J.B Van Helmont (1648), Robert Boyle (1671) e G.E. Sthal (1703), mas foi Joseph Priestley, em 1772, o primeiro a caracterizar as suas propriedades químicas. Este preparou o gás através da seguinte equação:



A primeira designação deste gás foi de “ar nitroso” e desde logo se vislumbrou a sua rápida reação com o oxigénio, pela formação de um gás acastanhado (NO_2).

Apenas no final da década de 80 do século XX, cerca de dois séculos após a sua descoberta, foi demonstrada a sua enorme importância nos fenómenos de vasodilatação do músculo liso (Ignarro et al., 1987; Palmer et al., 1987; Moncada et al., 1989). Desde esse momento, o estudo desta pequena molécula tem despertado o interesse de grande parte dos investigadores. Atualmente na área da bioquímica/neurociências, após duas décadas de investigação, o óxido nítrico continua a ser inserido no leque de moléculas sobre as quais ainda pouco é conhecido.

A molécula de NO encontra-se no estado de oxidação +2, mas o azoto (N) pode adquirir diversos outros estados redox que variam entre -3 a +5., nomeadamente a amónia (NH_3) e pentóxido dinitrogénio (N_2O_5), respectivamente. Visto ser um radical, possui um número ímpar de eletrões de valência podendo ser designado como $\cdot\text{NO}$. As suas orbitais moleculares alojam os seus 11 e^- de valência e encontram-se divididas em 4 orbitais ligantes ($\delta 2s$; $\pi 2p(2)$; $\delta 2p$) e 4 não ligantes ($\delta 2s^*$; $\pi 2p^*(2)$; $\delta 2p^*$) (Fig. I.1). Como cada orbital molecular apenas acomoda $2e^-$, existe um eletrão desemparelhado numa orbital π^* . Assim, oito dos seus eletrões encontram-se em orbitais ligantes e apenas $3e^-$ em orbitais antiligantes, fazendo com que a sua ordem de ligação seja de 2.5. Quando se promove a sua oxidação, é produzido o ião nitrosónio (NO^+) pela remoção do e^- desemparelhado da orbital π^* ($\text{NO}_i = 9.25 \text{ eV}$). Neste estado, a ordem de ligação entre o azoto e o oxigénio é de 3. A adição do 12 e^- acarreta a redução do NO ao seu ião nitrosilo (NO^-), que ao encontrar-se no seu estado tripleto (N^{+1}), dificulta a sua reação com moléculas orgânicas (singlete). Tal como no caso do O_2 , a sua ordem de ligação é igual a 2 ($\text{NO}_i = 0.0024 \text{ eV}$).

Devido à sua facilidade de doar e receber elétrons, o NO forma as chamadas espécies reativas de oxigênio e azoto (RONS), como o dióxido de azoto (NO_2) ou o trióxido de azoto (N_2O_3) e adquire um papel de extrema importância a nível bioquímico, fisiológico e patofisiológico. A nível fisiológico medeia processos como a vasodilatação, memória e aprendizagem, desenvolvimento neuronal, regulação da resposta imune, entre outros (Furchgott et al., 1989; Garthwaite 2008; Santos et al., 2012).

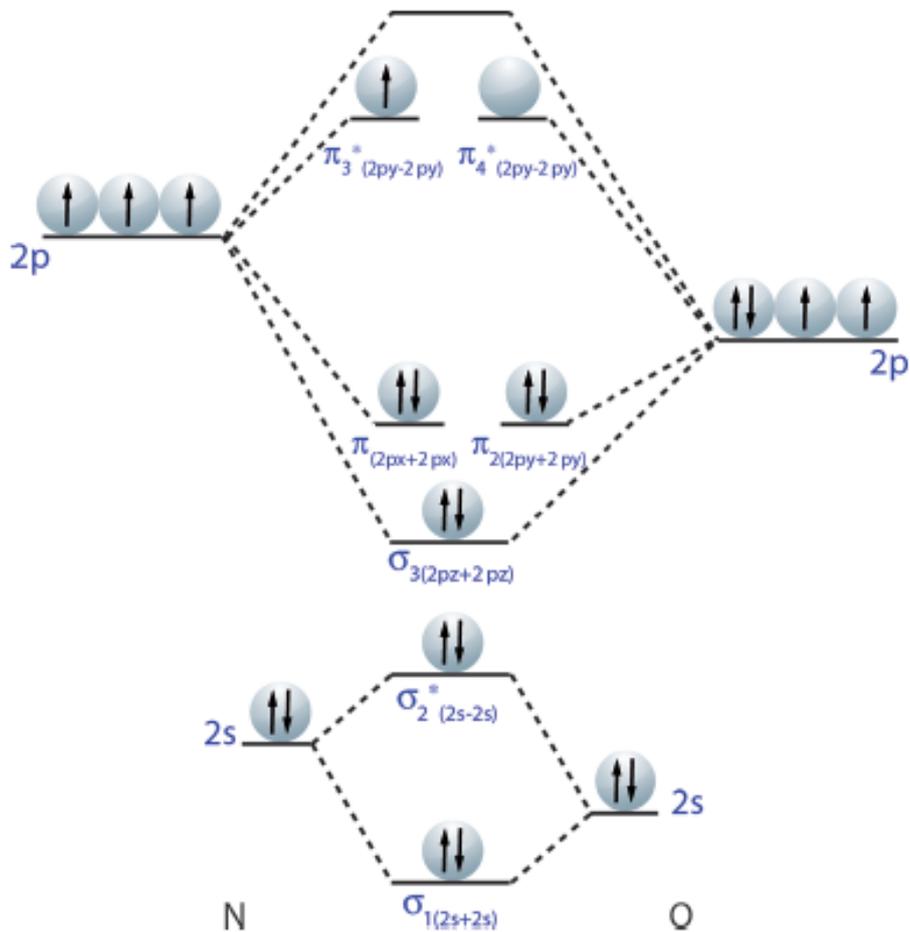


Figura 1.1 – Diagrama de orbitais moleculares do NO.

1.2 Reações do óxido nítrico

No seu meio biológico, o NO apresenta uma reatividade semelhante à do O₂ devido ao seu eletrão desemparelhado, que lhe permite reagir facilmente com radicais livres e metais de transição. A sua solubilidade em meio aquoso também se assemelha à do O₂. Quando preparado em meio aquoso e equilibrado com uma fração gasosa de NO puro à pressão de 1 atm e 25°C, a sua concentração é de 1.9 mM. Na ausência de uma fase gás-líquido, como acontece nos compartimentos “in vivo”, e para concentrações menores que 1-2 mM, o NO comporta-se como um não eletrólito dissolvido. A sua elevada reatividade advém da formação de fortes oxidantes secundários como o peroxinitrito (ONOO⁻) e o dióxido de azoto (NO₂) e não da sua interação direta. Pela rápida inativação do NO com a oxihemoglobina nos glóbulos vermelhos e do superóxido pela superóxido dismutase (SOD) (Beckman et al., 1996) previne-se a formação dos radicais anteriormente mencionados.

1.2.1 Reação com o oxigénio molecular

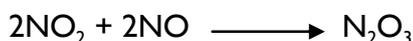
A reação do NO com o oxigénio molecular em solução aquosa (Ford et al., 1993) resulta na formação de ácido nitroso pela seguinte equação:



$$D[\text{NO}] / dt = K_{\text{aq}} [\text{O}_2] [\text{NO}]^2$$

$$4K_{\text{aq}} = 8.8 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1},$$

Sendo o mecanismo aceite:



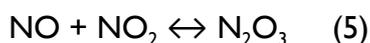
A reação entre o NO e o O₂ é de 3^a ordem, sendo de 2^a ordem relativamente ao NO e de 1^a em relação ao O₂. Como a estequiometria geral envolve a reação de 4 moles de NO por mole de O₂, o passo limitante é a reação entre o NO e o O₂ para produzir $\cdot\text{NO}_2$. Esta reação é muito lenta para baixas concentrações do radical, como no caso dos sistemas biológicos (Wink et al., 1996). Na fase gasosa é um dos principais fatores de poluição

atmosférica, pela produção do radical $\cdot\text{NO}_2$. A sua auto oxidação é mais lenta do que na fase aquosa e a velocidade aumenta com a diminuição da temperatura.

$$D [\text{NO}] / dt = K [\text{O}_2] [\text{NO}]^2 \quad (4)$$

$$K = 6 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

Neste caso o passo limitante envolve a reação entre o O_2 e o dímero N_2O_2 . Quando a reação se torna lenta devido a baixas pressões parciais de NO , pode ocorrer a competição com N_2O_3 , uma reação de primeira ordem para ambos os reagentes:



O mecanismo geral é:



1.2.2 Reação com o superóxido

Uma reação com consideráveis efeitos nos sistemas biológicos é a reação do NO com o anião superóxido (O_2^-) para formar peroxinitrito:



$$D [\text{NO}] / dt = K [\text{NO}] [\text{O}_2^-]$$

$$K = 6.7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

O peroxinitrito apresenta um baixo pKa (6.8) quando comparado com outros peróxidos, sendo facilmente protonado. Ao sofrer homólises catalisadas pelo dióxido de carbono (CO_2) gera potentes oxidantes como o radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$), dióxido de azoto ($\text{NO}_2\cdot$) e o radical carbonato ($\text{CO}_3^-\cdot$) (Augusto et al., 1994). Como se encontra em elevadas concentrações nos sistemas biológicos, pode gerar os compostos anteriores em quantidades acima do recomendável.

1.2.3 Reações com metais de transição

Devido às suas características físico-químicas o NO é uma espécie pouco reativa, por isso liga-se a outros radicais livres ou metais de transição para formar rápidas reações com compostos biológicos. A reação mais importante com estes metais é a sua simples associação, referida como nitrosilação (Ford et al., 2002). Esta reatividade deve-se a uma simetria favorável e interações energéticas entre as orbitais d do metal e as orbitais do NO, que normalmente tem mais afinidade para o metal do que o O₂ e CO (monóxido de carbono). A transferência e partilha de eletrões entre as orbitais do NO e o metal depende em grande parte da energia das orbitais d do metal, que por sua vez está dependente do estado de oxidação, geometria e número de coordenação do metal (tetra, penta e octaédrica). Um exemplo muito conhecido é o anião nitroprussida ([Fe (CN)₅ NO]²⁻) que possui um número de coordenação octaédrica (6 ligandos).

Os compostos metal-nitrosilo estão divididos em três grandes grupos:

- 1) Geometria linear em que o NO doa 3 eletrões: (M-N≡O);
- 2) Geometria com ângulo 120° em que o NO doa 1 eletrão:
$$\begin{array}{c} \text{N}=\text{O} \\ \diagdown \\ \text{M} \end{array}$$
- 3) Compostos em que o NO serve como ponte entre os átomos de metal.

I.3 Fontes e níveis biológicos de óxido nítrico

As óxido nítrico sintases (NOS) são oxireductases responsáveis pela síntese de NO. São metaloenzimas com multidomínios que catalisam a oxidação de L-Arginina (Arg) a NO e L-Citrulina (Cit) tendo como intermediário a N-hidroxi-L -larginina (NOHA), sem que para isso haja gasto de ATP (Figura I.2) (Griffith et al., 1995; Alderton et al., 2001).

Nesta síntese dá-se a catálise da oxidação de 5 elétrões do azoto guanidina do aminoácido L-Arginina e a sua passagem a L-Citrulina ocorre por sucessivas reações de mono oxigenação. São necessárias duas moles de O₂ e 1.5 moles de NADPH por mole de NO formada. O domínio C-terminal é uma reductase (NOSred) e permite a ligação de importantes de cofatores como o FAD, FMN e NADPH. Os elétrões do último são necessários para reduzir o heme férrico no domínio N-terminal através dos intermediários FAD e FMN. O domínio oxidase liga o grupo heme, a arginina e o cofator Gr-tetra hidrobiopterina (BH₄) e contém o centro catalítico das enzimas. É neste domínio que se dá a produção efetiva do NO, pela oxidação do azoto do grupo guanidina.

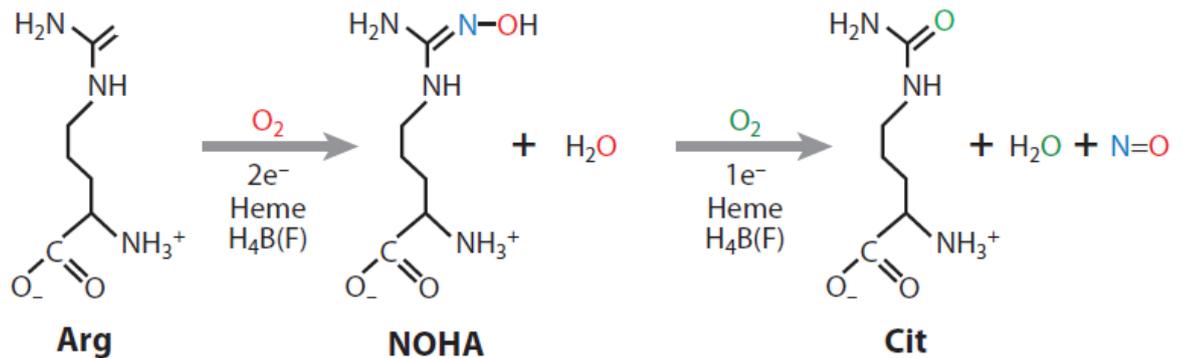


Figura I.2 – Etapas de catalisação da oxidação da L-Arginina (Arg) a L-Citrulina (Cit) e NO via o intermediário N-hidroxi-L-arginina (NOHA). São necessários três e⁻ exógenos, dois na etapa I e um na etapa II, bem como um grupo heme e o cofator tetrahidrobiopterina (BH₄).

Estas enzimas são altamente reguladas, envolvendo vários cofatores e processos de regulação pós-transdução (ex: fosforilação). O cofator BH₄ liga-se ao centro catalítico e permite uma rápida e acoplada transferência de protão/elétrão para a ativação do oxigénio. Caso a tetrahidrobiopterina seja modificada ou ocorra a sua depleção, a NOS pode produzir o radical superóxido (O₂^{•-}) em vez de NO.

Estão presentes em três grandes tipos de isoformas distinguíveis pelo tamanho, sequência de aminoácidos, regulação transcripcional, regulação e ativação por Ca^{2+} e distribuição nos tecidos. A designação advém dos tecidos onde foram clonadas: NOS neuronal (nNOS ou NOS I) e NOS endotelial (eNOS ou NOS III), ambas constitutivas e a NOS indutível (iNOS ou NOS II).

Tabela I – Características das isoformas da nNOs.

Nome	Gen(es)	Localização	Função	Ativação
NOS neuronal (nNOS)	NOS1	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tecido nervoso ▪ Músculo-esquelético tipo II ▪ Neurónios ▪ Cerebelo 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Comunicação celular 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Acetilcolina ▪ Bradicina ▪ Glutamato
NO endotelial (eNOS)	NOS2	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Endotélio ▪ Plaquetas 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Vasodilatação 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Acetilcolina ▪ Bradicina ▪ Glutamato
NOS indutível (iNOS)	NOS3	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sistema imune ▪ Sistema cardiovascular 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Defesa imune contra patogénios 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Endotoxinas (LPS, MPD) ▪ Citoquinas (INFγ, TNFα, IL-1)
NOS bacteriana (bNOS)	Vários	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Várias espécies Gram (+) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Defesa contra stress oxidativo, antibióticos e ataque imune 	

As e vice-versa. É necessário um aumento dos níveis de Ca^{2+} para que ocorra a sua ativação isoformas constitutivas necessitam da ligação do complexo Ca^{2+} - CaM para que exista transferência de elétrões do NADPH para o heme. Estas enzimas produzem pequenas quantidades de NO por estimulação física ou química e estão associadas a funções fisiológicas. A eNOS e a nNOS têm diferentes dependências de O_2 , com um valor de K_m de 2-4 μM e acima de 300 μM , respetivamente (Stuehr et al., 2004). No cérebro, em que a concentração de O_2 é de cerca de 20 μM , a velocidade de produção de NO é proporcional à concentração de O_2 , enquanto que a forma endotelial é insensível a O_2 ($[\text{O}_2]$ na artéria é de 150 μM) (Grassi et al., 2005).

O NO pode ser produzido por outras vias diferentes das NOS. O nitrito (NO_2^-), considerado um dos metabolitos finais da oxidação do NO, pode ser reduzido de volta a NO por proteínas que contêm metais de transição, como no caso da xantina oxidase e deoximioglobina /deoxihemoglobina (Nagababu et al., 2003).

A isoforma indutível é independente/insensível aos níveis de Ca^{2+} pois encontra-se permanentemente ligada à calmodulina. É expressa transcricionalmente e nos macrófagos, produzindo elevada quantidade de NO em condições de infecção ou inflamação.

Níveis fisiológico de NO

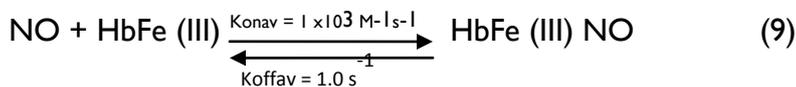
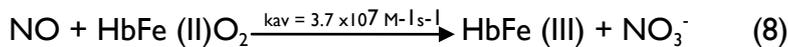
Atualmente, os níveis de NO fisiológico em conformidade com a maioria dos trabalhos publicados encontra-se no intervalo de 1-100 nM. Este é um tema muito controverso, uma vez que estudos com técnicas de fluorescência acopladas a biossensores apontam para níveis de 100 pM a 5 nM (Batchelor et al., 2010). No caso de ocorrerem processos inflamatórios, os níveis de NO podem aumentar substancialmente devido à expressão da iNOS nas células do sistema imunitário. Nesta situação, o NO tende a atuar a níveis patofisiológicos devido à acumulação de biomoléculas nitrosadas, oxidadas e nitradas. Em humanos adultos saudáveis está reportado um valor médio de $0.45 \mu\text{mol Kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ para a síntese de NO (Siervo et al., 2011).

I.4 Alvos biológicos e consequências da produção de NO

Apesar da reatividade com as biomoléculas ser apenas um dos fatores que contribuem para a resposta celular e dos tecidos mediados pelo NO e O₂, representa um fator crítico na sua modulação. Nas últimas décadas tem sido dado grande foco ao estudo do O₂, devido à sua capacidade de produzir espécies radicalares e oxidantes capazes de danificar lípidos, proteínas e ADN, mas tornou-se claro a importância de espécies reativas de O₂ (H₂O₂) e NO na homeostase de células e organismos. Devido à sua abundância nos sistemas biológicos, as proteínas hémicas com centro ativo ferro são os alvos preferenciais das reações do NO. Este pode interagir com os complexos de ferro de 3 modos:

- 1) Ligação direta ao ferro;
- 2) Reação com os complexos Fe-O₂;
- 3) Reação com oxo-complexos de elevada valência (Santos et al., 2012).

Estas reações podem ser irreversíveis (HbFe (II)O₂) ou reversíveis (nitrosilação da metemoglobina ou heme ferroso da guanilato ciclase).



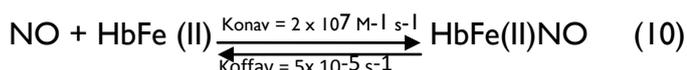
As reações reversíveis tendem a participar em processos de sinalização, sendo a amplitude e duração desses sinais dependentes das características e concentração do NO e dos seus alvos biológicos, bem como dos seus moduladores/competidores. Um dos exemplos mais estudados é a competição entre o NO e o O₂ na respiração mitocondrial.

Hemeproteínas ferrosas

Entre as espécies biológicas capazes de reagir rapidamente com o NO, as hemeproteínas ferrosas como a sGC, hemoglobina e citocromo c oxidase (CcOx) são as que expressam os efeitos fisiológicos mais contundentes do NO. O alvo melhor caracterizado do NO a níveis fisiológicos é a proteína sGC, que quando ativada pelo NO, leva à produção de cGMP. Esta enzima liga-se extremamente rápido ao NO, mas não se liga aos seus competidores O₂ e CO, como a maior parte das proteínas hémicas. Caracteriza-se por ser uma proteína heterodimérica em que apenas a cadeia B da região N-terminal se liga

ao grupo heme, enquanto o C-terminal de ambas as unidades contém o domínio catalítico para o cGTP. A ligação do NO ao heme pentacoordenado da sGC é limitada difusionalmente ($k = 7 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Winger et al., 2007). Esta ligação causa a dissociação do azoto imidazólico da histidina 105, resultando na formação do heme nitrosil pentacoordenado da sGC que induz uma mudança conformacional na enzima e afeta a subunidade catalítica, aumentando centenas de vezes a velocidade de conversão de guanosina 5'-trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclica (cGMP), pelo qual o NO exerce a sua função sinalizadora. O valor de ativação máximo para a sGC é de 10 nM de NO. Nas células, a sGC é rapidamente desativada após remoção de NO, devido à sua rápida constante de dissociação ($K_{\text{off}} = 1 \text{ s}^{-1}$).

A hemoglobina é a proteína que se encontra em maior concentração no sangue dos mamíferos (10 mM). A interação entre o NO e a hemoglobina ferrosa apresenta relevância biológica pela ligação ao heme da deoxihemoglobina ou pela degradação de NO via a sua reação com oxi-hemoglobina, promovendo a oxidação do ferro hémico [Fe (III)] e levando à formação de nitrato. Estas interações constituem a principal via de remoção do NO devido à sua abundância na vasculatura, e modelam a dinâmica do NO nos tecidos vizinhos. Ambas as formas oxi e deoxihemoglobina reagem rapidamente com o NO. No caso da forma não oxidada, dá-se a nitrosilação do seu grupo heme, formando-se o complexo HbFe (II)NO. Este tem uma constante de dissociação muito lenta, podendo ser considerado irreversível (equação 10).



A reação com a oxihemoglobina, é pelo contrário irreversível e tanto o NO como o heme são oxidados à custa do oxigénio molecular.

Um outro importante alvo do NO é o citocromo c oxidase (CcOx), o complexo terminal da cadeia mitocondrial de transporte de eletrões. O CcOx é responsável pela redução do oxigénio molecular a água, uma reação que envolve quatro eletrões e um mecanismo em diversos passos (Michel et al., 1998). O NO ao interagir com o CcOx inibe a respiração mitocondrial reversivelmente e de uma forma bastante robusta (elevada razão O_2/NO). Está descrito que o estado 3 da mitocôndria (rápida transferência de eletrões e redução de O_2) é mais susceptível à inibição por parte do NO do que o estado 4 (transferência de eletrões e redução de O_2 mais lentas) (Borutaite et al., 1996). O CcOx é constituído por quatro grupos prostéticos, mas apenas um reage reversivelmente com o NO

e O_2 . Ambos competem pelo centro hémico a_3 CuB do citocromo c oxidase (CcOx [$hemea_3Fe(II)Cu_B(I)$]) com constantes de velocidade semelhantes e na ordem dos segundos. Como a dissociação do NO é mais lenta que a redução do O_2 , a concentração do CcOx nitrosilo aumenta lentamente, levando à inibição da respiração.

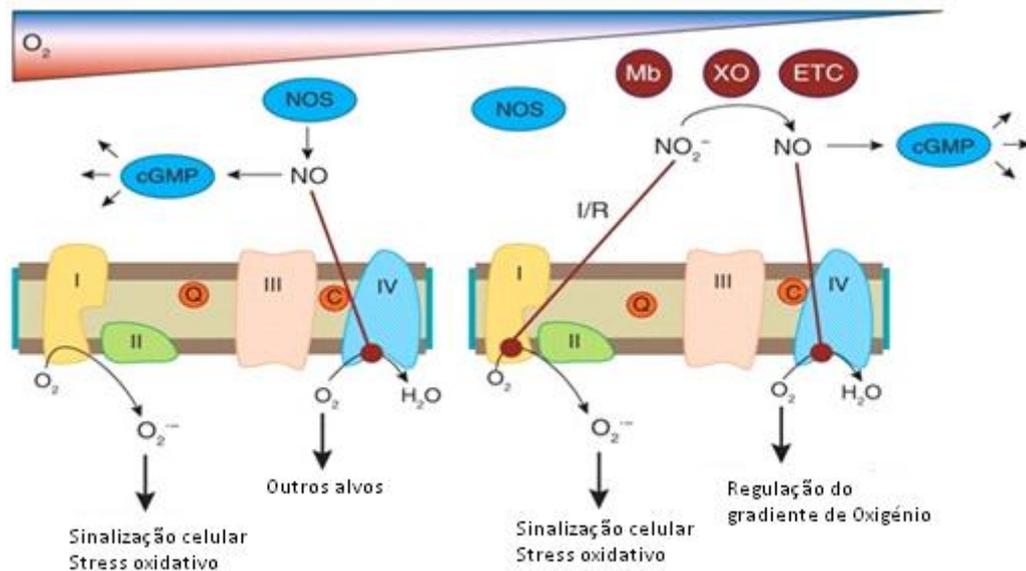


Figura 1.3 – Interações do óxido nítrico na mitocôndria. Em condições normóxicas as NOS geram NO que ativa a cascata de sinalização do cGMP cíclico e a direta inibição do complexo IV, fazendo com que o O_2 atinga outros alvos. Esta inibição aumenta as espécies reativas de O_2 (ROS) na mitocôndria, que podem mediar a sinalização celular e stress oxidativo. Na hipoxia, a atividade das NOS é inibida pela falta de O_2 . O nitrito é reduzido a NO pela deoxohemoglobina (Mb), xantina oxidase (XO) e enzimas do transporte da cadeia de elétrons (ETC), e o NO resultante pode inibir a respiração no complexo IV.

I.5 Transporte biológico de óxido nítrico no cérebro

Visto o NO ser uma molécula apolar, é razoavelmente solúvel em água (1.9 mM a 1 atm e 298K), sendo no entanto 10 vezes mais solúvel em solventes orgânicos. É por isso esperada uma concentração superior de NO em fases hidrofóbicas como membranas, lípidos, quilomicrons e complexos de lipoproteínas. Este efeito é importante a nível biológico, uma vez que o NO pode atravessar a barreira biliar das membranas sem restrições (Subczynski et al., 1996). O aumento da concentração de NO e O₂ nestas regiões podem tornar as membranas num local apropriado para as reações que envolvem o NO (Rubbo et al., 1994). O transporte do NO por difusão simples, confere-lhe propriedades únicas, de realçar:

- 1) Atravessa facilmente as membranas sem necessitar de transportadores;
- 2) Não se encontra confinado às células ou compartimentos celulares;
- 3) Existe um movimento das moléculas de NO das células produtoras para as células vizinhas devido a um processo *random*, característico da difusão simples.

A equação de Einsten-Smoluchowski descreve a difusão molecular livre: $\Delta x = \sqrt{Dt}$, onde Δx representa a distância média percorrida pelo NO, t o tempo e D o coeficiente de difusão.

O coeficiente de difusão do NO em água a 37°C está reportado como 3360 $\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ (Lancaster 2000) e 3300 $\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ (Malinski et al., 1993). Devido às reações e mecanismos de ativação/inativação do NO no cérebro, o valor do seu coeficiente de difusão não demonstra tanta exatidão. Estudos recentes efetuados com microssensores “in vivo” no cérebro de rato apontam para valores de 2200 $\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$, semelhante ao seu valor em agarose de 2600 $\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ (Santos et al., 2012), mas distintos de trabalhos anteriores de 3800 $\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ (Meulemans 1994). Dado o NO não se armazenar em vesículas e se difundir radialmente, os alvos biológicos da sua vizinhança são responsáveis pela modulação do seu perfil de concentração e tempo de vida. As reações com outros radicais livres (ex: superóxido) e proteínas contendo metais de transição (ex: proteínas hémicas) são os principais responsáveis pela regulação da biodisponibilidade do NO. A atuação do NO está assim dependente de inúmeros fatores como o coeficiente de difusão, velocidade de síntese e interações com outros elementos biológicos.

Estas observações tornam pertinente o estudo dos mecanismos de sinalização associados ao NO, principalmente devido à sua especificidade para os diferentes alvos

biológicos. No sistema neuronal central, a sinalização do NO está associada ao sistema glutamatérgico. Nas sinapses glutamatérgicas, a síntese de NO envolve a estimulação dos recetores de glutamato ionotrópicos, principalmente os subtipos NMDA (canal iónico sensível à voltagem ativado por glutamato) e AMPA, e o consequente influxo de cálcio para o citosol. Após a ligação do Ca^{2+} à calmodulina, é ativada toda a maquinaria molecular inerente à isoforma neuronal da NOS. A nNOS possui no seu domínio N-terminal um motivo PDZ que permite a sua ligação a um segundo motivo PDZ da proteína PSD-95. Esta por sua vez liga-se simultaneamente ao recetor NMDA do glutamato (Kornau et al., 1995), formando um complexo molecular capaz de posicionar o local de ligação do cálcio da nNOS na direção do influxo de cálcio através do canal NMDA. Este acoplamento NMDA-nNOS pela PSD-95 é regulado especificamente no cérebro pela competição da proteína CAPON com a nNOS para o domínio PDZ. As dextrinas são proteínas que estão associadas ao CAPON e ajudam na manutenção do supra complexo multiproteico, podendo ser alvos de interação para o NO. Assim, desde que estejam presentes os substratos L-arginina e O_2 , bem como todos os cofatores necessários (CaM, NADPH, FMN, FAD, BH4 e o heme), a nNOS converte a L-arginina a L-Citrulina e NO (Fig. 1.4).

A regulação da nNOS é também efectuada via pós transdução por fosforilação que envolve diversas cinases (ex. proteína cinase C, cinase dependente de cAMP e cinase dependente de Ca^{2+} /CaM), indicando que a produção de NO é modulada por diferentes vias de sinalização.

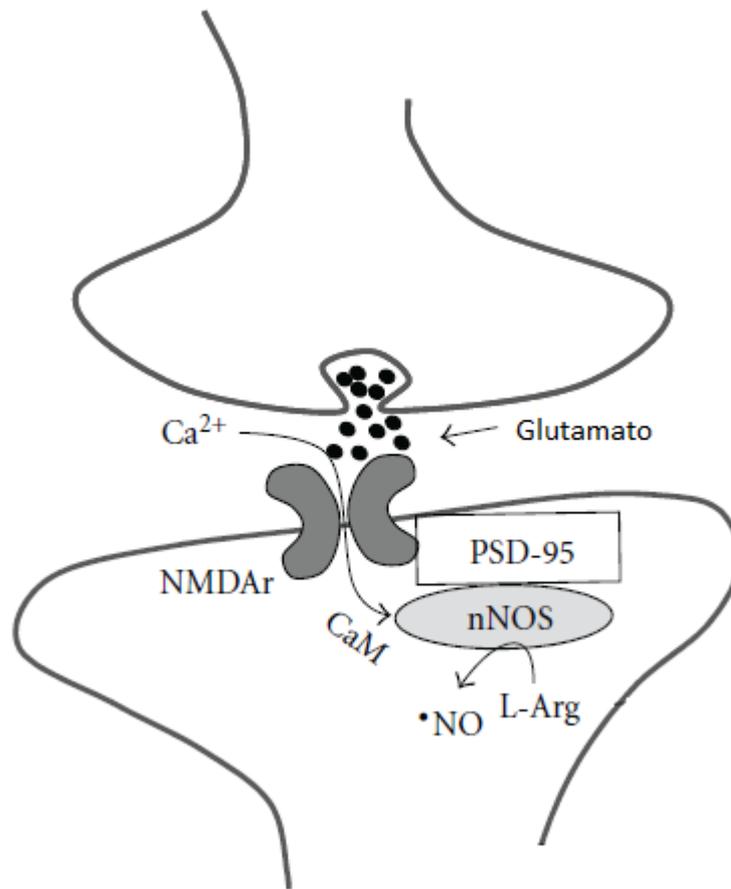


Figura 1.4 – Principal via de produção de NO no cérebro. O NO é sintetizado pela entrada de cálcio no recetor pós-sináptico após a ativação dos recetores NMDA pelo glutamato. A nNOS é ativada pela sua ligação à calmodulina (CaM) dependente de cálcio.

1.6 Métodos de detecção e quantificação de óxido nítrico

O crescente conhecimento dos efeitos do NO nos organismos vivos tornou crucial o desenvolvimento de metodologias para a sua detecção e quantificação em amostras biológicas e principalmente in vivo (Whittle 1995). As inúmeras reações efetuadas por este analito, a sua baixa concentração no meio fisiológico e o seu fugaz tempo de vida implicam incrementar técnicas com um rápido tempo de resposta e baixo limite de detecção. Os métodos para a determinação da concentração de NO dividem-se em diretos e indiretos. A grande maioria das técnicas baseiam-se em métodos indiretos, quantificando produtos secundários (NO_2^- , NO_3^- , N_2O_3) provenientes das reações do NO com o oxigénio molecular, proteínas hémicas e outros radicais livres. Estes métodos podem ser divididos em três categorias:

- 1) Ex situ – Estas metodologias requerem processamento de amostras, nomeadamente a formação de adutos estáveis (EPR, detecção UV/VIS da hemoglobina- Fe^{2+} -NO e outros complexos de NO-Ferro), análise dos produtos de reação (Hemoglobina- Fe^{3+} , L-citrulina, nitritos e nitratos), reação de quimiluminescência de fase gasosa com ozono e reações com luminol/peróxido de hidrogénio na fase líquida. Um dos métodos mais comuns para a medição de NO é através do ensaio de diazotação ou ácido sulfanílico, usualmente conhecido como ensaio de Griess, que mede nitrito, um produto estável da reação do NO.
- 2) Incorporação em células de indicadores sensíveis ao NO. Existiu uma tentativa de desenvolvimento compostos fluorescentes para estudar a distribuição espacial do NO a níveis celulares e sub-celulares. No entanto, este procedimento levanta problemas relacionados com a composição do meio, na reação dos fluóforos com o NO e as propriedades fluorescente dos fluóforos.
- 3) Detecção em tempo real usando sensores e biossensores inseridos no ambiente de produção de NO.

Os métodos isotópicos (2) assentam na preparação de protocolos com marcadores específicos para os compostos que constituem as vias de produção/decomposição do NO (Siervo et al., 2011). Numa destas vias, marca-se a arginina e citrulina isotopicamente no seu átomo de azoto de guanidina e a quantificação de NO é baseada no princípio da conversão equimolar da arginina em citrulina e NO. Nas outras duas principais vias, é acompanhado o percurso da arginina e O_2 até à formação de nitrato, o produto final da oxidação do NO (Siervo et al., 2011). Nos métodos não isotópicos (ex situ) são analisadas amostras biológicas de plasma ou urina sem que exista uma marcação isotópica, tornando-os menos seletivos

para a detecção de NO. Está demonstrado que os humanos e roedores excretam maiores quantidades de nitrato do que aquelas que são ingeridas pela alimentação, sugerindo que nos mamíferos ocorre a síntese de metabolitos provenientes da oxidação de compostos azotados. Sabe-se que o NO é relativamente instável na presença de oxigênio molecular, ocorrendo a sua auto-oxidação em vários óxidos de azoto, como já introduzido na secção das reações do NO. O NO_2^- é o único produto estável decorrente da espontânea auto-oxidação do NO em amostras aeróbicas. No entanto, o nitrato é o composto presente em maior quantidade nas amostras de plasma e urina. Um dos mecanismos propostos (Ignarro et al., 1993), sugere que o NO_2^- , derivado da auto-oxidação do NO, é convertido a NO_3^- pela oxidação de oxihemoproteínas (oxihemoglobina, oximioglobina). Uma segunda e plausível explicação para a predominância de NO_3^- “in vivo”, deve-se há reação direta de NO com as oxihemoproteínas após a sua formação pelas NOS.

1.6.1 Colorimetria

A técnica de colorimetria baseia-se na formação dos adutos S-nitroso hemoglobina/mioglobina (Hb-NO; Mb-NO). O NO ao ligar-se ao centro férrico da hemoglobina promove um desvio da sua banda soret, a qual permite quantificar a concentração de NO (Nims et al., 1996). A oxihemoglobina /oximioglobina reagem com NO formando MetHb / MetMb pela seguinte equação:



É também possível efetuar medições indiretas de NO por colorimetria baseadas na quantificação de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$. A técnica mais conhecida de quantificação de NO por métodos colorimétricos baseia-se na equação de Griess que quantifica o nitrito formado pelo tratamento de RSNO com cloreto de mercúrio. Este método requer que o NO_3^- seja previamente reduzido a NO_2^- . Resumidamente, o agente nitrosante N_2O_3 , gerado da auto-oxidação do NO ou da acidificação do nitrito reage com sulfanilamida libertando um derivado de diazonio. O produto final da reação é um cromóforo que absorve fortemente a 540 nm. A sensibilidade deste método encontra-se no intervalo de 1-2 μM , limitando a quantificação em amostras que contêm elevadas quantidades de NO_2^- .

1.6.2 Fluorimetria

Este método emprega o uso do composto aromático diamino 2,3-diaminonaftaleno (DAN) como indicador da formação de NO. Os agentes nitrosantes (ex N_2O_3) provenientes da reação do NO com o O_2 reagem com o DAN levando à formação de um produto com

elevada fluorescência (naftotriazole). Permite a quantificação de NO_2^- e NO (fig.1.5) e para pHs neutros não ocorre uma interferência significativa do NO_2^- (Miles et al., 1996).

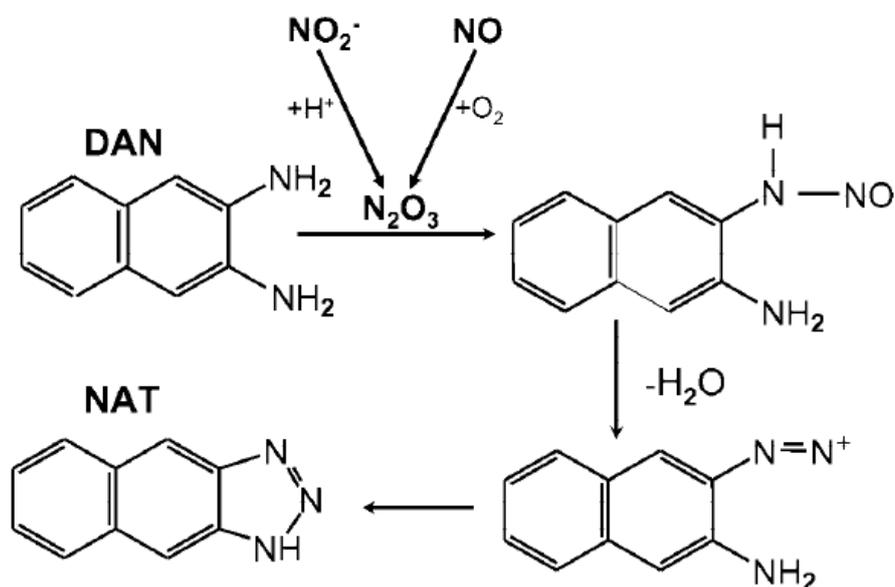


Figura 1.5 – Detecção fluorométrica de NO e NO_2^- utilizando diaminonaftaleno (DAN).

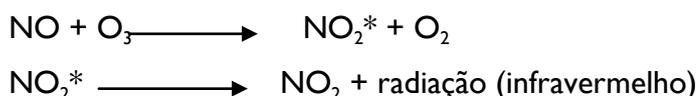
1.6.3 Ressonância paramagnética eletrônica

A detecção de radicais livres é o alvo da técnica de ressonância paramagnética eletrônica (EPR), pois esta tem como base as propriedades magnéticas dos elétrons desemparelhados e do seu meio molecular. Os elétrons desemparelhados podem existir em duas orientações, paralelas ou antiparalelas. Esta técnica permite quantificar a diferença de energia entre estes dois estados através das frequências do espectro eletromagnético. Enquanto radicais livres como o NO e o superóxido se encontram em baixas concentrações e curtos-tempo de vida para serem detetados diretamente por EPR, a solução encontrada foi a detecção de radicais secundários mais estáveis. Estes são formados pela reação das espécies radicalares primárias com *spin traps* (nitroxídeos ou derivados de nitrona) originando complexos secundários suscetíveis de serem detetados por EPR. Os complexos mais utilizados na detecção de NO advêm da interação do NO com os centros metálicos das proteínas (Hall et al., 1996; Kozlov et al., 1996). Com um limite de detecção de 1×10^{-9} M, esta técnica permite detetar as espécies radicalares mais estáveis produzidas em processos de oxidação e inflamação, como o radical ascorbil e complexos nitroso-hemes.

I.6.4 Quimiluminescência

O processo de quimiluminescência baseia-se na energia química gerada como resultado da dissociação de ligações fracas que produz compostos intermediários num estado eletronicamente excitado. Ao regressar ao estado de energia inicial emitem luz que é quantificável. Uma das aplicações mais comuns deste método são os imunoensaios que permitem quantificar anticorpos ou antígenos em fluídos corporais, ou ainda para marcação tumoral de outras proteínas séricas. A deteção do radical superóxido é frequentemente realizada pela sua reação com o agente quimiluminescente lucigenina devido ao fácil acesso dos locais intracelulares de produção de superóxido, especificidade da reação e aumento da sensibilidade quando comparado com métodos químicos (Tarpey et al., 2001).

Inicialmente desenvolvida para deteção de níveis de NO atmosférico, a quimiluminescência gasosa de NO adquiriu grande importância nos estudos de ar expirado (Girgis et al., 2003). Esta variante consiste na reação do NO com o ozono (O_3), produzindo-se uma percentagem de dióxido de azoto no estado excitado (NO_2^*), que ao decair para o seu estado fundamental, emite luz na região do infravermelho:



A reação descrita apresenta uma elevada seletividade para o NO, sendo praticamente insensível a NO_2^- . Com uma sensibilidade média na gama dos 10 nM (Marley et al., 2000) e um elevado tempo de espera, tornam esta metodologia pouco eficaz para a quantificação do NO.

A deteção de NO na fase gasosa implica a purga da solução, o que limita a sua aplicabilidade nas medições em tempo real.

Apesar da maioria destes métodos não serem evasivos, não permitem uma medição específica numa determinada região/orgão, requerem o uso de equipamento dispendioso/operadores especializados e por vezes é necessário um longo período de espera para o conhecimento dos resultados. Ou seja, não é possível obter uma boa resolução espaço-temporal para a quantificação do analito. Os métodos diretos permitem uma quantificação em tempo real das concentrações de NO nos fluidos biológicos.

I.6.5 Eletroquímica

Os métodos eletroquímicos associados com o uso de microelétrodos são o único procedimento que possibilita uma detecção “in vivo” em tempo real de compostos como o NO, O_2^{2-} e $ONOO^-$. Relativamente ao óxido nítrico, aliar estes dois fatores permite:

- I. Boa seletividade e eficiente discriminação contra possíveis interferentes com um fator de seletividade > 100 ;
- II. Elevada sensibilidade e limite de detecção na gama dos nanomolares;
- III. Tempo de resposta rápido (milissegundos);
- IV. Estabilidade de longa duração;
- V. Utilização de microelétrodos de dimensões reduzidas, provocando um menor dano aos tecidos (Bedioui et al., 2010).

As diferentes abordagens para fabricação de microsensores para detecção do NO têm sido maioritariamente baseadas na sua oxidação a elevados potenciais (+0.9 V), via utilização de microelétrodos modificados quimicamente (Barbosa et al., 2008). Os elevados valores de potencial conduzem à oxidação de outros analitos como o nitrito, ácido ascórbico, dopamina, ácido úrico e peróxido de hidrogénio, criando sinais de interferência.

A redução eletroquímica do NO por metaloproteínas imobilizadas na superfície dos elétrodos é uma técnica alternativa para a detecção de NO que tira partido da sua afinidade por metais de transição. O óxido nítrico pode efetuar a redução de um eletrão a valores de potencial entre -0.5 V e -1.4 V e formar o ião nitrosilo:



Como este ião é altamente instável em ambiente aquoso, a sua formação é procedida de reações químicas até se formar N_2O que é posteriormente reduzido a N_2 .

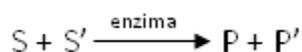
Os processos de redução do NO sofrem da interferência do oxigénio molecular devido à similaridade das propriedades físico-químicas de ambos os compostos. No entanto, o revestimento dos microelétrodos com polímeros capazes de imobilizar proteínas hémicas torna possível diferenciar os potenciais de redução do NO e O_2 . De salientar que o NO tem uma constante de afinidade maior que o O_2 para interações com o ferro presente nas proteínas hémicas.

I.7 Biossensores

O termo biossensor aplica-se a qualquer dispositivo analítico, usado para a detecção de um analito, que combina um componente biológico com um detetor físico-químico. Refere-se a um sensor capaz de transformar informação química, obtida a partir da concentração de um componente presente numa amostra específica, num sinal analítico mensurável (Thevenot et al., 2001). O elemento biológico imobilizado (ex. enzima, anticorpos, microrganismos, recetores celulares) tem a função de reconhecimento do analito (ex. substrato da enzima, antigene), permitindo a sua detecção seletiva. Apesar da grande utilização de anticorpos e oligonucleótidos, as enzimas são os elementos de reconhecimento mais utilizados na formulação de biossensores devido à sua complexa estrutura. Esta concede elevada afinidade para o seu substrato, permite o aumento da velocidade de uma reação não catalisada e pode ser modulada por ativadores ou inibidores. O elemento transdutor permite a conversão do sinal bioquímico, resultante da interação do analito com o elemento biológico, num sinal mais facilmente mensurável. A intensidade do sinal gerada será diretamente ou inversamente proporcional à concentração do analito. O elemento transdutor pode ser potenciométrico, ótico, piezoelétrico, calorimétrico ou eletroquímico, sendo o último o de uso mais comum devido ao seu baixo custo e simplicidade.

De acordo com a natureza do elemento biológico, os biossensores são divididos em dois grandes grupos:

I. Biocatalíticos – O biossensor é baseado numa reação catalisada por macromoléculas que se encontram no seu meio biológico habitual ou que foram previamente isoladas. Ocorre um contínuo consumo de substrato por parte do elemento biocatalítico incorporado no sensor, e são monitorizados os estados transientes ou de equilíbrio através de um detetor. Os elementos biocatalíticos usualmente utilizados são as enzimas, microrganismos ou tecidos. Desde a descoberta do primeiro biossensor por Clark and Lyons em 1962 (Clark et al., 1962; Sassolas et al., 2012), os quais imobilizaram a glucose oxidase na superfície de um elétrodo através do uso de uma membrana de diálise semipermeável, houve um avanço exponencial na área dos biossensores catalíticos. Estes baseiam-se na reação de um ou mais analitos, chamados de substratos (S), que reagem na presença de enzimas, tecidos ou microrganismos e libertam produtos (P) dessa reação. As reações baseiam-se no seguinte esquema geral:



A monitorização do consumo do substrato durante a reação pode ocorrer segundo diferentes estratégias e distinguir a geração dos biossensores. Os primeiros biossensores fabricados (1ª geração) utilizam como método de deteção a quantificação do substrato ou produto da reação enzimática (ex. depleção do oxigénio pela oxidase). Quando se promove a deteção da evolução do estado redox do centro ativo, cofator ou grupo prostético do agente biocatalítico na presença do substrato, usando um mediador imobilizado, estamos perante um biossensor de 2ª geração (ex: complexos de ruténio, quinonas, sais orgânicos). Atualmente estão em voga os biossensores de 3ª geração, que promovem a transferência direta de eletrões entre o eléctrodo de trabalho e o analito presente na amostra. A imobilização de enzimas continua a ser o passo limitante na formulação destes sensores, apesar de já existirem métodos eficazes neste campo (Ronkainen et al., 2010).

2. Não catalíticos – Baseiam-se na interação do analito com macromoléculas que foram isoladas do seu meio biológico ou modificadas (Aizawa 1991; Thevenot et al., 2001), sendo o seu elemento biológico de reconhecido por bioafinidade. Assim, não existe consumo do analito pelo agente imobilizado e normalmente atinge-se o equilíbrio químico. Os biossensores constituídos por imobilização de elementos de bioafinidade são na sua maioria baseados em reações imunoquímicas (ligação de um anticorpo a um antigene).

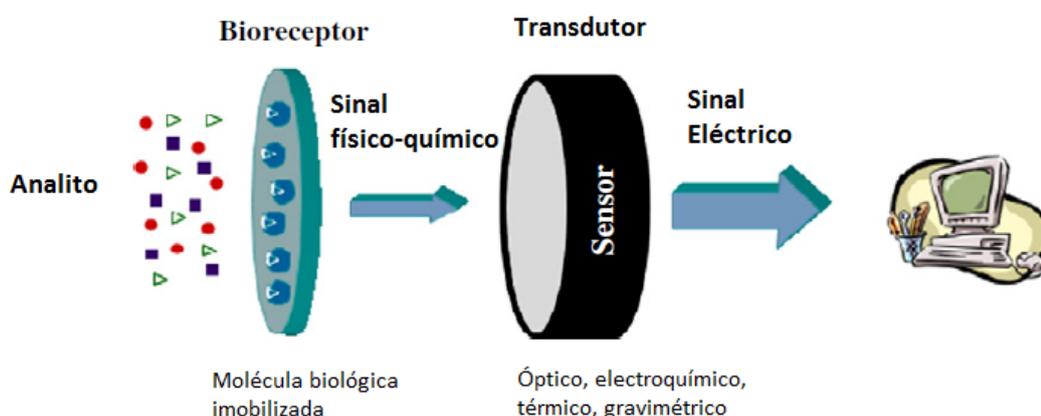


Figura 1.6 – Esquema de um biossensor. Adaptado de (Sassolas et al., 2012).

1.7.1 Métodos de imobilização de macromoléculas

Os processos de imobilização de enzimas na superfície do elemento transdutor adquirem um papel crítico no bom desempenho dos biossensores, principalmente no *design* do seu elemento biológico. Isto contribui para que se desenvolvam biossensores com parâmetros de seletividade, estabilidade, reprodutibilidade e sensibilidade de elevada qualidade. Para que não ocorram processos de desadsorção, as macromoléculas imobilizadas têm que manter a sua estrutura, função, atividade biológica e ligarem-se fortemente à superfície do eletrodo após a imobilização. Assim, diferentes métodos são indicados para diferentes macromoléculas e pequenas variações podem significar uma orientação menos conseguida da enzima na superfície do eletrodo. São várias as estratégias de imobilização que podem ser efetivadas: adsorção, encapsulação, ligação covalente, afinidade e *cross-linking*.

1.7.1.1 Adsorção

O método mais fácil e menos desnaturante de imobilização física de uma enzima num suporte sólido é a adsorção. (Andreescu et al., 2002; Andreescu et al., 2006). O procedimento consiste na simples deposição da enzima na superfície do eletrodo e na formação de ligações fracas como de Van Der Waal, electroestáticas e hidrofóbicas. Como não envolve qualquer funcionalização do material suporte nem ligações covalentes apresenta-se como um método não destrutivo para a atividade enzimática. Após o seu tempo de cura, normalmente demorado, é comum ocorrer a lavagem dos eletrodos num meio tampão para remoção do excesso de enzima adsorvida. São exemplos destes biossensores a imobilização de AchE em eletrodos *screen-printing* (Andreescu et al., 2006) e a adsorção de HPR em AuNPs depositadas na superfície de um eletrodo de ITO para medição de peróxido de hidrogénio (Wang et al., 2009).

1.7.1.2 Encapsulação

As enzimas podem ser imobilizadas em matrizes de três dimensões como filmes de eletropolimerização (Li G. et al., 2007), fotopolímeros (Corgier et al., 2005) géis de sílica (Liu et al., 2007), pastas de carbono (Fritzen Garcia et al., 2009) ou polissacarídeos; a que se dá o nome de encapsulação. No desenrolar destes protocolos não ocorre a modificação do elemento biológico e a atividade das enzimas é preservada durante o processo de imobilização. As suas possíveis desvantagens relacionam-se com a perda de enzima da superfície do eletrodo e a formação de barreiras de difusão.

Existem duas categorias de géis baseados em polissacarídeos: os sintéticos (ex: policrilamida) e os naturais (ex: alginato, agarose e quitosano). Estes últimos ao possuírem matrizes biocompatíveis providenciam um meio natural à enzima, não são tóxicos e permitem uma grande acessibilidade na troca de eletrões entre a enzima e o eléctrodo. O quitosano é um polissacarídeo linear (β -1,4) obtido da desacetilização parcial da quitina, o componente principal do exosqueleto de crustáceos ou insetos e da parede celular de fungos. Possui distintas propriedades químicas e biológicas devido aos grupos amino e carboxilo reativos presentes nas suas cadeias lineares de poliglucosaminas, o que lhe permite realizar facilmente modificações químicas. Na presença de água é um polissacarídeo insolúvel, mas devido aos seus grupos amina torna-se solúvel em soluções ácidas abaixo de pH 6.5. O grau de desacetilização necessário é de 80-85% (Krajewska 2004). A preparação dos filmes de quitosano está documentada na literatura (Krajewska 2004) e divide-se em quatro grupos: evaporação do solvente, neutralização, gelatinização ionotrópica e *cross-linking*. O desenvolvimento de biossensores eletroquímicos baseados no quitosano juntamente com nanotubos está também em investigação.

1.7.1.3 Ligação Covalente

Nesta técnica, a imobilização das enzimas nos suporte sólido é efetuada por uma ativação inicial da superfície do eléctrodo usando reagentes multifuncionais (ex: gluteraldeído, carboiimida). Os grupos funcionais pelos quais se dá esta ligação das enzimas à superfície ativa do eléctrodo não são essenciais para a atividade catalítica da biomolécula. Esta imobilização confere uma maior estabilidade da enzima comparativamente aos métodos referidos anteriormente, mas uma grande percentagem de proteína é desnaturada. Aliado à necessidade do uso de grandes quantidades de reagentes, este método revela baixa reprodutibilidade.

As carboimidias permitem a ligação entre os grupos carboxilo do material suporte e a função amina da enzima, bem como o seu inverso (fig.1.7). O gluteraldeído apresenta-se como um agente de *cross-linking* alternativo às carboiimidias, no entanto só possui grupos carboxilo, restringindo a sua ligação a grupos funcionais amina. Atualmente está em voga a utilização destes agentes aliados a diferentes métodos de imobilização. Existe o *cross-linking* das enzimas com nanotubos de carbono ou entre elas próprias (Pauliukaite et al., 2009) seguido de um processo de imobilização eficaz, por exemplo encapsulação com quitosano.

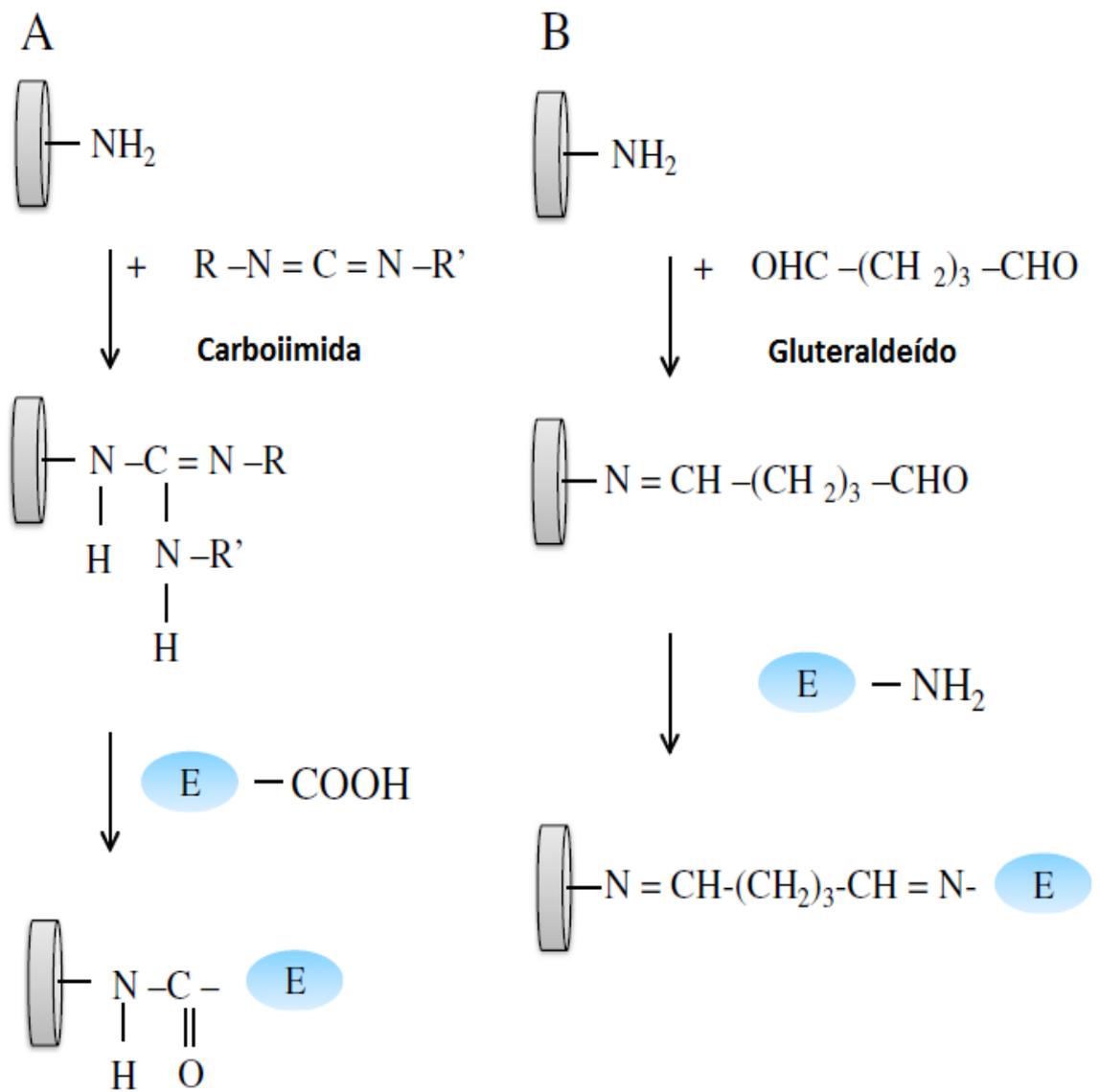


Figura 1.7 – Imobilização de enzimas por *cross-linking* com Carboimida (A) e Gluteraldeído (B).

I.8 Nanomateriais

Os nanomateriais apresentam características físico-químicas únicas dependentes da sua forma, morfologia e tamanho. Estas partículas possuem, por definição, dimensões inferiores a 100 nm e encerram um vasto campo de aplicação, desde dispositivos eletrónicos à composição de medicamentos. Na área da eletroquímica, a sua capacidade de facilitar a transferência de eletrões na catálise de metais de transição em inúmeras reações químicas, conferem a estes materiais uma importante aplicabilidade na construção de biossensores eletroquímicos. (Hrapovic et al., 2004). Um dos grandes desafios neste campo é a formulação de filmes/compósitos de nanomateriais apropriados à interação / acomodação de biomoléculas na superfície dos sensores. Dentro dos nanomateriais atualmente utilizados (Au, Pt, etc), os nanotubos de carbono assumem o papel do material mais promissor (Hu et al., 2010). Podem ser descritos como folhas de grafeno dobradas de forma cilíndrica e dependendo da sua quiralidade são considerados metálicos ou semicondutores. As suas morfologias são variáveis (McCreery 2008), mas as duas classes mais utilizadas são os nanotubos de parede única (SWNTs) e os de parede dupla (MWNTs). Os últimos possuem estados eletrónicos metálicos, enquanto os SWNTs se encontram numa mistura de estados eletrónicos metálicos e semicondutores. Os nanotubos de carbono aumentam a razão área/volume, promovem as reações de transferência de eletrões e diminuem os potenciais de diversos compostos (Agui et al., 2008).

A imobilização de biomoléculas com nanotubos de carbono tende a ser um processo mais eficaz, possibilitando uma melhor performance dos biossensores, por exemplo no contacto elétrico entre as proteínas hémicas e a superfície do eletrodo. Este fenómeno foi estudado por adsorção de Hb-MWNTs em grafite pirolítica e Mb-MWNTs adsorvidos em eletrodos de carbono vítreo, acoplamento de de Hb com MWNTs funcionalizados na presença de EDC (Zhang et al., 2007) ou por adsorção de HRP em MWNTs (Lee et al., 2006).

Materiais e Métodos

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Reagentes e Soluções

Todas as soluções foram preparadas em água ultra pura desionizada com resistividade superior (18MQ.cm) de um sistema de purificação de água Mili-Q (Millipore Company, Bedford, MA). Todos os compostos foram utilizados para preparação das soluções como recebidos.

2.1.1 Soluções de macromoléculas

Todas as macromoléculas em estudo foram adquiridas à Sigma Aldrich:

- ✓ Mioglobina – Obtida de coração de equino com 99.9 % pureza;
- ✓ Microperoxidase – Obtida de citocromo c de coração de equino, 85% pureza (HPLC);
- ✓ Hemina – Proveniente de bovino, pureza > 90%.

O quitosano (baixa massa molecular), p-benzoquinona, N-hidroxisuccionamida (NHS), 1-[3-(Dimetilamino)propyl]-3-etil carboiimida (EDC), cloreto de hexaminoruténio e o Nafion são também da Aldrich. Os nanotubos de parede dupla (MWNTs-COOH) funcionalizados com grupos carboxilo (PD15LI-5-COOH) foram obtidos à Nanolabs (USA). O ácido sulfúrico (H₂SO₄), o cloreto de potássio (KCl) e o hidróxido de sódio (NaOH) foram comprados à Panreac, enquanto que o ferricianeto (K₃[Fe(CN)₆])²⁺ foi cedido pela Merck.

Quitosano – Adicionou-se uma quantidade de 1% (W/V) de quitosano a uma solução de salino 0.9% a pH 7.4. Pela adição de HCl 1M procedeu-se à variação de pH até este estabilizar num valor aproximadamente de pH 5. De seguida manteve-se a solução em agitação durante cerca de 1h para garantir que todo o quitosano foi solubilizado.

MWNTs-COOH – Preparou-se uma solução stock de nanotubos (1mg/ml) pela adição de 1 mg do seu pó em 1 ml de água desionizada. A solução foi mantida em ultrassons durante 15 min.

Nafion – Este composto utilizou-se na sua forma comercial, ou seja, uma solução a 5% numa mistura de álcoois alifáticos e água.

Hemina – Tal como as outras macromoléculas a preparação da solução de hemina ocorreu em água mili-Q desionizada, no entanto adicionou-se uma solução de NaOH numa concentração de 20 mM. Uma boa solubilização da Hemina verificou-se a pH 10.

2.1.2 Soluções para a caracterização dos eléctrodos

Para caracterização dos eléctrodos *screen-printing* foram preparadas duas soluções de $(K_3 [Fe (CN)_6])^{2+}$ 5 mM em H_2SO_4 e KCl com concentração 0.1 M. Para os eléctrodos revestidos, formou-se uma suspensão de 1mg/ml de MWNTs-COOH que foi depositada (gota de 10 μ l) na superfície do eléctrodo com 24 horas de antecedência aos teste eletroquímicos.

Relativamente aos microeléctrodos de fibra de carbono, foi necessário a preparação de uma solução de ferricianeto com concentração de 10 mM a pH 3 e diluído em H_2SO_4 a fim de facilitar a difusão do analito na superfície do eléctrodo, uma vez que devido à sua pequena área de superfície foi elaborado um processo diferente de adsorção dos MWNTs. Este consistiu na preparação de uma suspensão de 100 mg/ml de MWNTs em 0.5% Nafion onde se procedeu ao *dipping* dos eléctrodos durante aproximadamente dois períodos de 10s. Após cada um destes períodos os eléctrodos foram colocados numa estufa a 180° C.

2.1.3 Eletrólito suporte

O tampão de fosfato salino (PBS) 0.05 M a pH 7.4 foi o eletrólito suporte escolhido para as medições eletroquímicas, tanto em processos de estudo de transferência de eletrões como para a medição de NO. Este possui a seguinte composição:

- ✓ 99,9 mM NaCl
- ✓ 39.9 mM Na_2HPO_4
- ✓ 1,8 mM NaH_2PO_4

Os fosfatos de sódio foram adquiridos à Sigma Aldrich e o cloreto de sódio foi fornecido pela Panreac. O PBS foi armazenado a 4° C e utilizou-se à temperatura ambiente (22°C).

2.2 Soluções padrão de óxido nítrico

Todo o processo para a obtenção do NO foi efetuado dentro de uma hote ventilada através de um sistema de vidro, com tubos e junções e teflon ou aço inoxidável com o intuito de evitar trocas gasosas e efeitos de corrosão por parte do oxigénio atmosférico

(Fig.2.1). O NO armazenado num cilindro (99.9% pureza) foi previamente purificado por passagem numa coluna de vidro que contém pastilhas de NaOH 5M e de seguida por um *trap* com 20 ml de NaOH 5M para remoção de traços de impureza de NO_2 , N_2O_3 e N_2O_4 (produtos de reação com o O_2). A função da coluna de vidro funciona como uma segurança à possível existência de refluxo da solução para a botija. As soluções de NO foram preparadas em tubos de vácuo (BD VacuteinerSystems, ref.366430) por borbulhamento de NO gasoso purificado durante 20 min num volume de água ultra pura desionizada, previamente desareada com argon ultra puro (99.9%). A concentração final das soluções saturadas é de idealmente 2 mM se todas as condições forem ideais, ou seja, é necessário que não existam fugas no sistema, todos os tempos de execução do processo devem ser respeitados e a temperatura deve ser aproximadamente 22 °C.



Figura 2.1 – Sistema de purificação e preparação de soluções *stock* de NO. Este processo ocorre no interior de uma *hotte* com sistema de ventilação.

A retirada das alíquotas da solução *stock* procedeu-se via seringas Hamilton (Microliter serynges, ref. 1702) à prova de gás com êmbolos de teflon como exemplificado na Fig. 2.2. Neste processo é necessário evitar colocar o tubo numa posição horizontal, a fim de evitar o contacto entre a solução de NO e a borracha à prova de gás, uma vez que o contacto prolongado pode provocar a sua decomposição. Antes da inserção da seringa, esta deve ser lavada exaustivamente com água desionizada miliQ para remover possíveis contaminações de utilizações anteriores e/ou vestígios de oxidação por parte do êmbolo. O

uso de uma solução *stock* de NO está limitada ao número de transferências efetuadas (máx.20) e ao seu tempo de vida, cerca de dois dias. Após este período, a selagem por parte da borracha começa a perder eficácia e existe a possibilidade de reação do NO com o oxigénio atmosférico.

Após a utilização do gás fez-se a purga do sistema com árgon durante alguns minutos. Nas soluções preparadas para utilização em sistemas “in vivo” procedeu-se ao dearejamento de PBS em vez de água, no sentido de mimetizar o melhor possível as condições de pH e força iónica.

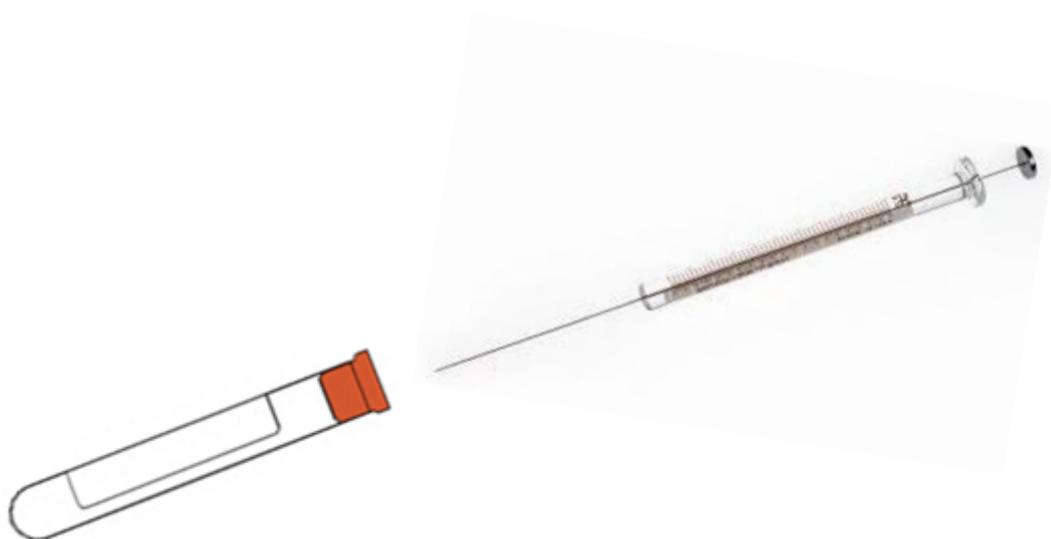


Figura 2.2 – Método de transferência da solução *stock* de NO para a célula eletroquímica.

2.3 Processos de imobilização

Como descrito na parte introdutória, a utilização de matriz de quitosano para a imobilização de macromoléculas tem vindo a aumentar, sendo que no entanto existem diferentes variantes para a realização deste procedimento (Yi et al., 2005). Neste trabalho deu-se foco à utilização da benzoquinona como meio de imobilização da solução de Quitosano/MWNTs/Macromoléculas na superfície do eléctrodo. Este processo consiste na solubilização do quitosano numa solução de salino através da diminuição do pH abaixo do seu pKa, para que seja possível a formação de uma dispersão com as macromoléculas e MWNTs-COOH. Já com a benzoquinona em solução, aplica-se um potencial de cerca de -0.6 V ao eléctrodo de trabalho. Esta voltagem é suficiente para que ocorra a redução dos dois prótons da benzoquinona (fig. 2.3), o que promove o aumento do pH junto do eléctrodo. Este aumento de pH leva à insolubilização do quitosano, que “arrasta” consigo os MWNTs e as macromoléculas para a superfície do eléctrodo (Zhou et al., 2007). O processo está dependente de um cuidadoso acerto de pH da solução de quitosano e da quantidade de benzoquinona dissolvida, já que a preparação não é feita num meio de tampão.

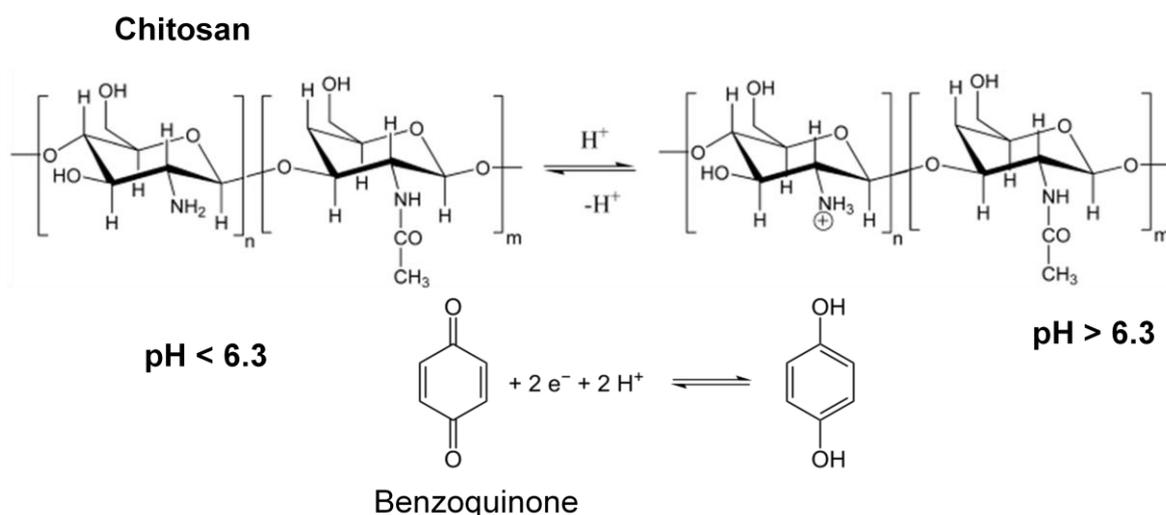


Figura 2.3 – Processo de imobilização do quitosano derivado da redução da benzoquinona.

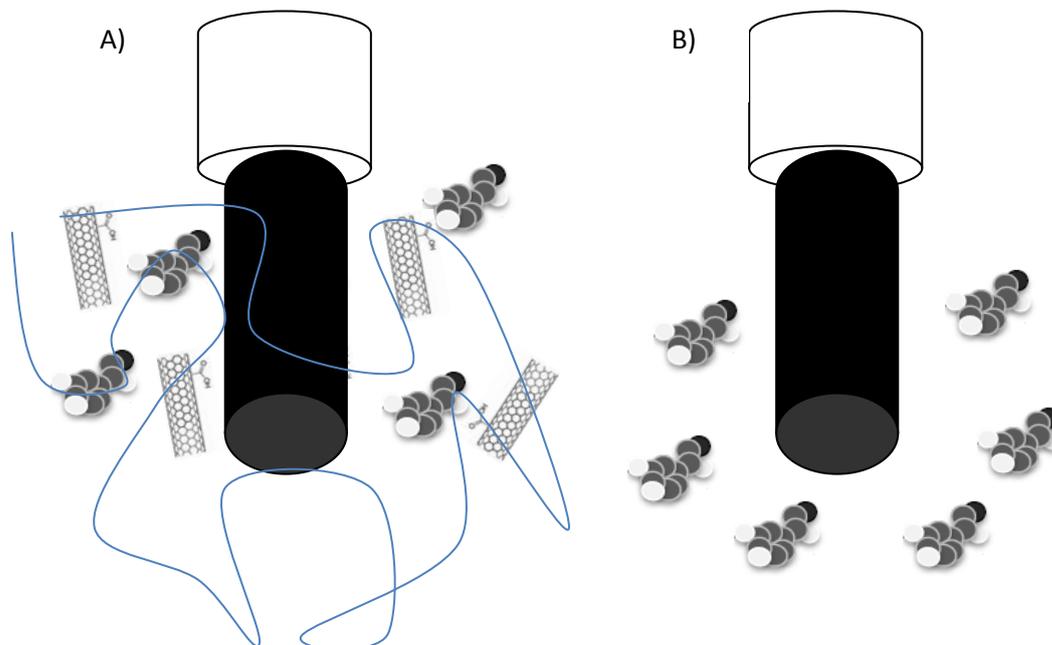


Figura 2.4 – Esquema da imobilização das macromoléculas na superfície de um microeléctrodo de fibra de carbono. A- Eletropolimerização da matriz de quitosano; B- Adsorção.

A figura 2.4 permite observar o processo de imobilização que ocorre quando se procede ao método descrito anteriormente. A matriz de quitosano permite que exista a troca de electrões entre as macromoléculas e o eléctrodo de carbono através de uma boa disposição geométrica na sua superfície. Por outro lado, promove o “aprisionamento” dessas mesmas moléculas, evitando processos de desadsorção.

As interações entre as macromoléculas (mioglobina, microperoxidase e hemina) e os MWNTs-COOH com o quitosano podem ser de carácter hidrofóbico ou electroestático, o que por vezes se revelam ligações fracas. Para a promoção de ligações mais robustas, utilizou-se um agente de *cross-linking* (EDC) juntamente com um estabilizador (NHS). Este permite que haja a ligação covalente das macromoléculas aos MWNTs-COOH e ao quitosano (Fig.2.5). O processo demora cerca de 1 hora sob agitação constante.

O processo de adsorção foi também testado e funcionou como um meio de comparação relativamente aos outros métodos utilizados e encontra-se exemplificado na figura 2.4 B.

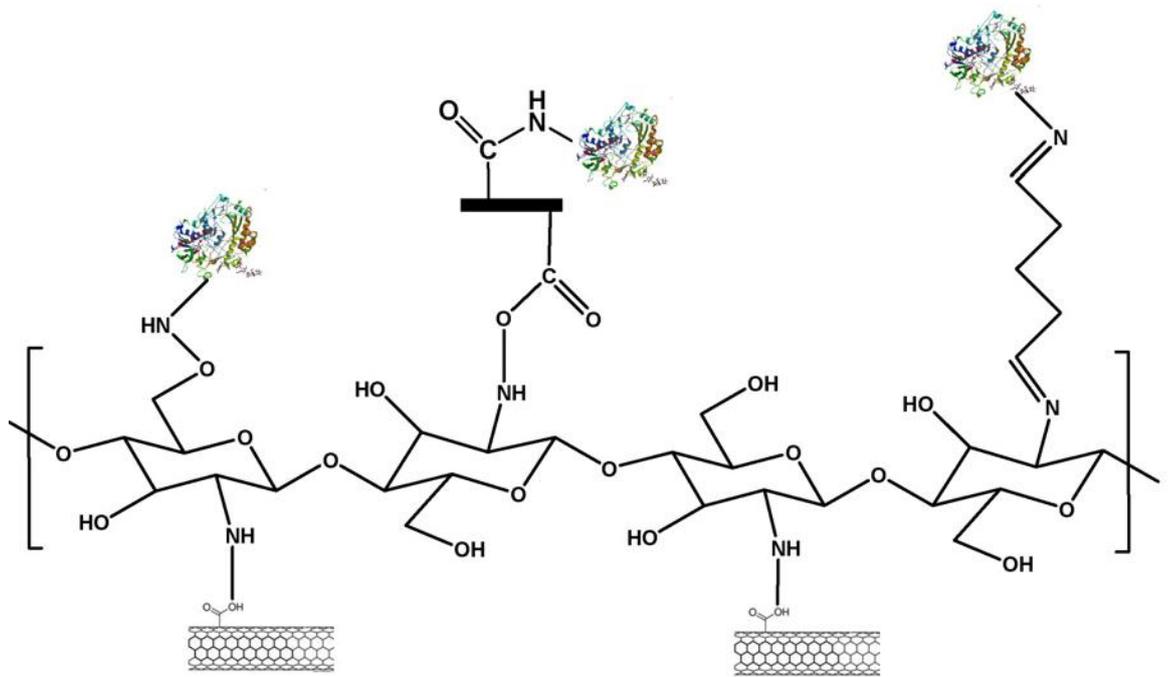


Figura 2.5 – Esquema da ligação das macromoléculas aos MWNTs e ao quitosano.
Adaptado de (Ghica et al., 2009).

2.4 Métodos eletroquímicos

Os métodos eletroquímicos aplicados foram a voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada, os quais se baseiam na relação existente entre os fenômenos químicos de transferência de carga e as propriedades elétricas daí resultantes, podendo essa relação ser utilizada em determinações quantitativas. A transferência de carga pode ser homogênea ou heterogênea se acontecer em solução ou junto da superfície do eletrodo.

Os sistemas de oxidação-redução têm subjacentes a si a troca de elétrons entre duas espécies, e a voltametria permite medir a corrente produzida durante estes processos através da aplicação de um potencial ao eletrodo de trabalho. Esta voltagem é depois transformada num sinal elétrico com a ajuda de um potencióstato. Para que o potencial se mantenha constante ou varie consistentemente, é necessário utilizar um eletrodo de referência de baixa impedância, evitando a passagem de corrente por este. Neste trabalho utilizou-se um sistema de três eletrodos (Fig 2.6) para medições *in vitro*, constituído por um eletrodo de trabalho, um eletrodo de referência (Ag/AgCl) e um contra-eletrodo de platina. No circuito principal a corrente elétrica é medida entre o eletrodo de trabalho e o contra eletrodo, enquanto no auxiliar mede-se a diferença entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência.

Já para medições *in vivo* deu-se preferência a uma configuração de apenas dois eletrodos, o que evita danos maiores no sistema. Isto é possível devido à corrente reduzida que passa no circuito, permitindo que o potencial do eletrodo de referência se mantenha constante.

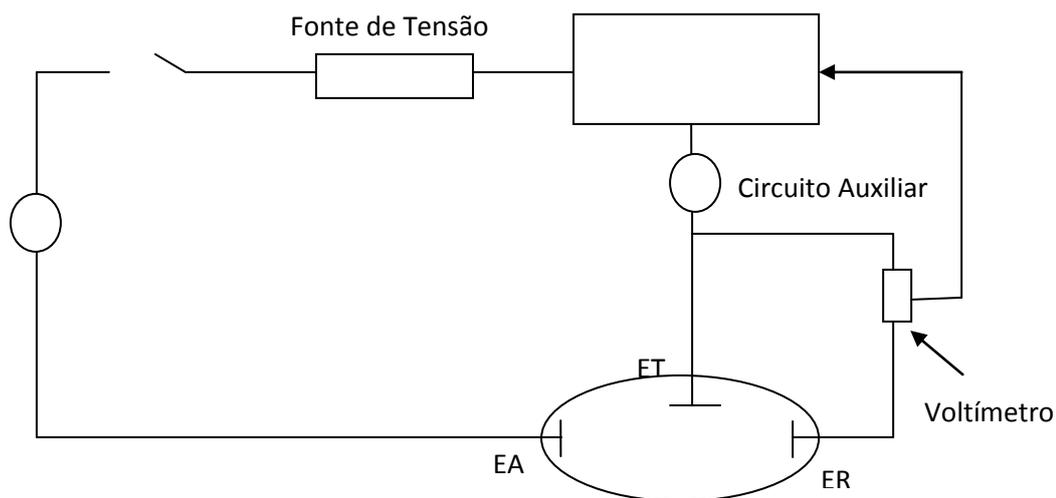


Figura 2.6 – Representação de um circuito de três eletrodos: ET- eletrodo de trabalho; ER – eletrodo de referência; EA – eletrodo auxiliar.

2.4.1 Voltametria cíclica

A voltametria cíclica é uma técnica eletroquímica de microanálise, portanto apenas uma pequena parte da solução é modificada pelo processo que ocorre no eletrodo. É uma das técnicas mais usadas para estudar sistemas eletroquímicos e permite determinar parâmetros cinéticos, velocidade e mecanismos subjacentes, ou seja, fornece informações qualitativas e quantitativas de uma espécie em solução a partir do registo das curvas corrente-potencial durante a sua eletrólise.

Nesta técnica o potencial do eletrodo de trabalho varia linearmente em função do tempo (Fig. 2.7), conhecida como velocidade de varrimento (V/s). Como demonstrado pela forma da onda, o varrimento produz um pico de corrente para qualquer analito, começando num potencial inicial (E_i) que aumenta na direção do varrimento até ao potencial de inversão (E_λ) onde ocorre a reversão do potencial novamente até E_i , iniciando-se um novo ciclo. Estes dados são então colocados num gráfico corrente (I) versus potencial (E), o que permite estudar os processos de oxidação-redução de um sistema reacional, tendo sempre em conta a direção do potencial; a este gráfico dá-se o nome de voltamograma.

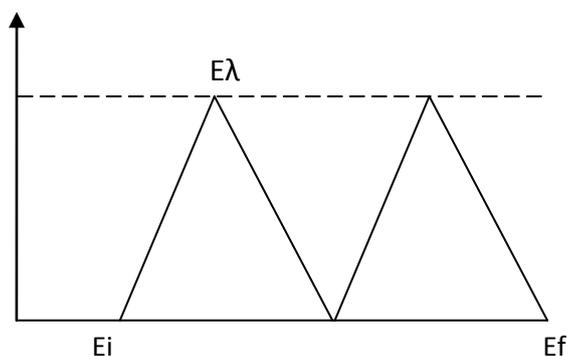


Figura 2.7 – Variação do potencial ao longo do tempo durante dois ciclos consecutivos. Potencial inicial (E_i); potencial de reversão (E_λ) e potencial final (E_f).

No entanto, os sistemas reacionais apresentam diferentes parâmetros cinéticos, o que permite serem designados de reversíveis, quasi- reversíveis e irreversíveis e estão resumidos na tabela 2. Os parâmetros eletroquímicos mais importantes são os potenciais de pico catódico e anódico (E_{pc} e E_{pa}), as correntes de pico catódico e anódico (I_{pc} , I_{pa}), os potenciais de meia-onda ($E_{1/2}$) e de pico a meia altura ($E_p/2$). A observação da dependência da corrente em relação à velocidade de varrimento permite que se obtenham informações sobre o processo de transferência de eletrões, processos eletroquímicos de imobilização e reações químicas acopladas.

Tabela 2 – Parâmetros cinéticos para avaliação do comportamento de reacções eletroquímicas.

Reversíveis	Irreversíveis	Quasi-reversíveis
$\Delta E_p (E_{pa} - E_{pc}) = 59/n$ (mV)	Ausência do pico de reversão	I_{pc} aumenta com \sqrt{v}
$I_{E_{pa}/E_{pc}} = 1$	$ E_p - E_p/2 = 48\alpha n$ (mV)	$I_{pa}/I_{pc} = 1$ se $\alpha = 0.5$
E_p independente de \sqrt{v}	E_{pc} desloca-se $-30/\alpha n$ por aumento de $10 \times \sqrt{v}$	$\Delta E_p = 58/n$ (mv) e aumenta com \sqrt{v}
$ E_p - E_p/2 = 59/n$ (mV)	$I_{pc} \propto \sqrt{v}^{1/2}$	E_{pc} desloca-se negativamente com aumento de \sqrt{v}
$I_{pc} \propto \sqrt{v}^{1/2}$		

Interessa também referir que nos processos reversíveis em que a espécie é adsorvida ao eléctrodo, os parâmetros cinéticos sofrem de algumas modificações, sendo de realçar:

- ✓ $I \propto \sqrt{v}$;
- ✓ $\Delta E = 0$;
- ✓ $W_{1/2} = 91/n$ (mV).

Com o aumento da velocidade de varrimento, o sistema tende a perder a sua reversibilidade devido ao afastamento progressivo dos picos catódicos e anódicos, a curva de corrente versus o potencial perde a sua simetria.

2.4.1.1 Voltametria Cíclica de varrimento rápido

Após todos os passos de construção dos microelétrodos estarem concluídos, procedeu-se à sua avaliação. Este processo foi efetuado num potenciostato EI-400 (Ensmann Instruments, Bloomington, USA) por voltametria cíclica de varrimento rápido que permite atingir velocidades de até 1000 V/s. É aplicada uma onda triangular (-0.4 a +1.6 V vs. Ag/AgCl) aos microelétrodos de carbono o que permite oxidar as fibras de carbono, melhorando a sua sensibilidade (Hafizi et al., 1990). Os perfis dos elétrodos são monitorizados num osciloscópio digital (Tektronix TDS 220, Portland OR, USA), o que permite tirar conclusões acerca das propriedades elétricas apropriadas. Um microelétrodo com boas propriedades elétricas adquire um comportamento mais capacitivo do que resistivo (Stamford 1990) como resultado de uma boa selagem entre o capilar e a fibra de carbono e um efetivo contacto elétrico entre os componentes do elétrodo.

Geralmente, os microelétrodos com perfis elétricos capacitivos tendem a ter picos transitórios nos pontos de inversão do potencial e dão origem a medições eletroquímicas com baixo ruído de background, tempo de resposta rápido e picos de oxidação-redução bem visíveis. Por outro lado, os maus microelétrodos apresentam um comportamento resistivo devido à deficiente selagem, que pode derivar dos parâmetros do *puller*, e mau contacto elétrico entre a fibra de carbono e o fio de cobre. Visto só os elétrodos considerados bons serem utilizados para realização de experiências, cabe ao operador confirmar a selagem proveniente do *puller* e sob um microscópio ótico otimizá-la, aumentando assim o seu rendimento.

2.4.2 Voltametria de Onda Quadrada

Nesta técnica é aplicada uma onda quadrada de amplitude de impulso ΔE_p a um potencial em escada com degraus de amplitude ΔE_s e com um período t . São depois efetuadas medições de pares de correntes (t_1 e t_2) para cada período de onda (ciclo),

começando num t_0 . A onda é construída pela aplicação de um impulso de potencial positivo e negativo em cada metade do ciclo.

A leitura da corrente é feita no final dos impulsos diretos e inversos e o sinal que se obtém corresponde à intensidade da corrente resultante, ou seja, um voltamograma de onda quadrada é um gráfico da diferença entre estas duas correntes em função do potencial.

A voltametria de onda quadrada apresenta diversas vantagens relativamente à voltametria cíclica, de salientar:

- ✓ A corrente total (I_t) tem maior amplitude do que a corrente directa e inversa, portanto a sua leitura é mais facilitada;
- ✓ Minimização da contribuição da corrente capacitiva para o sistema;
- ✓ Não existe a necessidade da exclusão do oxigénio da célula eletroquímica, visto que as correntes directas e inversas irão incorporar igual amplitude resultante da redução do O_2 (Monk 2001).

Neste trabalho, os registos foram obtidos numa janela de potencial entre 0 V e -1.2 V, com uma velocidade de varrimento 125 mV/s e uma frequência de 25 Hz.

2.5 Microscopia de varrimento eletrónico

O microscópio de varrimento eletrónico permite a produção de imagens de alta resolução da superfície de uma amostra, uma vez que devido à maneira como as imagens são criadas, estas tem uma aparência tridimensional útil para avaliar a estrutura superficial da amostra. O princípio de funcionamento desta técnica baseia-se na incidência de um feixe de eletrões na superfície da amostra alvo numa gama de tensão entre umas centenas de volts até 100 KV, que passa através de um sistema de lentes eletromagnéticas. Ou seja, os eletrões são emitidos por um filamento de tungsténio (cátodo) e acelerados através de um ânodo. O tungsténio é normalmente o material de eleição devido ao seu elevado ponto de fusão, permitindo que seja aquecido para a emissão de eletrões. A interação da energia com a amostra resulta na emissão de eletrões secundários, os quais permitem a formulação da imagem da amostra. No caso de amostra não metálica é necessário que estas sejam cobertas com uma camada de material condutivo; através de evaporação de alto vácuo ou *sputter* de baixo vácuo é depositada uma camada ultrafina de material eletricamente condutivo na superfície da amostra (Au) (de Groot et al., 2005; Barbosa et al., 2008).

Esta técnica apresenta uma grande profundidade de campo, o que permite a focagem de uma elevada área da amostra de uma só vez. Aliado a isto, a sua ampliação pode ir até cerca de 300.000 vezes (Ghica et al., 2009).

2.6 Caracterização da Resposta dos Eléttodos

2.6.1 Sensibilidade

A determinação da sensibilidade dos eléctrodos a NO efetuou-se pela técnica eletroquímica de onda quadrada em modo estacionário. A janela de potencial estabelecida de 0 V a -1.2 V permitiu a visualização de um pico relativo à redução do NO a aproximadamente $-0.84 \text{ V} \pm 0.02 \text{ V}$ no caso dos eléctrodos *screen-printing* e de $-0.78 \text{ V} \pm 0.002 \text{ V}$ para os microeléttodos de fibra de carbono. Após se atingir uma linha de base estável (cerca de 10 scans) efetuou-se a calibração do eléctrodo através da adição de diferentes concentrações de NO. Para facilitar a leitura no incremento da corrente decorrido da adição do analito, efetuou-se uma subtração relativamente à linha de base. Este processo realizou-se com o auxílio do potencióstato AUTOLAB PSTAT 12 (ECO-CHEMIE) controlado pelo software GPES. Os eléctrodos usados na monitorização de NO exógeno “in vivo” foram calibrados antes e depois da sua inserção no cérebro de rato. Para esta operação usou-se o IVIUM Compactstat com o *software* Iviumsoft e a janela de potencial fixou-se entre 0 V e -1V.

2.6.2 Limite de detecção

No cálculo do limite de deteção (LOD), utilizou-se a determinação do desvio padrão da reta de calibração dividida pelo seu declive pela seguinte fórmula:

$$\text{L.O.D} = 3 \times \text{SD}/m.$$

O desvio padrão é calculado pela selecção de um pequeno troço de cada linha de adição, que tem em conta o ruído do sistema. Já o declive é obtido pela construção de um gráfico de I vs. [NO].

2.6.3 Seletividade

A técnica de onda quadrada foi também utilizada para o estudo da resposta do electrodo a potenciais interferentes do NO. Testou-se a sua resposta a injecções de 80 μM nitrito, 8 μM dopamina, 250 μM ácido ascórbico e 20 μM de peróxido de hidrogénio. A selectividade é calculada pelo rácio da corrente produzida pela adição de uma determinada concentração de NO e a mesma concentração de um potencial interferente.

2.6.4 Eléttodos *Screen-printing*

A impressão de eléctrodos de pasta de carbono é feita num material isolante como PVC ou cerâmica de alumina. A fabricação de eléctrodos impressos consiste no depósito de um filme num dos suportes referidos anteriormente, que é posteriormente coberto por uma camada isolante para definir uma área de contacto eléctrico (Tudorache et al., 2007). A maior atração do uso de eléctrodos impressos deve-se à agregação do eléctrodo de trabalho, de referência e contra-eléttrodo num único dispositivo (Figura 2.8). O processo de fabricação destes eléctrodos inclui várias etapas relativamente à preparação e seleção da tinta, seleção de suporte, impressão, secagem e cura. As temperaturas de secagem e cura são na maior parte das vezes realizadas numa etapa comum e variam entre temperatura ambiente e 1000°C. A condutividade eléctrica é garantida pelo uso de uma tinta metálica condutora (Ag, Au, Pt) na primeira camada. Posteriores camadas devem posicionar-se exatamente sobre a primeira a fim de evitar o contacto entre o metal e o electrólito. A utilização de uma pasta de carbono como matéria-prima na confeção dos eléctrodos “*screen-printing*” deve-se às extraordinárias características deste substrato. Apresenta elevada inatividade química e eletroquímica, elevado sobrepotencial para a produção de hidrogénio e oxigénio, baixa corrente residual, alta condutividade eléctrica e fácil regeneração da superfície.

Os eléctrodos *screen-printing* de base de carbono (c110) foram adquiridos à DropSens® (Asturias, Spain). A dimensão geral da strip que alberga os três eléctrodos é de 3.4 x 1 x 0.05 cm, sendo o contra-eléttrodo de carbono e o eléctrodo de referência de prata.

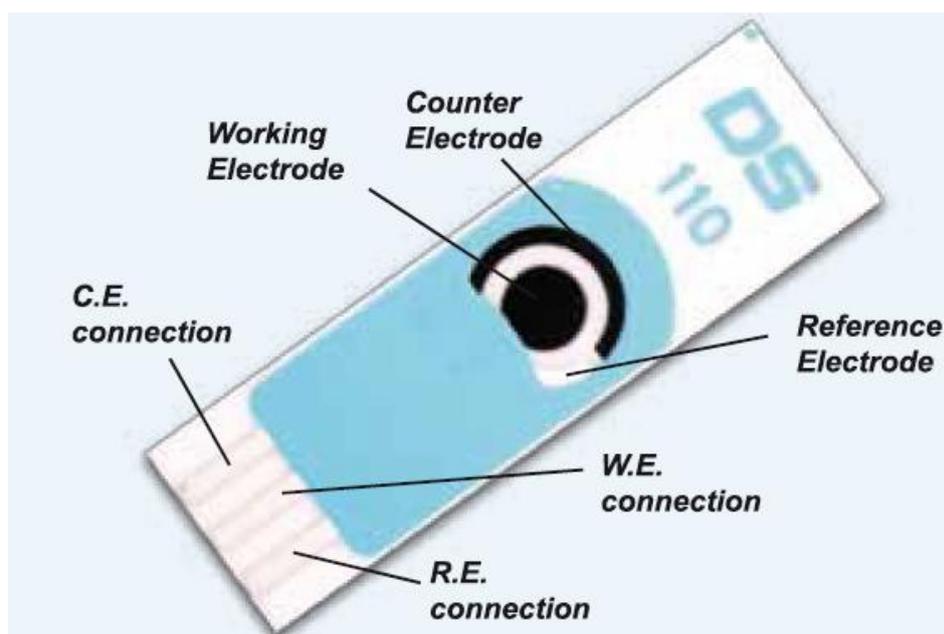


Figura 2.8 – Dispositivo “screen-printing” com um sistema de três electrodos. Electrodo comercial da DropSens®, ref c110.

2.6.4.1 Modificação da superfície dos electrodos Screen-printing

A sua modificação procedeu-se por diferentes métodos:

- 1) Adsorção das macromoléculas na superfície dos *screen-printing* revestidos com MWNTs-COOH. Foi preparada uma dispersão de 1 mg/ml por diluição de 1 mg de MWNTs-COOH em 1 ml de água ultra pura desionizada seguido de uma ultra-sonicação durante 15 min. Os electrodos foram revestidos com MWNTs através da colocação de uma gota de 10 μ l, deixados a secar durante 24 h e por fim foram imobilizadas as macromoléculas pela deposição de uma gota de 10 μ l na superfície dos electrodos com concentrações entre 0.01 a 1mg/ml. Todas as macromoléculas foram previamente colocadas em água Mili-Q desionizada a pH 6.4, com exceção da hemina que necessita de um pH \geq 10 para se obter uma solução límpida.
- 2) Hemina e MWNTs em *cross-linking* com quitosano usando EDC. Uma suspensão de 50 μ l de MWNTs/Hemina foi misturada com 266 μ l de quitosano. De seguida, adicionou-se 121 μ l de NHS (50 mg/ml) e 63 μ l de EDC (10 mg/ml) com a restante solução em agitação. O electrodo de trabalho foi coberto com uma gota de 50 μ l desta solução e a benzoquinona foi reduzida a um potencial de -0.6 V vs. Ag/AgCl durante 300 segundos. A sua redução provocou um aumento do pH local, permitindo a insolubilização do

quitosano e a imobilização da hemina na superfície do eléctrodo. De seguida o eléctrodo foi mergulhado em água desionizada para remoção do material não imobilizado.

2.6.5 Microelctrodos de fibra de carbono

O processo de fabricação dos microelctrodos de fibra de carbono iniciou-se pela inserção das fibras de 30 μm em capilares de borosilicato (1.16 mm id x 2.0 od; Harvard Apparatus Ltd; UK.) sobre um plano inclinado (Fig. 2.9). Devido ao tamanho reduzido das fibras foi necessário o auxílio de uma pinça de cirurgia e uma boa fonte de iluminação.

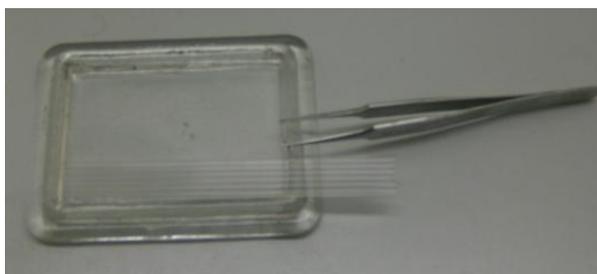


Figura 2.9 – Fotografia do suporte e processo de inserção das fibras de carbono nos capilares de vidro.

De seguida os capilares já com a fibra inserida foram submetidos ao estiramento num puller vertical (Harvard Apparatus Ltd, UK). Neste é possível variar a força de tensão e o aquecimento do filamento e foram necessários vários ensaios para se obterem os parâmetros adequados a uma boa selagem (*heat 8; pull 6*). A força de tensão vertical da fibra permite que esta não se quebre aquando da divisão do capilar de vidro e se prolongue alguns centímetros para lá da zona de selagem (Fig.2.10). Normalmente apenas uma das metades do capilar reúne as condições necessário para a fabricação de um bom eléctrodo, sendo as outras descartadas.



Figura 2.10 – Fotografia do *puller* usado no estiramento dos capilares de vidro contendo no seu interior uma fibra de carbono.

A fibra de carbono foi de seguida visualizada num microscópio ótico invertido (Olympus CK2, Japão) com ampliação 200x para verificação pormenorizada da selagem. Com uma tesoura de cirurgia e com ajuda de uma microescala embutida numa das oculares formou-se uma ponta entre $200 \pm 50 \mu\text{m}$, essencial para aprimorar as características dos eléctrodos a nível de sensibilidade e inserção em tecido cerebral. Para estabelecimento de contacto eléctrico entre o eléctrodo e o aparelho de monitorização inseriu-se um fio de cobre com ambas as extremidades descarnadas dentro do capilar, previamente preenchido com cola de prata (RS, UK).



Figura 2.11 – Fotografia representativa de um microeléctrodo de fibra de carbono finalizado.

2.6.5.1 Modificação da superfície dos microeléctrodos de carbono

Foram usados três procedimentos para a preparação dos biossensores:

- 1) Adsorção de Hemina na superfície dos microeléctrodos de fibra de carbono (CFM), sensores s designados CFM/Hemina/MWNTs. Criou-se uma dispersão de MWNTs em água através da adição de 1mg de MWNTs em 1 ml de água desionizada seguido de ultrasonicação durante 15 min. Os CFM foram previamente revestidos com MWNTs por método de *dipping* e deixados a secar durante 1 hora a temperatura ambiente. Depois foi adsorvida Hemina em concentração 0.3 mM, previamente dissolvida em 20 mM NaOH.
- 2) Co-electrodeposição da Hemina e MWNTs com quitosano (CFM/Hemina/MWNTs/Quit). Quitosano a 1% (w/v) foi solubilizado em 0,9% NaCl sob agitação durante algumas horas a pH entre 4-5. Formou-se uma suspensão de 1mg/ml de MWNTs e 20 mg/ml de hemina por adição de hemina em pó e MWNTs a uma solução aquosa de 20 mM NaOH. A solução final para a electrodeposição consistiu na mistura de 40 μ l de quitosano (1%) com uma suspensão de 40 μ l de MWNTs/Hemina seguida da adição de p-benzoquinona. O eléctrodo foi mergulhado em 50 μ l desta solução e a benzoquinona foi reduzida a um potencial de -0.5 V vs.Ag/AgCl durante 300 segundos. A sua redução provocou um aumento do pH local, permitindo a insolubilização do quitosano e a imobilização da hemina na superfície do eléctrodo.

3) Hemina e MWNTs em cross-linking com quitosano usando EDC (CFM/Hemina/MWNTs/Quit-EDC). Uma suspensão de 50 µl de MWNTs/Hemina foi misturada com 266 µl de quitosano. De seguida, adicionou-se 121 µl de NHS (50 mg/ml) e 63 µl de EDC (10 mg/ml) com a restante solução em agitação. A eletrodeposição foi efetuada com o mesmo protocolo referido no ponto 2. Os microsensores controlaram seguiram os mesmos protocolos de imobilização, mas os revestimentos foram realizados sem MWNTs.

2.7 Experiências “in vivo”

2.7.1 Cirurgia estereotáxica

Os ratinhos foram anestesiados com uretano (1.25 g/Kg) através de uma injeção intraperitoneal. Assume-se que os animais anestesiados com uretano demonstram comportamentos fisiológicos semelhantes aos não anestesiados (Hara et al., 2002). Após resposta negativa ao teste de puxar uma das patas, são colocados numa plataforma estereotaxia (StoeltingCo,USA). Um *pad* isotérmico (BrainTree Scientific, USA) foi usado para a manutenção da temperatura corporal nos 37°C. Os animais foram acomodados na plataforma estereotaxia por inserção de barras metálicas nos canais auditivos até efetivo rompimento do tímpano, reconhecido pela emissão de um som característico. A boca foi também fixada com a ajuda de uma barra incisora. Após apropriada fixação do animal, usou-se uma lâmina para efetuar uma pequena insição no meio do crânio, mantendo-a aberta com a ajuda de presilhas. Toda a área do crânio exposta foi limpa com algodão embebido em 0.9% NaCl e os tecidos pericraniais transparentes foram removidos. Por visualização microscópica (MeijiEMZ13, Japão) identificaram-se duas importantes regiões anatómicas: o bregma e o lambda que foram assinaladas com um marcador permanente. Usando como referência o bregma identificou-se e removeu-se (3x4mm) a região do crânio em estudo pelo uso de uma ferramenta de perfuração (Dremel). De seguida retirou-se a restante dura mater pelo uso de *forceps* para expor totalmente a superfície cerebral, evitando durante o processo a danificação dos vasos sanguíneos superficiais. Adicionalmente efetuou-se uma perfuração de menor diâmetro (1mm) afastada da área anterior para inserção do eletrodo de referência (eletrodo Ag/AgCl preparado pela anodização de um fio de prata (GoodFellow, UK) durante 10 min.

2.7.2 Modelos animais

Todos os procedimentos com animais foram aprovados pela instituição do bem-estar animal e pelo comité das boas práticas da utilização animal, e estão de acordo com a Diretiva do Conselho da Comunidade Europeia para o tratamento e manuseamento de animais de laboratório (86/609/ECC). Os animais foram armazenados no biotério do Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra num ciclo de 12:12 dia/noite com livre acesso a comida e água. Para validação da medição de NO exógeno foram usados ratinhos machos *Wistar* (com idade de 8-10 semanas) provenientes de Charles River (Barcelona).

2.7.3 Preparação e inserção do *array* para medições *in vivo*

A injeção de NO exógeno no cérebro foi efetuada por uma micropipeta de vidro inserida conjuntamente com o microeléctrodo e a uma distância deste entre 200-300 μm . As micropipetas foram preparadas partindo um capilar de vidro (0.58 mm i.d x 1.0 mm o.d.; AM, Systems Inc., USA) num *puller* vertical (Sutter Instruments CO, Model p30, USA). A ponta da micropipeta estirada foi posteriormente encostada a uma superfície rígida até perfazer um diâmetro interno de 10-15 μm . De seguida formou-se um *array* entre o microeléctrodo e a micropipeta usando cera previamente aquecida (Kerr Brand Kerr Lab Corporation, Orange, CA). Antes da sua inserção no cérebro a micropipeta foi preenchida com uma solução de NO saturada utilizando um microfilamento (Microfil, World Precision Instruments, UK) ligado a um filtro estéril, que por sua vez se encontrava conectado a uma seringa.

Para posicionamento do *array* no cérebro na região em estudo utilizaram-se as coordenadas calculadas com base atlas cerebral do rato (Paxinos and Franklin, 2001; Paxinos and Watson, 2007), usando-se a ponta do eléctrodo como referência no Bregma. Por fim o NO foi injectado por aplicação de pressão na micropipeta pelo sistema Picospritzer III (Parker Hannifin Corp., General Valve Operation, USA), usando pulsos de pressão entre 0.2 e 2 s e 5-20 psi. O volume injectado (nanolitros) foi quantificado pelo decréscimo da solução da micropipeta por uma régua divisória do microscópio (Meiji EMZ13, Japão).

2.8 Instrumentação Eletroquímica

Os resultados deste trabalho foram obtidos utilizando o potenciostato AUTOLAB PSTAT 12 (ECO-CHEMIE) controlado pelo *software* GPES, como representado na figura 2.12 A . A sua ligação com os elétrodos da célula eletroquímica foi efetuada recorrendo a um cabo próprio (ref: μ 2AUT70306). Na sua extremidade, o cabo possui quatro ligações em formato banana para o eléctrodo de referência, contra-eléctrodo, eléctrodo de trabalho e uma ligação à terra. Devido ao formato das ligações dos elétrodos *screen-printing*, foi necessário recorrer a um segundo cabo (ref: CAC), (Fig. 2.12 B).

A)



B)



Figura 2.12 – Potenciostato Metrohm / Eco Chemie Autolab Series Potentiostat/Galvanostat Electrochemical Systems /AUTOLAB PSTAT 12 (A); Cabo conector para elétrodos *screen-printing*, catálogo da Dropsens® (ref.CAC) (B).

Os registos dos varrimentos de voltametria cíclica foram obtidos entre +0.1 e -1V, com velocidade de varrimento entre 0.005 e 20 V, utilizando uma amplitude de 25 Hz e um “step” de 5 mV. No método de onda quadrada, a janela de potencial foi de 0 V e -1.2 V, com uma velocidade de varrimento 125 mV/s e uma frequência de 25 Hz.

As experiências “in vivo” foram monitorizadas pelo IVIUM Compactstat controlado pelo *software* Iviumsoft (Fig.2.13) e apenas se utilizou o método de onda quadrada com os parâmetros referidos anteriormente.



Figura 2.13 – Interface eletroquímica IVIUM Compactstat, IVIUM Technologies.

2.9 Análise dos resultados

Os resultados obtidos são apresentados no texto como os valores médios \pm SEM. Todas as análises estatísticas foram efetuadas recorrendo ao software GraphpadPrism 5, sendo o significado estatístico das diferenças entre os valores médios dos grupos avaliados através do teste t de Student. Nos testes estatísticos entre diferentes conjuntos de dados usou-se o método de variância ANOVA, com grau de confiança de 95 % ($p < 0.05$). Os dados foram analisados com recurso ao *software* GPES e Microcal Origin Pro.

Resultados e Discussão

3. Resultados e Discussão

3.1 Estudo eletroquímico dos elétrodos *screen-printing*

O *design* dos elétrodos de *screen-printing* influencia o seu comportamento eletroquímico. Os fatores mais relevantes são o suporte sob o qual a tinta é impressa, a composição da própria tinta e a morfologia da superfície do eletrodo (Bolado et al., 2007). Os tratamentos de pré-anodização da superfície dos elétrodos *screen-printing* são uma alternativa ao polimento mecânico dos elétrodos sólidos e tal como estes, são utilizados para melhorar as propriedades de transferência de carga. Uma diferente estratégia de modificação da sua superfície é através da modificação com nanotubos (Wang et al., 2004; Guan et al., 2005). Um estudo sobre elétrodos *screen-printing* conduzido por (Bolado et al., 2007) demonstrou que os elétrodos da Dropsens® apresentavam melhor comportamento eletroquímico na presença de diferentes analitos (hexaaminorutênio, ferricianeto, p-aminofenol e hidroquinona) quando comparados com outros dois tipos de elétrodos *screen-printing*. As elevadas temperatura de cura destes electrodos permitem que os solventes da tinta sejam evaporados eficientemente e se formem superfícies rugosas devido ao *cracking* do suporte de impressão da tinta, neste caso a cerâmica. A composição e/ou a estrutura microscópica dos elétrodos de carbono podem afetar a atividade redox das moléculas de diferentes formas.

3.1.1. Área de superfície eletroquímica

O parâmetro inicial em estudo foi a variação da corrente de fundo através da deposição de diferentes concentrações de MWNTs-COOH (0.1; 1 e 10 mg/ml) na superfície de elétrodos *screen-printing*. O ácido sulfúrico e o cloreto de sódio foram utilizados como eletrólito suporte. Apenas a concentração intermédia evidenciou um efeito significativo no aumento da corrente de fundo dos elétrodos, já que a quantidade máxima utilizada demonstrou ineficácia no processo de adsorção, regressando a corrente aos níveis de elétrodos não revestidos (Fig. 3.1 C e D).

O comportamento eletroativo dos elétrodos foi testado através do processo de difusão do par redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ presente na espécie ferricianeto em meio de ácido sulfúrico. Esta reação demonstrou uma relação de proporcionalidade entre a corrente medida e a raiz quadrada da velocidade de varrimento para elétrodos não revestidos. Para os elétrodos revestidos com 1 mg/ml de MWNTs-COOH, esta relação apenas se verificou para velocidades de varrimento até 200 mV/s, demonstrando impedimento na transferência rápida de eletrões a elevadas velocidades de varrimento na presença de nanotubos de

carbono, atingido assim um limite de saturação. Contudo, a presença de nanotubos de carbono promove um aumento da corrente faradaica, contribuindo para uma maior amplitude dos picos anódicos e catódicos da espécie em estudo, e simultaneamente um aumento da área eletroativa dos elétrodos.

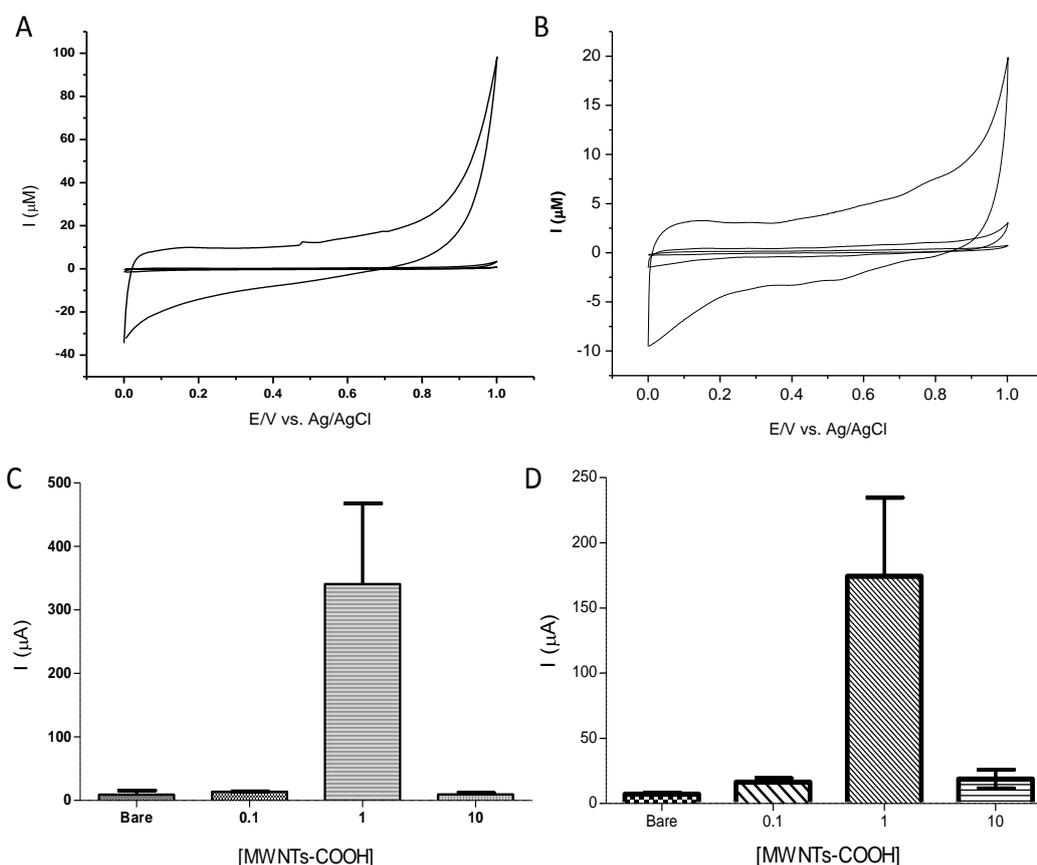


Figura 3.1 – Voltamogramas cíclicos da corrente de fundo de elétrodos não revestidos e elétrodos revestidos com diferentes concentrações de MWNTs-COOH (a-c): 0; 0.1, 1 e 10 mg/ml em meio ácido (A) e cloreto de sódio (B). C e D mostram o valor médio das cargas (μQ) para as diferentes concentrações de MWNTs-COOH testadas em ácido sulfúrico e cloreto de sódio, respetivamente. As barras indicam o desvio padrão.

Os valores das áreas do gráfico da figura 3.3 foram calculados pela equação de Randles – Sevcik : $I_{pc} = 2.6 \times 10^5 n^{3/2} D^{1/2} C \sqrt{v}$ A, onde n representa o número de elétrons, D (cm^2/s) a constante de difusão, C (M) a concentração do analito, \sqrt{v} (V/s) a velocidade de varrimento e A (cm^2) a área do elétrodo. Através da construção dos gráficos de corrente vs. raiz quadrada da velocidade de varrimento, é possível linearizar a equação obtendo-se um valor de $K = 2.6 \times 10^5 n^{3/2} D^{1/2} C A$. No caso do ferricianeto existe apenas a transferência de um elétron pelo seu par redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ e foi usada uma constante de difusão de $6.1 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$.

O valor da área geométrica dos elétrodos e o valor calculado da área electroactiva não apresenta uma diferença significativa para elétrodos não revestidos e revestidos com 0.1 mg/ml de MWNTs-COOH (n=3). No caso do revestimento com 1 mg/ml foi obtida uma diferença estatisticamente significativa em relação aos outros dois grupos (One-Way ANOVA, $p < 0.05$). A comparação dos voltamogramas presentes na figura 3.2D permite visualizar mais facilmente o efeito dos MWNTs-COOH no aumento da área eletroativa dos elétrodos para uma velocidade de varrimento de 100 mV/s. No restante painel observa-se o afastamento do potencial dos picos anódicos e catódicos com o aumento da velocidade de varrimento. O aumento da concentração de MWNTs-COOH realça ainda mais esta evidência, tornando a reação não reversível a valores superiores a 1 V/s. Para uma velocidade de 100 mV/s, a diferença entre os potenciais é de 65 mV e 66 mV para os elétrodos não revestidos e revestidos e com 0.1 mg/ml MWNTs-COOH, respetivamente e passa para 70 mV nos elétrodos revestidos com 1 mg/ml de MWNTs-COOH. Esta diferença é mais significativa para valores superiores de velocidades de varrimento, o que pode indicar que a imobilização dos nanotubos de carbono sobre a superfície do elétrodo não reúne as condições necessárias à obtenção de um bom processo de transferência direta de elétrons entre o elétrodo e o ferricianeto.

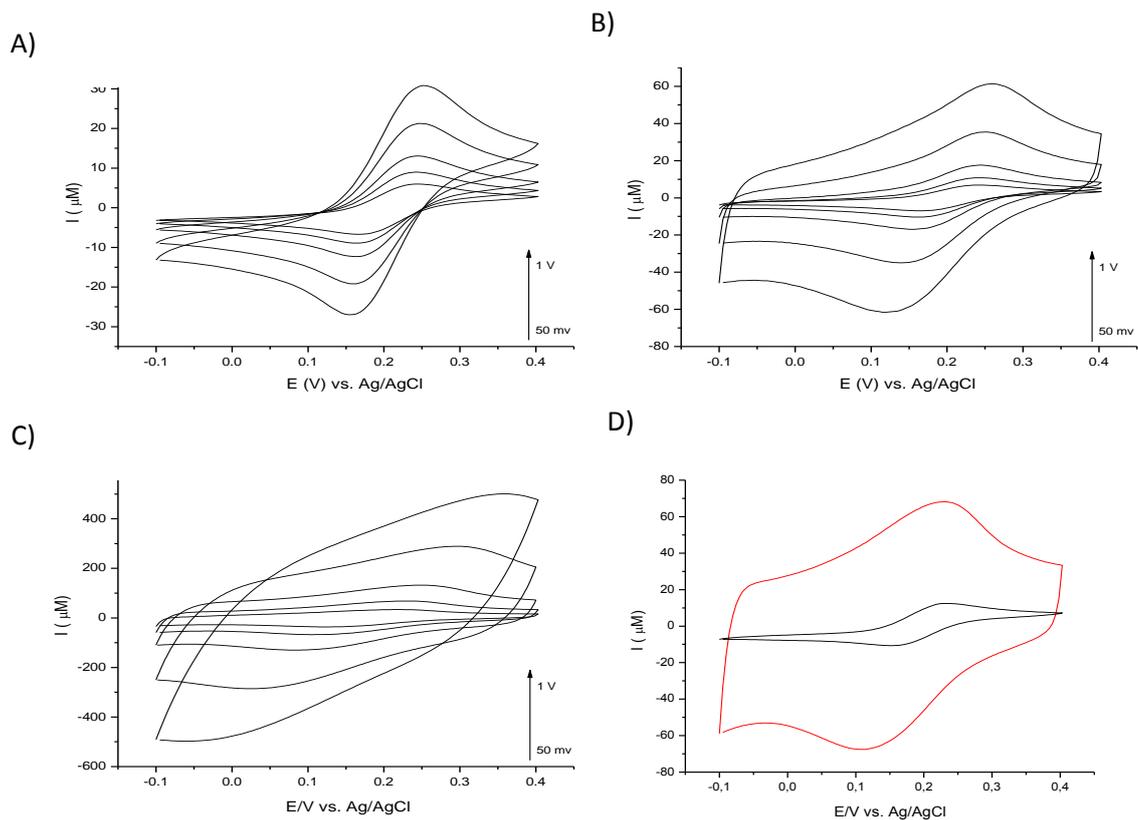


Figura 3.2 – Estudo do comportamento eletroquímico dos elétrodos *screen-printing*. A a C – Voltamogramas cíclicos dos elétrodos não revestido e revestidos com 0.1 e 1 mg/ml de MWNTs-COOH na presença de 5×10^{-4} M $\text{K}_3 [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3+}$ em 0.1 M H_2SO_4 . D – Comparação do voltamograma a 0.1 V/s de um elétrodo não revestido com um elétrodo revestido com 1 mg/ml MWNTs-COOH.

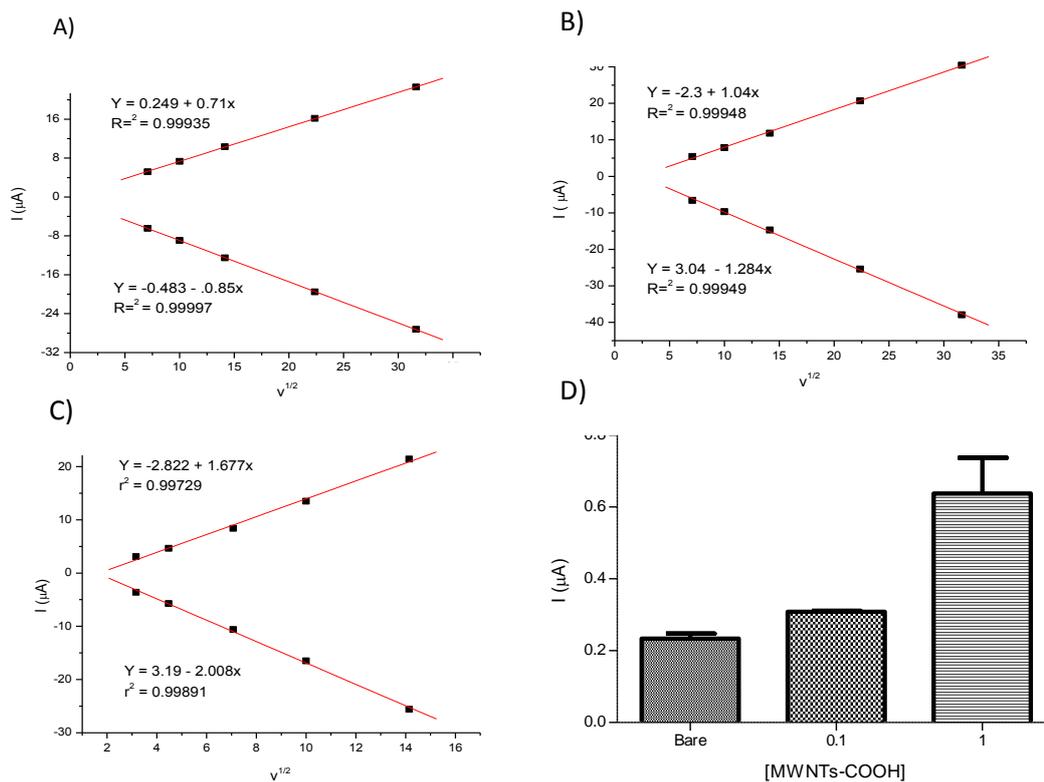


Figura 3.3 – Gráficos da corrente vs. raiz quadrada da velocidade de varrimento obtidos através dos picos de voltametria cíclica na presença 0.5 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3+}$ em 0.1 M H_2SO_4 para diferentes concentrações de MWNTs-COOH. (A) - elétrodo não revestido (B) – Elétrodo 0.1 mg/ml MWNTs-COOH. (C) – Electrodo 1 mg/ml MWNTs-COOH. (D) – Gráfico da área electrocatalítica em função das concentrações de MWNTs-COOH. Todos os declives estão em $\mu\text{A}/\text{V}^{1/2}$.

3.1.2. Estudo do comportamento eletroquímico de biomoléculas de grupo Heme

Os centros eletroativos de grande parte das enzimas redox encontram-se dentro da estrutura proteica protegidos do meio envolvente. Considerando o elétrodo e o centro redox da enzima como um par aceitador/dador de eletrões, a camada polipeptídica robusta que envolve o centro ativo promove uma barreira cinética à transferência de eletrões. Por isso, são conhecidas poucas reações biocatalíticas que não recorrem ao uso de mediadores, como o caso da electroredução do O_2 e H_2O_2 pela lacase e HRP (Lojou et al., 2005). Para a ocorrência de um processo de transferência direta de eletrões eficiente é necessário conjugar inúmeros fatores, sendo de realçar a geometria correta da enzima/proteína na superfície do elétrodo. Esta só é possível de obter tendo em conta inúmeros detalhes nos processos de imobilização, sendo que é específica para cada enzima. Apesar das dificuldades inerentes, o processo de DET garante uma melhor seletividade e sensibilidade para os analitos electrocatalisados pelas biomoléculas de grupo heme.

3.1.2.1 Adsorção

Com base nos resultados da secção anterior, a superfície de todos os elérodos foi revestida com 1 mg/ml de MWNTs-COOH antes da adsorção das macromoléculas (mioglobina, microperoxidase e hemina). O protocolo de adsorção baseou-se na deposição de uma gota de 10 μ l em concentrações de 0.01; 0.1 e 1 mg/ml.

Mioglobina

Os elérodos *screen-printing* revestidos com MWNTs-COOH/Mb apresentam uma reação quase reversível, demonstrando linearidade entre 10-200 mV/s. O estudo por voltametria cíclica do par Fe^{2+}/Fe^{3+} da mioglobina apresenta um potencial redox com um desvio para potenciais positivos relativamente aos dados presentes na literatura, que se encontram a -212 mV vs. SCE (Guo et al., 2008) Para uma velocidade de 0.05 V/s os potenciais formais (E^0) foram de 150 ± 10 mV, 148 ± 8 mV e 85 ± 5 mV ($n=3$) em ordem crescente de concentração.

Os declives relativos aos gráficos da corrente vs. velocidade de varrimento (Fig. 3.5) demonstram, que para este tipo de elérodos, e segundo o processo de adsorção, o aumento da concentração de mioglobina provoca um deterioramento das condições ideais à ocorrência de transferência direta de eletrões entre a mioglobina e o elétrodo. Quando o

elétrodo é mergulhado no eletrólito suporte observa-se uma desadsorção da proteína no caso das duas concentrações mais elevadas. Este fenómeno deve-se provavelmente à formação de agregados macromoleculares que não formam uma ligação efetiva com a superfície do elétrodo, o que mais tarde se traduz num bloqueio à passagem dos eletrões centro ativo-elétrodo. À medida que o revestimento se perde pode arrastar consigo moléculas de proteína que contribuem para um processo de DET eficaz. Parece existir um patamar máximo de concentração de proteína a partir do qual o processo de transferência de eletrões é afetado.

A uma concentração de 1 mg/ml parece existir um outro par redox a um potencial de aproximadamente 430 ± 20 mV ($n=3$) que se encontra próximo dos valores obtidos para a hemina (ver secção da hemina). Por vezes, existe mesmo a predominância destes valores de potencial, o que poderá indicar que a mioglobina se encontra num estado desnaturado e a contribuição eletroquímica para o processo de DET se deve exclusivamente ao heme livre, como já reportado na literatura (Groot et al., 2005).

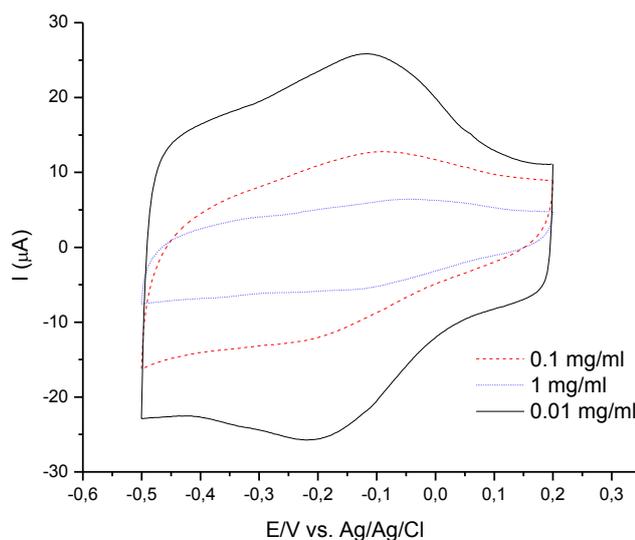


Figura 3.4 – Voltamogramas MWNTs-COOH/Mb em diferentes concentrações de proteína (0.01, 0.1 e 1 mg/ml) a uma velocidade de varrimento de 50 mV/s em PBS.

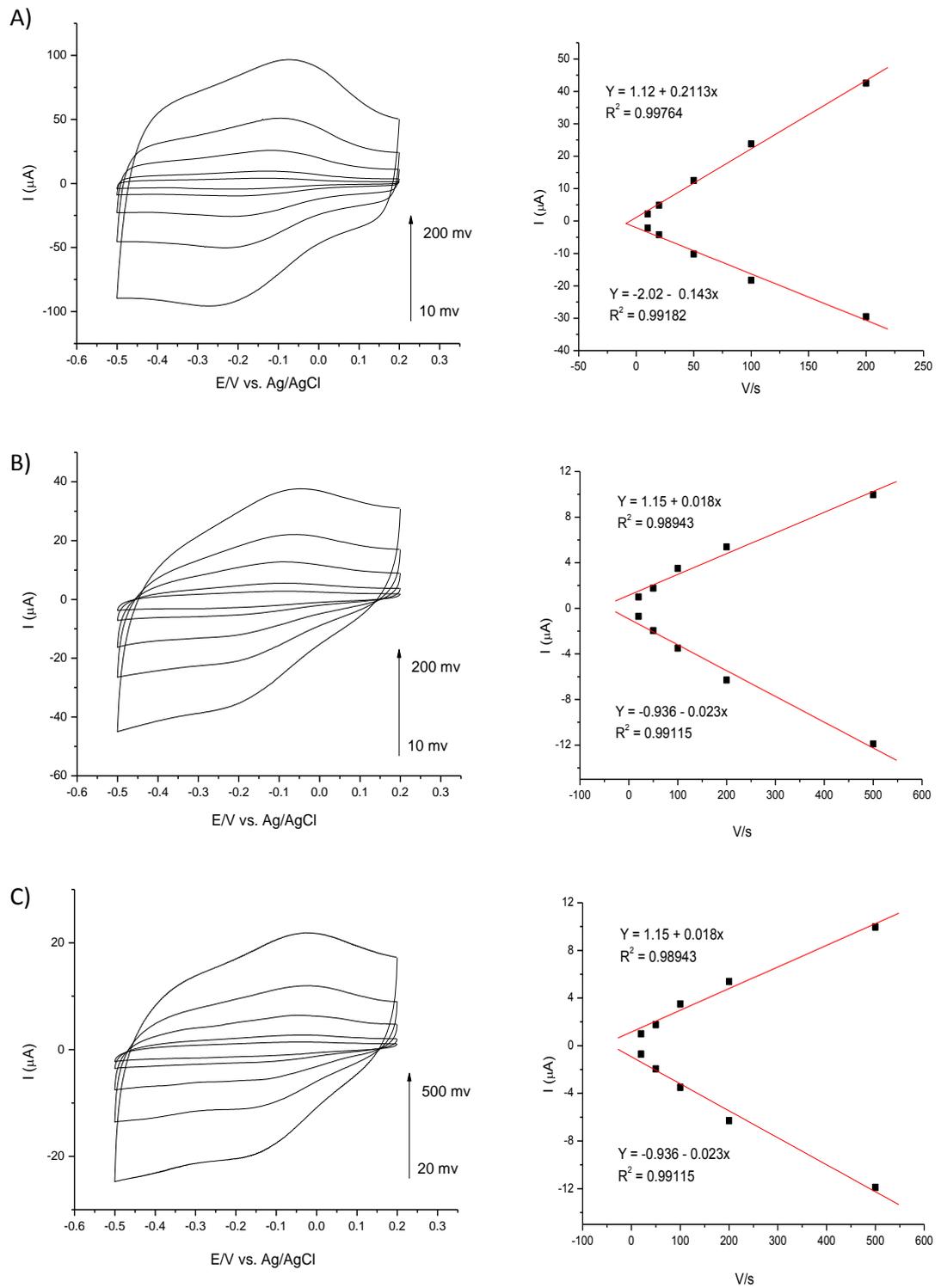


Figura 3.5 – Voltamogramas MWNTs-COOH/Mb e respectivas retas de calibração da I vs. \sqrt{v} para concentrações 0.01 (A); 0.1 (B) e 1 mg/ml (C) a velocidade de varrimento entre 10 – 500 mV/s.

Microperoxidase

A microperoxidase apresenta uma menor massa molecular relativamente à mioglobina, daí o interesse no seu estudo. O seu centro ativo, à partida, será o mais difícil de desnaturar, já que se encontra em contacto com a cadeia de aminoácidos segundo duas ligações dissulfúricas. No entanto, a sua purificação é de apenas 85%, e mais uma vez é visível um pico redox correspondente ao potencial da hemeina aquando da adsorção da maior concentração de proteína. Os potenciais formais relativo ao heme da microperoxidase para uma velocidade de 50 mV/s são de 113 ± 12 mV, 148 ± 20 mV e 80 ± 3 mV ($n=3$), no sentido crescente das concentrações. Apesar da sua menor dimensão, a microperoxidase revela o mesmo processo de desadsorção relatado para a mioglobina.

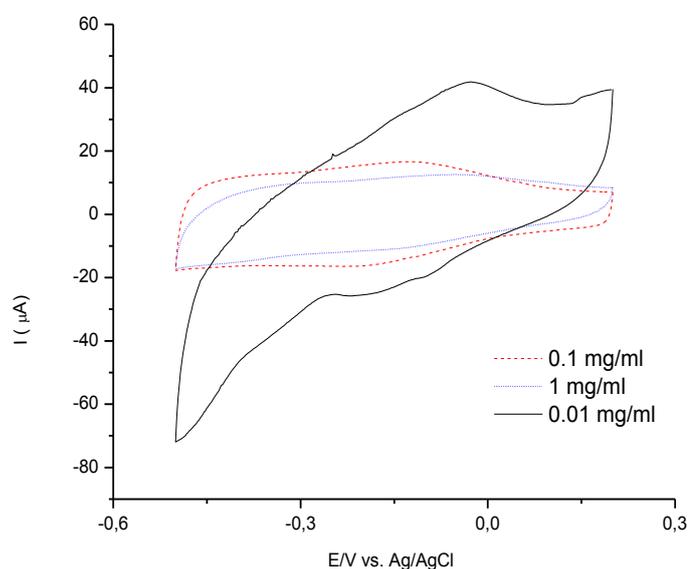


Figura 3.6 – Voltamogramas cíclicos de MWNTs-COOH/Microperoxidase para diferentes concentrações de proteína (0.01, 0.1 e 1 mg/ml) a velocidade de varrimento de 50 mV/s PBS.

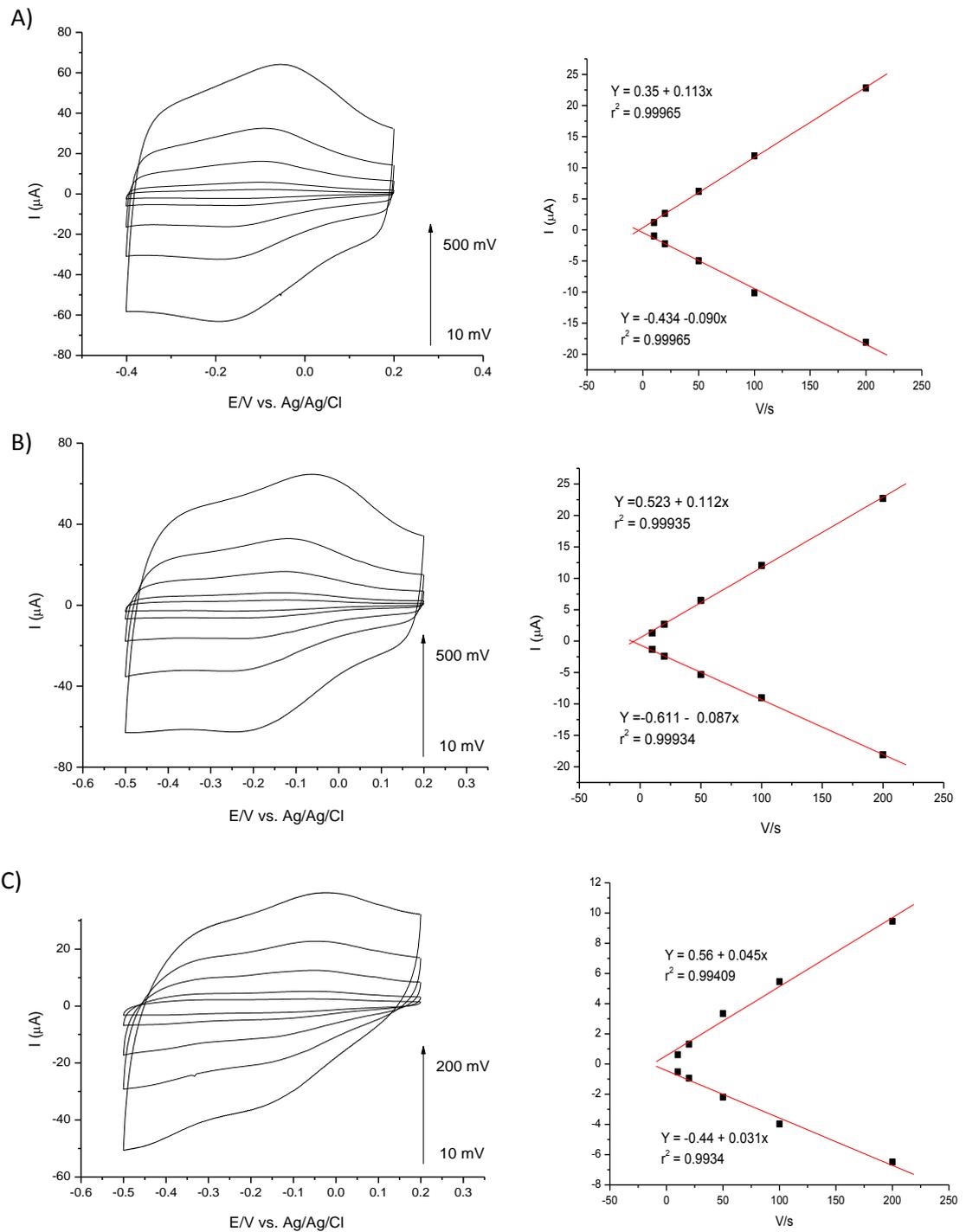


Figura 3.7 – Voltamogramas cíclicos MWNTs-COOH/Microperoxidase e respectivas retas de calibração da I vs. \sqrt{v} para concentrações 0.01 (A); 0.1 (B) e 1 mg/ml (C) a velocidade de varrimento entre 10 – 500 mV/s.

3.1.2.2 Hemina

De entre as macromoléculas testadas, a hemina apresentou a melhor relação entre a intensidade de corrente medida e a velocidade de varrimento. O seu valor foi de $0.481 \mu\text{A/V}^{-1}$ ($n=3$), cerca de duas vezes superior ao da mioglobina ($0.213 \mu\text{A/V}^{-1}$) e quatro vezes superior ao da microperoxidase ($0.113 \mu\text{A/V}^{-1}$). A concentração de hemina usada tem repercussões na eficiência da transferência de eletrões entre o eléctrodo e a macromolécula, o aumento da sua quantidade é inibitória para este sistema reacional, como verificado na Fig.3.9.

Os seus potenciais parecem variar com as diferentes concentrações (Fig.3.8), mas para a concentração de 0.01 mg/ml o seu potencial formal é de cerca de $450 \pm 30 \text{ mV}$. Esta variação pode dever-se ao facto da referência dos eléctrodos *screen-printing* ser apenas de prata e não de Ag/AgCl , como será discutido posteriormente.

A orientação das proteínas na superfície do eléctrodo é de extrema importância para um DET eficiente uma vez que os locais ativos das enzimas nem sempre estão localizados no meio do seu centro globular mas sim expostos ao meio envolvente. A hemina, não estando envolta por cadeias de polipeptídeos demonstra velocidades de transferência de eletrões por vezes superiores a 40000 s^{-1} (par redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$) em suportes de carbono vítreo e grafite. (Brown et al., 1978, Feng et al., Feng et al., 1995). No caso das proteínas com grupos heme, os polipeptídeos circundantes aos locais ativos do heme tornam a transferência de eletrões mais distante do eléctrodo. Em sumula, o aumento da concentração da proteína pelo método de adsorção por gota na superfície do eléctrodo, implica a formação de aglomerados moleculares que impedem a transferência eficiente de eletrões. Estes aglomerados, devido à sua grande dimensão e geometria, não são mantidos na superfície do eléctrodo quando este é mergulhado em solução, arrastando consigo alguma quantidade de proteína. A hemina apresentou a melhor performance electrocatalítica das três macromoléculas estudadas, sendo por isso seleccionada para testar outros métodos de imobilização mais eficazes do que a adsorção.

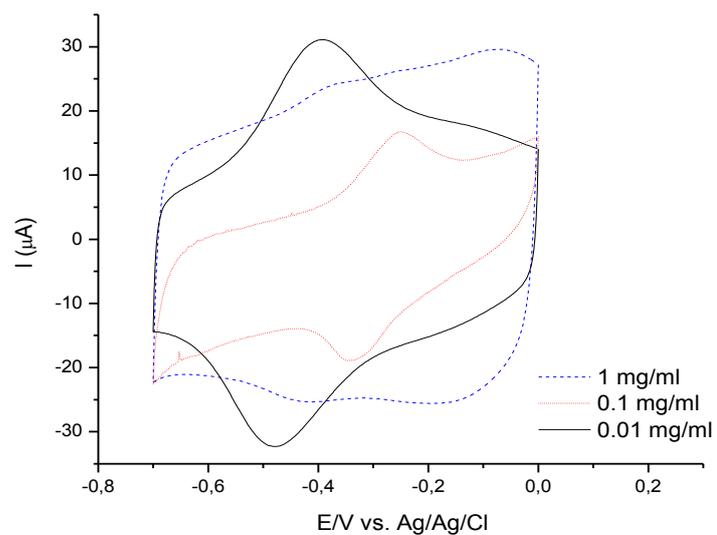


Figura 3.8 – Voltamogramas cíclicos de MWNTs-COOH/Hemina em diferentes concentrações de proteína (0.01, 0.1 e 1 mg/ml) a velocidade de varrimento de 50 mV/s em PBS.

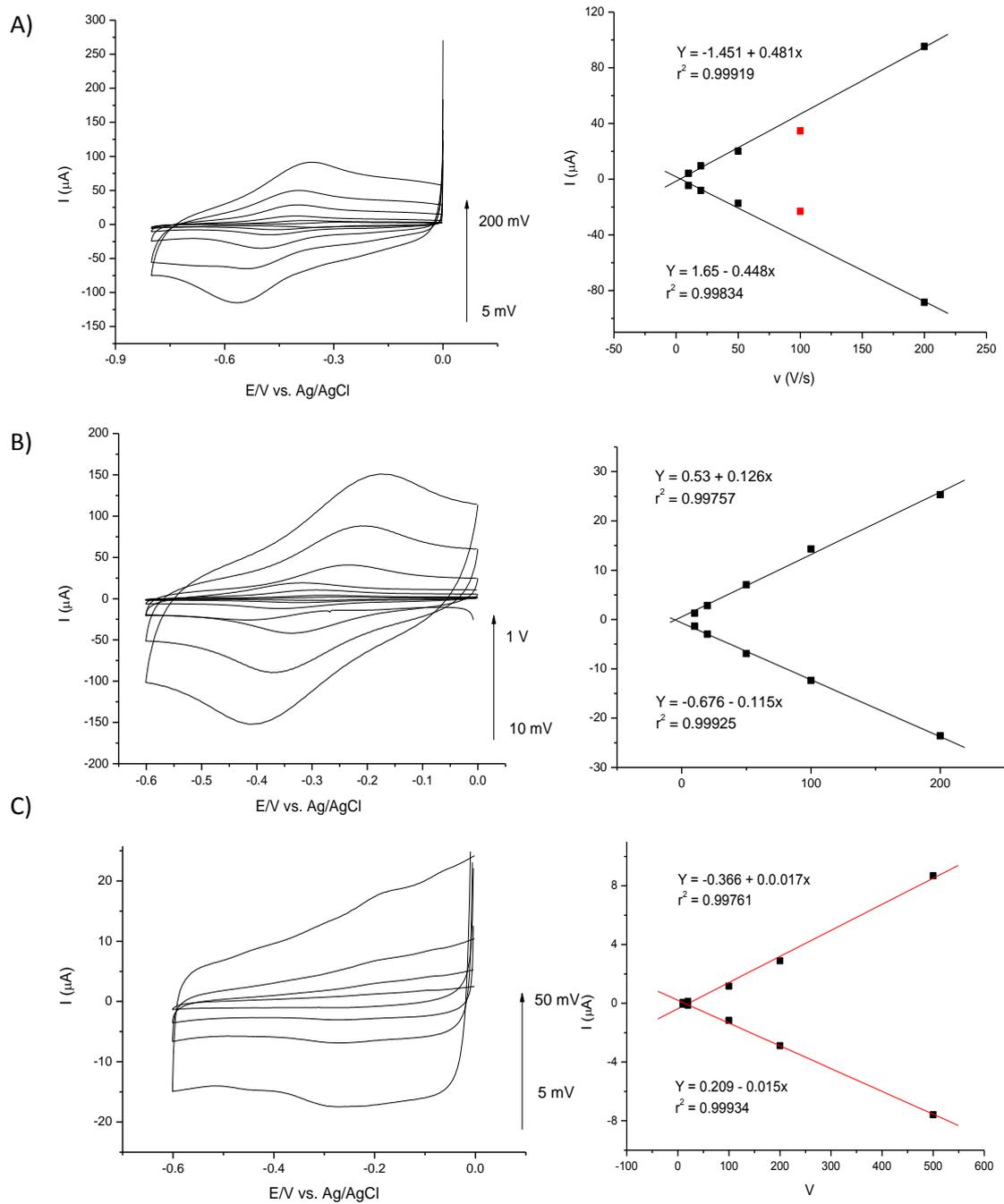


Figura 3.9 – Voltamogramas cíclicos de MWNTs-COOH/Hemina e respectivas retas de calibração da I vs. para concentrações 0.01 (A); 0.1 (B) e 1 mg/ml (C) a velocidade de varrimento entre 5 – 1000 mV/s.

3.1.3. Electrocatalise do Óxido Nítrico

3.1.3.1 Quitosano-EDC

A criação de ligações covalentes entre as macromoléculas e os MWNTs com o quitosano, tornam a imobilização um processo mais robusto. O filme mantém-se intacto na superfície do eléctrodo mesmo depois de estar em contacto com o eletrólito suporte. Uma vez mais, o processo de DET parece facilitado aquando da imobilização da hemina comparativamente à mioglobina e à microperoxidase. Posto isto, procedeu-se à primeira tentativa de quantificação de NO pelos eléctrodos *screen-printing*.

Mioglobina

Os eléctrodos revestidos com um filme de MWNT/Mb/Qui-EDC apresentaram uma resposta apenas para concentrações de NO superiores ou iguais a 1000 nM (Fig.3.10). Para esta concentração a sensibilidade foi de 77 ± 20 nA/ μ M (n=2), que só foi possível quantificar após subtração da linha de base. O intervalo linear de um eléctrodo de carbono vítreo variou entre 250 e 1000 nM. A relação sinal ruído foi muito superior aos eléctrodos de *screen-printing* com uma sensibilidade de 162 ± 10 nA/ μ M (n=2).

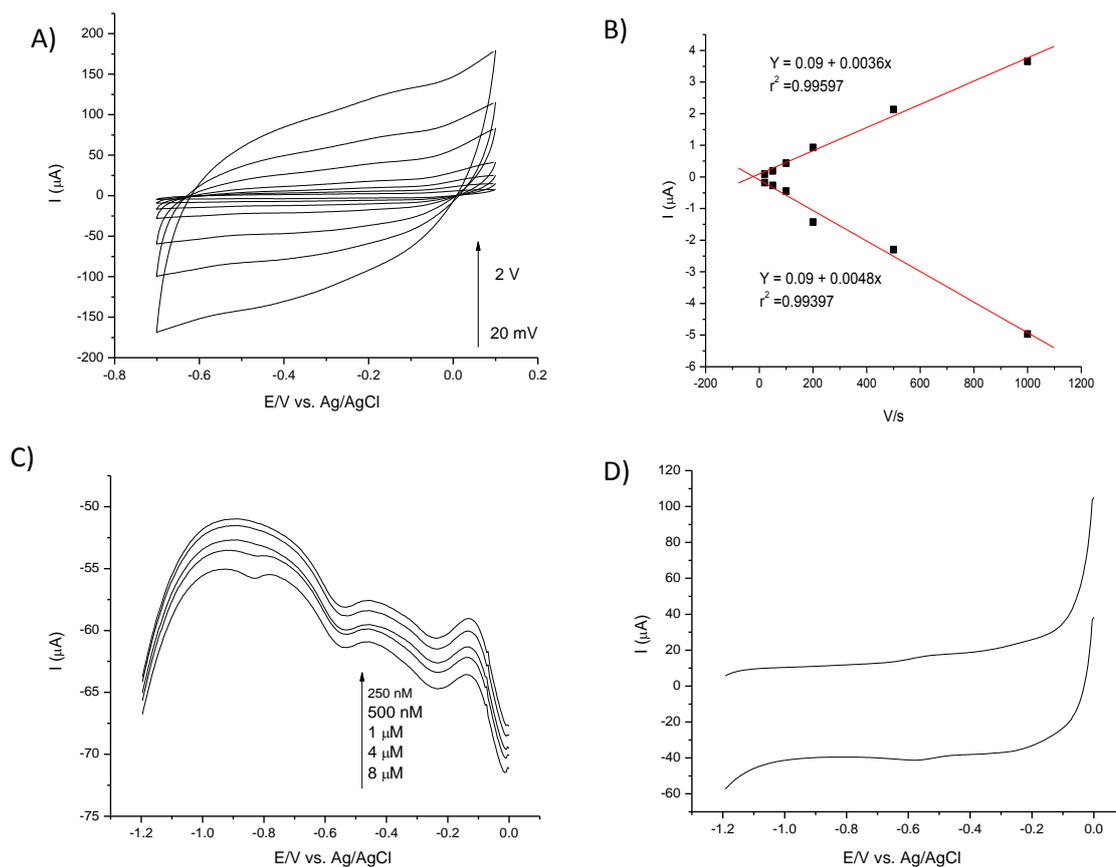


Figura 3.10 – Voltamogramas MWNTs-COOH/Mb/Quit-EDC (A); retas de calibração da I vs \sqrt{v} para um tempo de eletrodeposição de 50 s a velocidade de varrimento entre 0.02 –2 V (B); e monitorização da quantificação de NO por técnica de onda quadrada (C).

Microperoxidase

O deficiente processo de transferência de eletrões foi também evidente com a microperoxidase. Tal como a mioglobina a reação torna-se irreversível a partir dos 2 V/s e os valores dos picos de corrente tendem para uma saturação. É possível proceder à quantificação de NO a valores de 500 nM, mantendo-se no entanto uma baixa relação sinal/ruído. Pelo traçado da reta de calibração para valores de NO entre valores de 500 e 2000 nM e verificou-se que esta relação não é linear (Fig. 3.11). A sua sensibilidade foi de 188 ± 40 nA / μM ($n=2$).

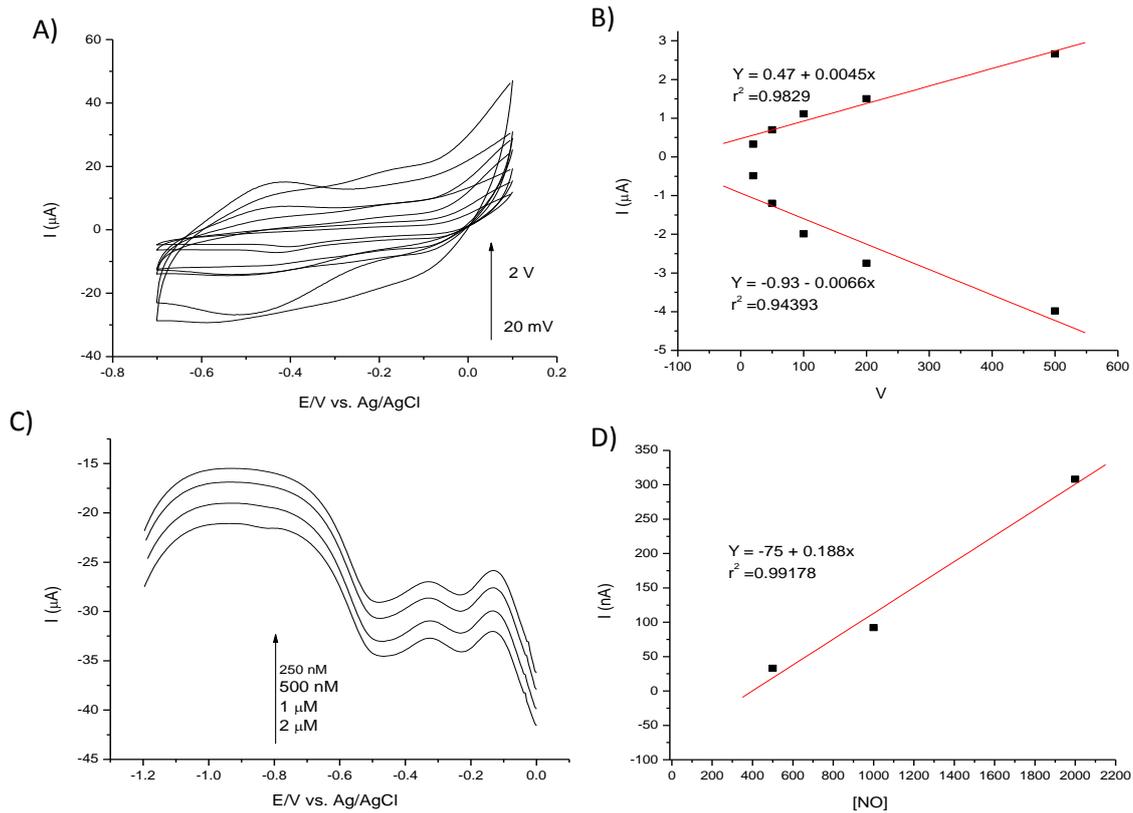


Figura 3.11 – Voltamogramas MWNTs-COOH/Microperoxidase/Quit-EDC (A); retas de calibração da I vs. \sqrt{t} para um tempo de eletrodeposição de 50 s a velocidade de varrimento entre 0.02 – 2 V/s (B); monitorização da quantificação de NO por técnica de onda quadrada (C) e reta de calibração da corrente média (I) versus a $[\text{NO}]$ (D)].

3.1.3.2 Hemina

Na figura 3.12A encontra-se a resposta voltamétrica dos elétrodos revestidos com composto MWNTs/Hemina/Quit-EDC. A reação de transferência de elétrons ente a hemina e o elétrodo demonstra um certo grau de irreversibilidade para velocidades abaixo de 50 mV/s e acima de 10 V/s devido ao potencial induzido na transição de fase que ocorre no filme de quitosano. A diferença de potencial catódico e anódico situa-se nos 120 ± 20 mV ($n=3$) para uma velocidade de 50 mV/s, o que aponta para a ocorrência de uma reação quasi-reversível devido à lenta transferência de elétrões. O biossensor teve uma resposta linear ao NO com uma sensibilidade de $110 \text{ nA} / \mu\text{M}$ ($n=2$). Tendo como controlo um elétrodo de carbono vítreo, obteve-se uma sensibilidade ao NO de $366 \text{ nA} / \mu\text{M}$ ($n=2$).

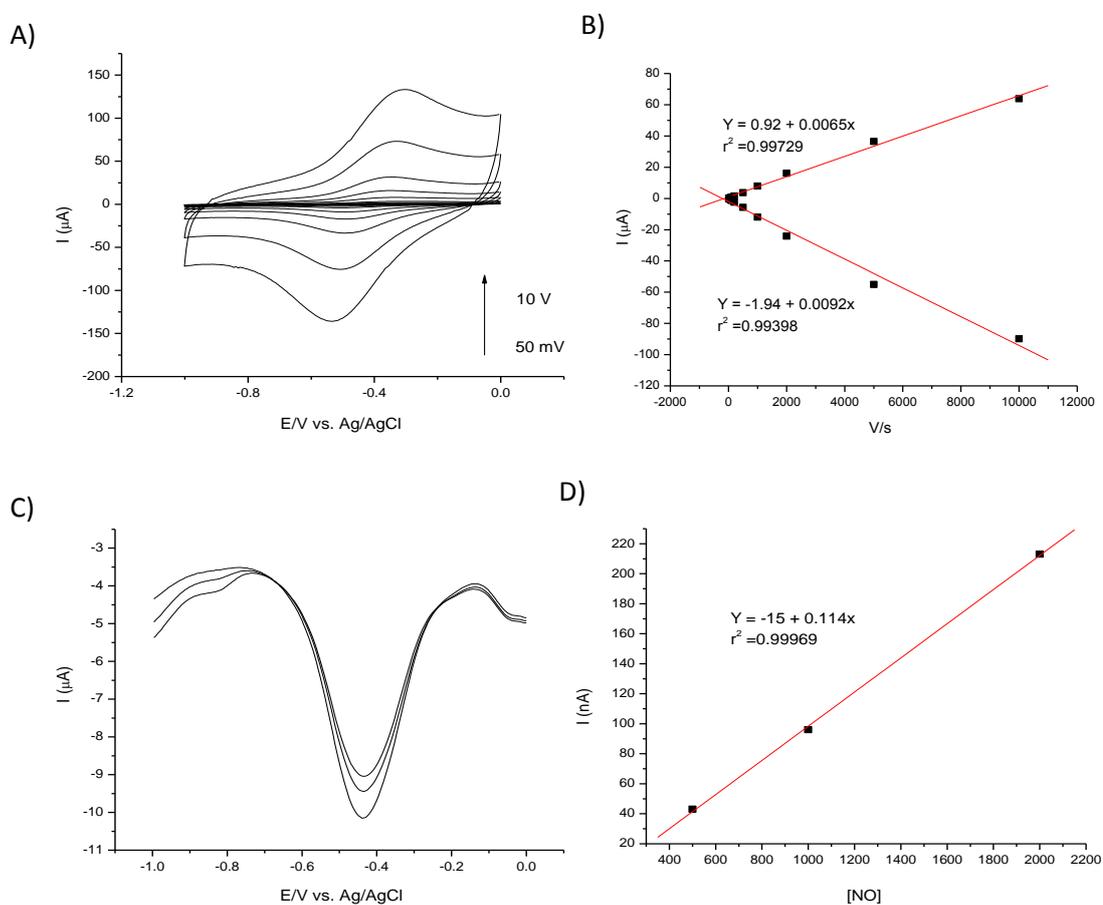


Figura 3.12 – Voltamogramas MWNTs-COOH/Hemina/Quit-EDC (A); retas de calibração da I vs \sqrt{v} para um tempo de eletrodeposição de 50 s a velocidade de varrimento entre 0.05 –10 V/s (B); monitorização da quantificação de NO por técnica de voltametria de onda quadrada (C) e reta de calibração da corrente média (I) versus a $[\text{NO}]$ (D)].

3.1.4 Tecnologia dos elétrodos *screen-printing*

A experiência adquirida na utilização dos elétrodos de “*screen-printing*” revelou que a sua estrutura elétrica e a superfície de carbono não parecem estar otimizadas para a imobilização de substâncias por deposição por gota, o que seria a principal vantagem desta tecnologia. Reporta-se o caso em que após uma deposição de uma gota de 10 μl de MWNTs-COOH seguido de um tempo de cura de 24 h, toda a superfície do carbono é separada do suporte de sílica. Num caso semelhante observou-se a desadsorção de um filme de 1 mg/ml de proteína depositado por gota sob a superfície do eletrodo de *screen-printing* previamente revestido com 1 mg/ml de MWNTs-COOH.

Em alguns elétrodos, o potencial dos picos de corrente variou dentro da mesma experiência e para a mesma velocidade de varrimento. Na figura 3.13 é visível um deslocamento do par redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ referente à imobilização de mioglobina com uma matriz de quitosano para uma velocidade de 50 mV/s espaçados no tempo em cerca de 2 min. O afastamento dos picos foi de aproximadamente 200 mV.

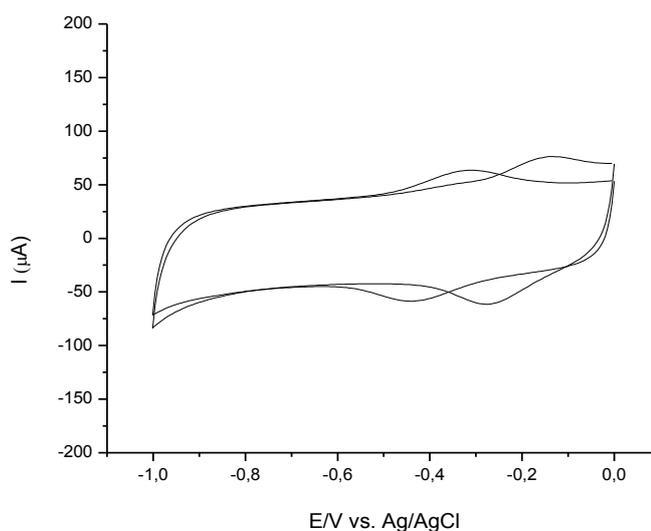


Figura 3.13 – Voltamogramas do par redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ do biossensor MWNTs-COOH/Mb/Quit a uma velocidade de varrimento de 50 mV/s com uma diferença temporal de 2 min.

Uma das principais causas da ocorrência destes fenómenos pode dever-se à constituição do seu eletrodo de referência que é na realidade uma pseudo-referência. Este é formado unicamente por prata, diferente dos convencionais elétrodos de Ag/AgCl, que devido ao cloreto evitam uma variação significativa do potencial no sistema eletroquímico. Numa janela de potencial entre 0 e -1.0 V comparou-se a sua corrente background usando o

seu eletrodo de referência incorporado e um eletrodo de Ag/AgCl externo (fig.3.14). NO primeiro caso a corrente foi significativamente superior e observaram-se picos na zona de oxidação e redução.

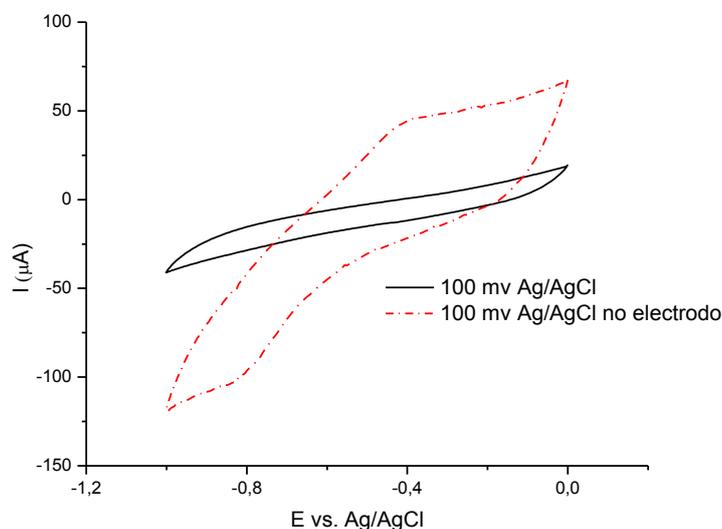


Figura 3.14 – Comparação da corrente fundo de um eletrodo de *screen-printing* não revestido obtida quando se usa a sua referência interna (vermelho) e um eletrodo Ag/AgCl (preto) a uma velocidade de 100 mV/s e numa janela de potencial entre 0 e -1 V.

Todos estes fatores contribuem para uma grande irreprodutibilidade nas experiências realizadas com estes eletrodos, pois por exemplo os potenciais de medição de NO são muito variáveis e por vezes parecem estar desdobrados em dois picos (Fig. 3.15), um a 825 mV e outro a 950 mV. Apesar da sensibilidade ao NO ser aproximada aos valores obtidos em eletrodos de carbono vítreo, a variação dos seus potenciais tornaria inviável a deteção deste composto numa amostra com diferentes substâncias e até mesmo em meio contendo oxigénio.

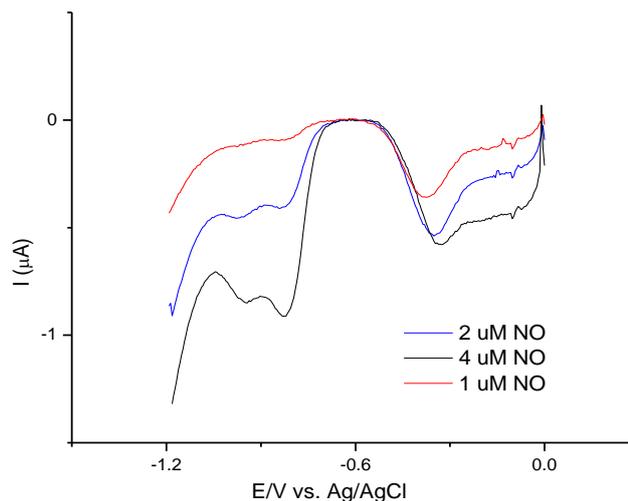


Figura 3.15 – Monitorização da resposta a NO óxido nítrico por voltametria de onda quadrada de um biossensor formulado pela eletropolimerização de hemina.

A condutividade dos materiais de carbono tem uma importância fulcral para a construção de eléctrodos com geometrias ideais à redução de perda de potencial óhmico. Uma outra variação diz respeito aos efeitos da densidade de estados electrónicos nos processos de transferência de electrões. O processo torna-se mais rápido quando existe uma maior densidade de estados electrónicos no E° do sistema redox envolvido. Enquanto os metais possuem elevadas DOS ao longo um elevado intervalo de energia, os materiais de carbono são bastante variáveis (McCreery 2008).

A orientação do plano basal na cinética dos eléctrodos é por vezes bastante significativa em alguns compostos. A forma irregular como alguns voltamogramas são apresentados é devido à dificuldade de fabricar superfícies lisas do plano central (*edge*) do carbono. Ainda assim a transferência de electrões é muito mais rápida e eficaz do que no plano basal.

Os eléctrodos de carbono estão sujeitos a processo de adsorção de impurezas durante a preparação do eléctrodo que afetam drasticamente as velocidades de transferência de electrões atividade eletrocatalítica. Os processos de ativação conhecidos requerem operadores com algum grau de conhecimento e retiram aos eléctrodos de *screen-printing* a sua maior vantagem; utilidade prática sem necessidade de intervenção laboratorial.

3.2 Estudo Eletroquímico com Eléttodos de Carbono Vítreo

Devido à dificuldade de imobilização de proteínas em microelétrodos, foram realizados estudos preliminares num macroelétrodo de carbono vítreo comercial (BAS) com 3 mm de diâmetro devido aos inúmeros trabalhos reportados na literatura com este tipo de material de eletrodo. A reação reversível do par $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ do grupo heme da mioglobina, é apenas obtido quando o eletrólito suporte é borbulhado com uma linha pura de argon, garantindo a remoção de > 99.99% do oxigénio presente. Isto sugere a forte afinidade do seu heme pelo oxigénio molecular. Esta ligação dá-se quando o Fe^{3+} é reduzido a Fe^{2+} a um potencial suficientemente negativo (abaixo de -0.4 V) no varrimento catódico, dificultando a transferência de eletrões no varrimento anódico.

A imobilização da mioglobina ou hemina na superfície do eletrodo é um processo controlado por adsorção, uma vez que é mantida uma relação de proporcionalidade entre a corrente medida e o aumento da velocidade de varrimento.

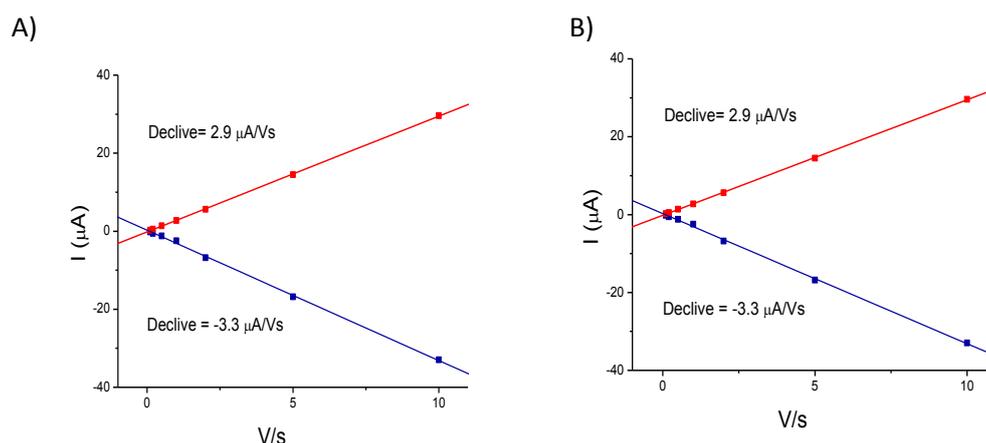


Figura 3.16 – Voltamogramas cíclicos de Hemina/BAS em PBS a diferentes velocidades de varrimento (a-h) : 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5 e 10 V/s obtidas na ausência de oxigénio por imobilização da Hemina (2mg/ml) juntamente com MWNTs (0.4 mg/ml) numa matriz de quitosano (0.5%) depositada na superfície do eletrodo de carbono vítreo (BAS) (A). Curva de calibração corrente (I) vs. velocidade de varrimento dos picos de redução e oxidação do par redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ (B).

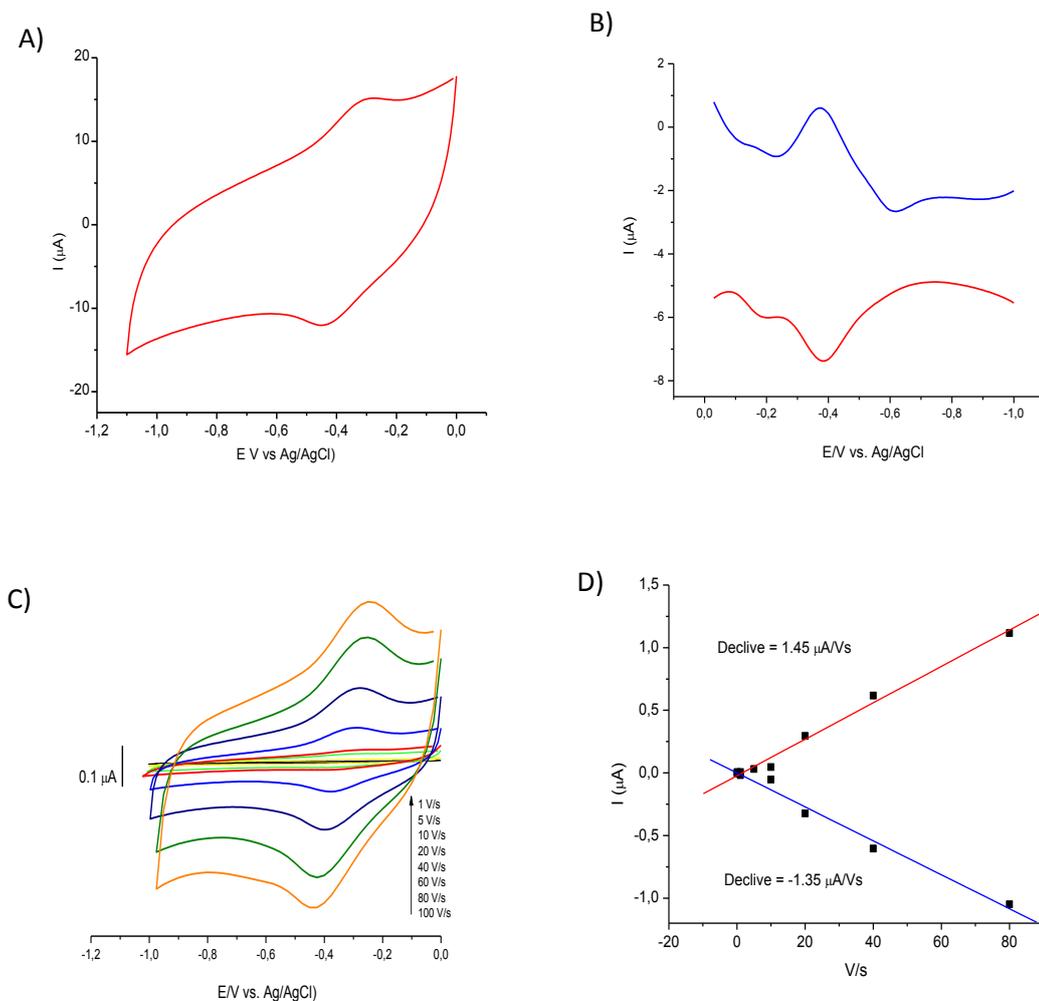


Figura 3.17 – Voltametria cíclica (A) e onda quadrada (B) do par redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ obtidas na ausência de oxigénio por imobilização da mioglobina (2mg/ml) juntamente com MWNTs (0.4 mg/ml) numa matriz de quitosano (0.5%) depositada na superfície do eléctrodo de carbono vítreo (BAS). Potencial de redução Fe^{3+} : -0.376 V e potencial de oxidação do Fe^{2+} : -0.39 V. (C) Voltamogramas cíclicos em PBS a diferentes velocidades de varrimento (a-h): 1, 5, 10, 20, 40, 60 e 80, 100 V/s. (D) Curva de calibração corrente (I) vs. Velocidade de varrimento dos picos de redução e oxidação do par $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$.

3.2.1 Caracterização da resposta do biossensor a NO

Como já referido anteriormente, o oxigénio interfere no mecanismo de transferência de eletrões do par redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ e, para além disso, pode mascarar o sinal de NO, visto estas duas moléculas apresentarem um potencial de redução próximos. Na ausência de O_2 , este método de imobilização de mioglobina e hemina é bastante robusto permitindo medições de NO com elevada sensibilidade e limite de deteção tal como observado na Fig. 3.18. Em meio contendo oxigénio há um aumento da amplitude a -0.377 V devido à redução do oxigénio que se liga fortemente ao Fe^{2+} o que minimiza a sua interferência relativa à medição do NO, pois é possível uma boa resolução dos picos para as duas espécies. Após adições de volumes sucessivos de uma solução de PBS oxigenada, observa-se que a amplitude do pico do oxigénio em função da concentração se ajusta a um tipo de cinética saturável (Michaelis Menten). No entanto, a estabilidade do pico é mantida apenas durante alguns minutos (30 scans) para o caso da mioglobina e a redução do O_2 sofre um desvio para potenciais mais negativos (-0.750V), aproximando-se do potencial de redução do NO. Este efeito é irreversível e acompanhado da perda de resposta do biossensor a NO. No caso da imobilização da hemina, este fenómeno de envenenamento do biossensor é muito menos notório, sendo possível uma monitorização do NO na presença de oxigénio. Através deste método de imobilização os biossensores exibiram um declive de $1.45 \pm 0.4\ \mu\text{A}/\text{Vs}$ ($n=2$) e $2.9 \pm 0.7\ \mu\text{A}/\text{Vs}$ ($n=2$) para a mioglobina e hemina respetivamente, sendo o valor referente à hemina obtido num intervalo com menores velocidades de varrimento ($0.1\text{-}20\ \text{V}/\text{s}$ comparado com $1\text{-}100\ \text{V}/\text{s}$ para a mioglobina). A sensibilidade a NO foi de $162 \pm 21\ \text{nA} / \mu\text{M}$ para a mioglobina e de $366 \pm 32\ \text{nA} / \mu\text{M}$ hemina ($n=2$).

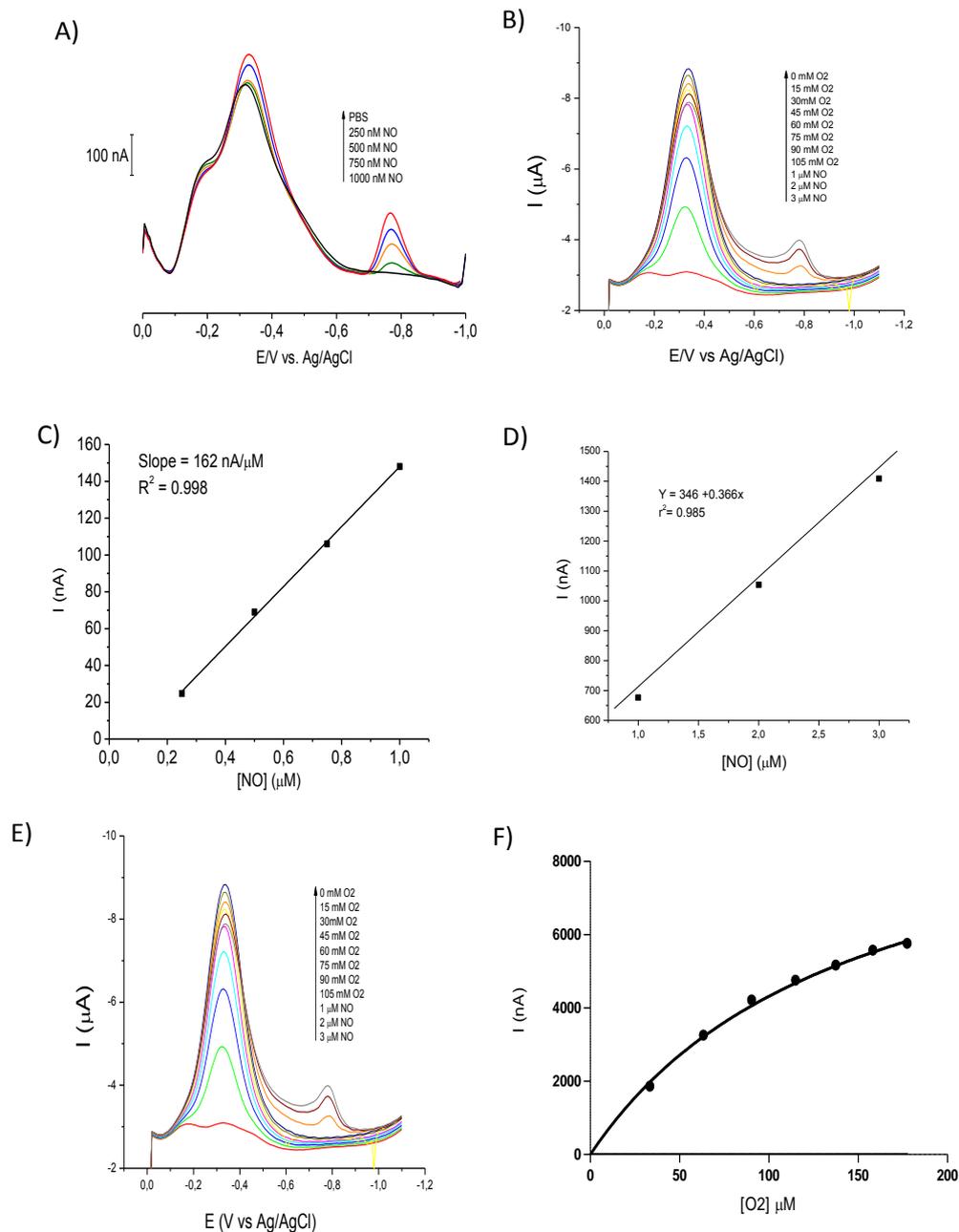


Figura 3.18 – Voltametria de onda quadrada do par F^{2+}/Fe^{3+} obtida na ausência de O_2 por imobilização de mioglobina (A) e da hemina na presença de O_2 (B). Curvas de calibração corrente (I) vs. $[NO]$ para a mioglobina (C) e hemina (D). Perda da resposta eletroquímica na presença de O_2 do biossensor com mioglobina após 17 scans (E) e curva de calibração da corrente vs. $[O_2]$ para o biossensor com hemina (F).

3.3. Microsensores de fibra de carbono

3.3.1. Área ativa dos microelétrodos de fibra de carbono

Para o cálculo da área eletroquímica ativa dos microelétrodos de carbono seguiu-se inicialmente o protocolo usado nos elétrodos *screen-printing*, o que se revelou um insucesso devido à pequena dimensão da fibra. Uma das formas reportadas da imobilização de nanotubos de carbono na superfície destes elétrodos baseia-se na sua dispersão numa solução de Nafion 5%, originando-se um compósito espesso que torna mais lenta a transferência de electrões entre o analito e a superfície do eléctrodo a um valor de pH próximo de 7. As condições ideais foram obtidas num meio de H_2SO_4 a pH 3 onde se dissolveu uma concentração 10 mM de cloreto de hexamino ruténio III. Os nanotubos de carbono promovem um aumento da corrente dos picos anódicos e catódicos do composto de ruténio, realçando a sua importância nos processos de transferência de eletrões em suportes sólidos (fig. 3.19 D). Toda a superfície da fibra de carbono exposta parece comportar os fenómenos eletroquímicos que ocorrem no eléctrodo, pois não existe uma diferença significativa entre a área geométrica do eléctrodo *bare* e a sua área eletroativa calculada. No entanto, esta diferença foi observada entre o grupo de electrodos não revestidos e revestidos com MWNTs.

O cálculo da área eletroativa foi feito novamente com recurso à equação de Randles Sevcik assumindo-se que a fibra de carbono tem uma estrutura planar. O coeficiente de difusão do cloreto de ruténio usado foi de $7.15 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.

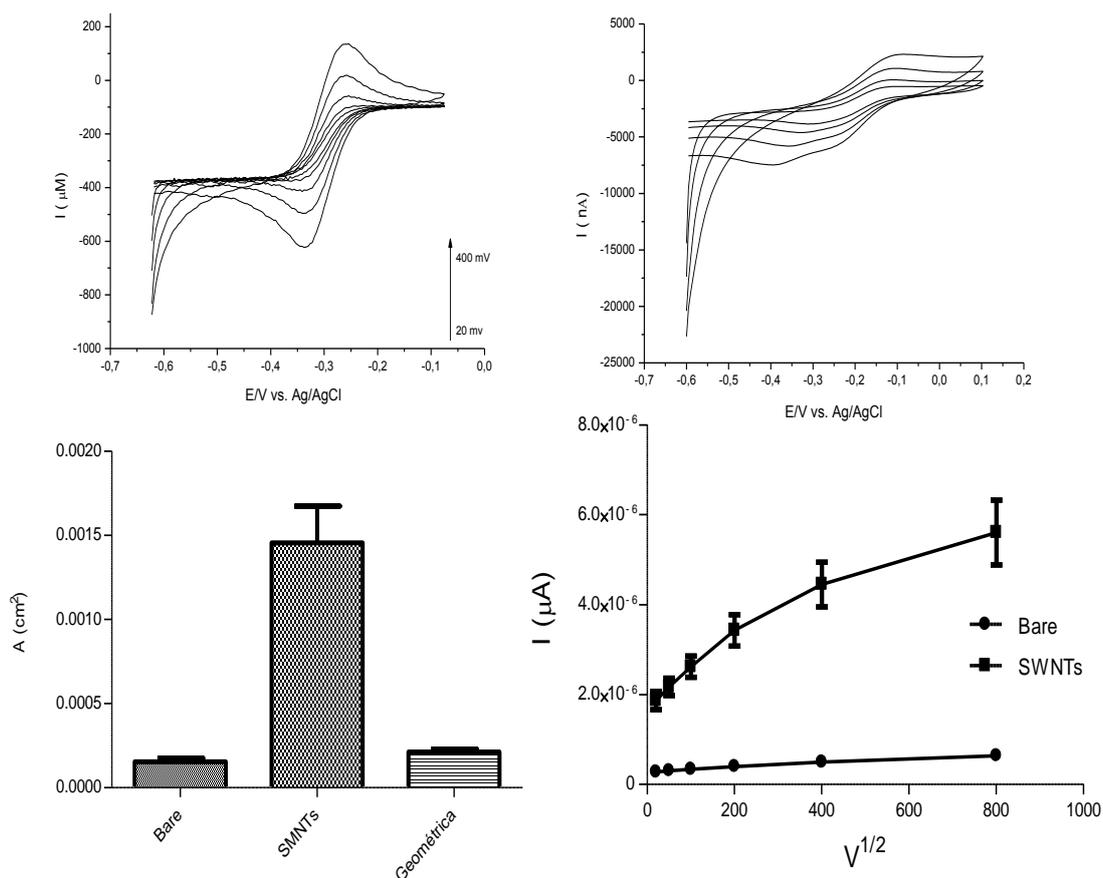


Figura 3.19 – Voltamogramas cíclicos de elétrodos de fibra de carbono não revestidos (A) e revestidos com 100 mg/ml MWNTs (B) na presença de 10 mM de cloreto de rutênio em meio 0.1 M de H_2SO_4 a pH 3. Gráfico da área eletroquímica e geométrica de elétrodos bare e revestidos com 100 mg/ml MWNTs (C) e gráfico da I vs. $V^{1/2}$ para o pico catódico em meio 10 mM de cloreto de rutênio em meio 0.1 M de H_2SO_4 a pH 3. As barras indicam o desvio padrão.

Segundo os resultados obtidos na secção dos elétrodos *screen-printing* e nos estudos preliminares com os elétrodos de carbono vítreo, a hemina demonstrou ser a macromolécula com a performance mais robusta, quer não só no processo de imobilização, mas também na sensibilidade a NO. Como não é uma proteína, não está exposta a processos de desnaturação dependente do pH, temperatura ou agentes mecânicos, o que pode representar uma enorme vantagem para o sistema eletroquímico. A correta orientação do grupo heme na superfície do elétrodo é facilitada relativamente a macromoléculas de maior peso molecular (ex: mioglobina), que possuem cadeias polipeptídicas a rodear o seu centro ativo. Como o objetivo principal é o desenvolvimento de um microsensar para a medição de NO em cérebro de rato, testaram-se 3 diferentes protocolos: adsorção,

eletropolimerização com quitosano e eletropolimerização com quitosano na presença de EDC baseados na imobilização da hemina.

3.3.2 Caracterização dos filmes de microelétrodos de carbono

Na figura 3.20 estão representados os compósitos depois de secos da hemina/MWNTs-COOH imobilizados por adsorção (A), eletrodeposição com quitosano (B) e eletrodeposição com quitosano em *cross-linking* com os MWNTs-COOH e hemina. Todas as imagens foram obtidas por microscopia eletrónica de varrimento (SEM). As diferenças entre a fibra não revestida (controlo) e a fibra revestida pelo processo de adsorção são mínimas, sugerindo a formação de um filme muito fino de hemina/MWNTs na superfície da fibra de carbono. Devido à pequena dimensão destas fibras, o processo de adsorção por deposição de gota na superfície do eléctrodo torna-se inviável, por isso efetua-se um processo de *dipping* da fibra numa solução de hemina/MWNTs. A adsorção ocorre por meio de ligações fracas como hidrofóbicas ou electroestáticas e a força de tensão exercida pela fibra na solução não é suficiente para arrastar consigo grande quantidade de material. No caso da precipitação da matriz de quitosano por aplicação de um potencial de -0.6V junto da superfície do microsensor, a quantidade de material imobilizado é substancialmente superior. O filme compósito dos eléctrodos CFM/Hemina/MWNTs/Quit mostra uma aparência mais rugosa nas imagens de SEM, devido em grande parte ao volume ocupado pela matriz de quitosano. Isto não significa um aumento de moléculas eletroativas imobilizadas na superfície da fibra. Quando se dá a ligação covalente dos MWNTs e da hemina, observa-se a formação de um filme heterogéneo e ainda mais volumoso (Fig 3.20C). Esta morfologia pode ser explicada devido à formação de longas cadeias de hemina/MWNTs ligadas covalentemente ao quitosano, que por sua vez se ligam a sucessivas cadeias poliméricas tornando a matriz mais robusta e heterogénea. A funcionalização dos grupos amina do quitosano devido à interação com o EDC pode alterar o comportamento dependente do pH afetado o processo de eletrodeposição na superfície do microeléctrodo.

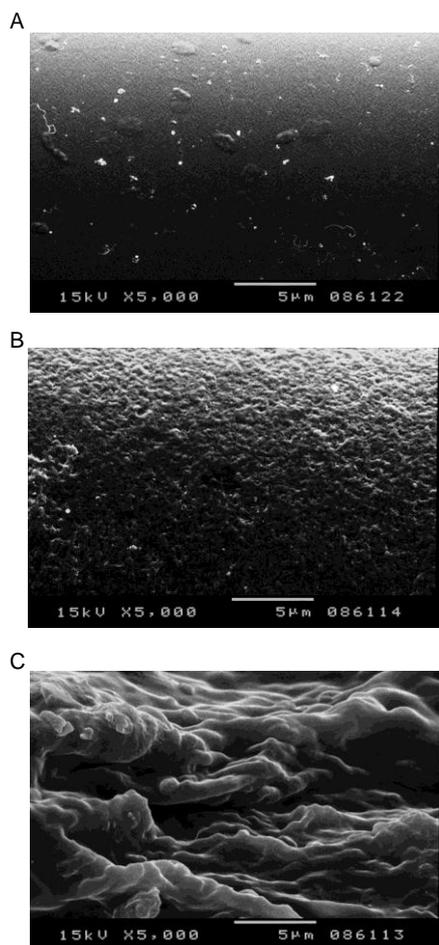


Figura 3.20 – Imagens SEM dos microbiossensores de Hemina com ampliação de 500 x. Hemina/MWNTs (A); Hemina/MWNTs/Quit (B) e Hemina/MWNTs/Quit-EDC (C). Adaptado de (Santos et al., 2013).

3.3.3 Caracterização Eletroquímica dos Microsensores

A caracterização eletroquímica dos filmes compósitos de hemina imobilizados na superfície dos sensores de fibra de carbono efetuou-se por voltametria cíclica (CV). O processo de DET foi obtido num intervalo de 5-100 V/s, sendo que para velocidades de varrimento mais baixas, os picos do par redox do $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ tornaram-se quase impercetíveis e não foram quantificados. Na Fig. 3.21A observam-se os voltamogramas relativos a um microsensor CFM/Hemin/MWNTs/Quit-EDC obtidos em meio PBS e na ausência de oxigénio. Os picos catódicos (E_{pc}) e anódicos (E_{pa}) do par redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ da hemina, a uma velocidade de 10 V/s, foram de -0.370 ± 0.0012 V e -0.305 ± 0.0019 V ($n=5$), respetivamente. Os valores estão de acordo com os reportados na literatura (Li et al., 2009). A calibração da intensidade da corrente (I) vs. velocidade de varrimento (\sqrt{v}) está presente na Fig. 3.22B. O declive dos picos I_{pc} vs. \sqrt{v} foi de 5.5 nA V^{-1} ($r^2 = 0.992$) e para I_{pa} foi de 4.8 nA V^{-1} ($r^2 = 0.995$), sendo a separação dos picos de 0.0065 ± 0.026 V a uma velocidade de 10 V/s. As médias dos potenciais dos picos, bem como os seus declives de I vs. \sqrt{v} do par $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ para os dois restantes filmes estão sumariados na tabela 3.

Os três protocolos foram testados na presença e ausência de MWNTs para estudo do seu efeito no processo de transferência de eletrões. Verificou-se que existe um aumento catalítico nos picos catódicos e anódicos nos sensores com MWNTs, contribuindo para a obtenção de maiores declives nos gráficos de I vs. \sqrt{v} . A diferença entre os dois grupos de sensores (MWNTs e controlo) calculou-se segundo o teste ANOVA de duas variáveis ($p < 0.01$). Os resultados mostram que os MWNTs aumentam de eficácia do processo de DET nas moléculas hémicas.

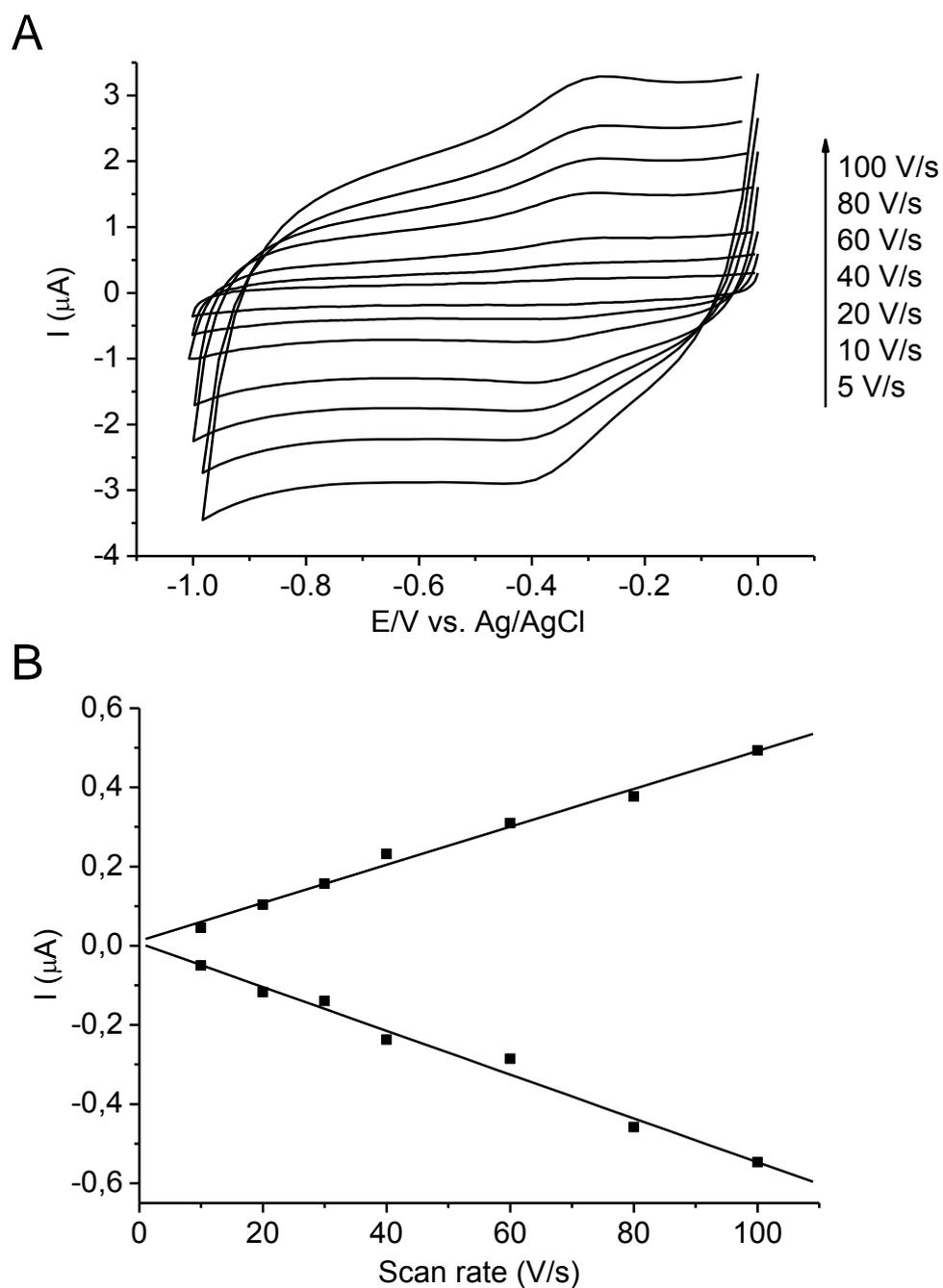


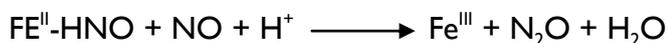
Figura 3.21 – Caracterização eletroquímica da hemina por voltametria cíclica. (A) Voltamogramas cíclicos do microsensor CFM/Hemina/Quit-EDC num intervalo de velocidade de varrimento entre 5-100 V/s . (B) Gráfico da corrente vs. \sqrt{v} , com declives de 5.5 nA V^{-1} ($r^2 = 0.992$) para I_{pc} e de 4.8 nA V^{-1} ($r^2 = 0.995$) para I_{pa} . Adaptado de (Santos et al., 2013).

Tabela 3 – Comparação dos valores médios dos picos de corrente catódica (I_{pc}) e anódica (I_{pa}) em função da velocidade de varrimento (v) para os diferentes microsensores estudados. Todos os valores são apresentados como a média \pm desvio padrão e o número de elétrodos testados encontram-se entre parêntesis.

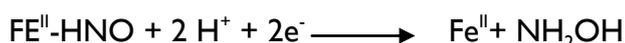
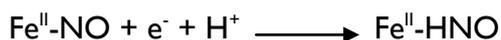
Microsensor	EP_c (V)	EP_a (V)	Declive IP_c vs. v (nA V⁻¹ s)	Declive IP_a vs. v (nA V⁻¹ s)
CFM/Hemina	-0.373 \pm 0.012 (3.2%) (n=4)	-0.297 \pm 0.048 (16%) (n=4)	-1.15 \pm 0.41 (36%) (n=4)	0.81 \pm 0.36 (44%) (n=4)
CFM/Hemina/MWNTs	-0.396 \pm 0.031 (7.6%) (n=8)	-0.281 \pm 0.023 (8.1%) (n=8)	-4.59 \pm 3.67 (80%) (n=7)	3.72 \pm 3.12 (84%) (n=3)
CFM/Hemina/Quit	-0.436 \pm 0.022 (5.0%) (n=6)	-0.287 \pm 0.086 (30%) (n=6)	-1.40 \pm 0.80 (57%) (n=9)	0.87 \pm 0.31 (36%) (n=9)
CFM/Hemina/MWNTs/Quit	-0.389 \pm 0.018 (4.6%) (n=11)	-0.319 \pm 0.024 (7.5%) (n=11)	-2.22 \pm 1.18 (53%) (n=9)	1.59 \pm 1.02 (64%) (n=10)
CFM/Hemina/Quit-EDC	-0.377 \pm 0.017 (4.5%) (n=5)	-0.289 \pm 0.029 (10%) (n=5)	-2.45 \pm 0.59 (24%) (n=5)	2.09 \pm 0.63 (30%) (n=5)
CFM/Hemina/MWNTs/Quit-EDC	-0.382 \pm 0.018 (4.7%) (n=13)	-0.286 \pm 0.021 (7.4%) (n=13)	-3.82 \pm 1.95 (51%) (n=11)	3.08 \pm 1.51 (49%) (n=11)

3.3.4 Redução Eletrocatalítica do Óxido Nítrico

No caso da imobilização de proteínas hémicas como a mioglobina e a hemoglobina, o mecanismo previamente reportado para a redução do NO procede via formação de um aduto Fe^{II} -HNO que subsequentemente reage com o NO para formar N_2O :



No entanto a reação com a hemina leva à formação de NH_2OH e ocorre segundo um mecanismo EC (transferência de eletrões seguido de uma reação química) Os primeiros dois passos são idênticos aos anteriores, em que se dá novamente a formação do aduto Fe^{II} -HNO. Este reage novamente e dá origem ao produto de reacção hidroxilamina (NH_2OH) pelos passos seguintes:



O mecanismo seguido pela redução do NO pode estar relacionado com os resíduos posicionados próximos do grupo heme, o modo de transferência dos eletrões para o grupo heme, a forma como a segunda molécula de NO se liga ao centro ativo e a influência do pH. A forma como os eletrões são fornecidos ao centro catalítico da macromolécula pode ter uma enorme influência na selecção do mecanismo.

A monitorização da resposta dos microsensores a NO foi avaliada por voltametria de onda quadrada pela adição sucessiva de uma solução saturada de NO na ausência de oxigénio. Os volumes adicionados corresponderam a uma concentração de 250, 500 e 1000 nM de NO e para todos os microsensores traçou-se uma reta de calibração com estes valores. A figura 3.22 mostra o pico catódico a -0.362 V de um microsensor CFM/Hemina/Quit-EDC antes e após a calibração com NO. As sensibilidades e os limites de detecção (LOD) dos biossensores para NO na presença e ausência de oxigénio estão reunidas de forma sumária na tabela 4.

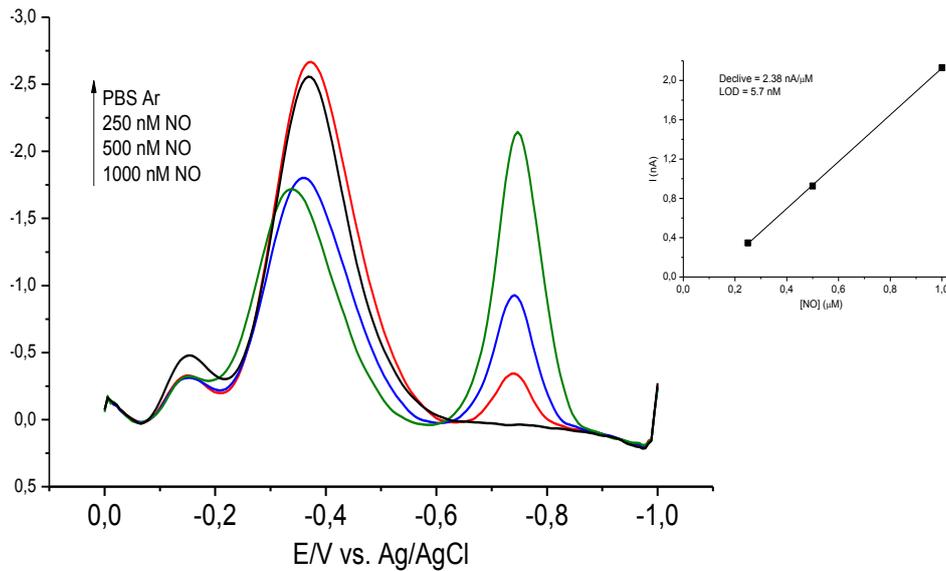


Figura 3.22 – Resposta do microsensor a NO na ausência de oxigênio. Voltamogramas de onda quadrada do sensor CFM/Hemina/Quit-EDC antes e após sucessivas adições de NO correspondentes a concentrações finais de 250, 500, 100 nM. Reta de calibração com sensibilidade de 2.30 nA/μM ($r^2 = 0.998$).

O filme de Hemina/MWNTs/Quit-EDC apresenta cerca de metade da sensibilidade para NO quando comparado com o filme na ausência de EDC e do formado por adsorção. (tabela 3). Isto pode estar relacionado com a limitação da difusão do NO através do filme até à superfície do microelétrodo, onde se localiza uma grande percentagem de moléculas de hemina. No entanto, os limites de deteção estão na gama dos reportados para a oxidação do NO (Hrbac et al., 2007); (Santos et al., 2008); (Brown et al., 2009); (Bedioui et al., 2010).

Tabela 4 – Comparação dos valores médios da resposta electrocatalítica a NO para os diferentes microsensores estudados. Todos os valores são apresentados como a média \pm desvio padrão e o número de elétrodos testados encontram-se entre parêntesis.

Microsensor	Ausência de oxigénio			Presença de oxigénio (43 μ M)		
	Pico NO (V)	Sensib. (nA/ μ M)	LOD	Pico NO (V)	Sensib. (nA/ μ M)	LOD
CFM/Hemina/MWNTs	-0.737 \pm 0.004 (0.6%) (n=7)	4.62 \pm 1.66 (36%)* (n=7)	7.9 \pm 3.87 (49%)* (n=7)	-	-	-
CFM/Hemina/MWNTs/Quit	-0.752 \pm 0.009 (1.2%) (n=12)	4.19 \pm 1.55 (37%)* (n=12)	12.2 \pm 9.15 (75%) (n=12)	-0.705 \pm 0.015 (2.1%)# (n=7)	4.29 \pm 3.52 (82%) (n=5)	13 \pm 3.8 (29%) (n=5)
CFM/Hemina/MWNTs/Qui-EDC	-0.762 \pm 0.11 (1.4%) (n=17)	1.72 \pm 0.67 (39%) (n=16)	25 \pm 15 (58%) (n=16)	-0.719 \pm 0.012 (1.6%)# (n=15)	2.61 \pm 1.67 (64%) (n=15)	26 \pm 15 (59%) (n=15)

*, p <0.05 vs. CFM/Hemina/MWNTs/Qui-EDC; #, p <0.0001 vs. Ausência de oxigénio

Apesar da diminuição da sensibilidade dos microsensores CFM/Hemina/MWNTs/Qui-EDC, estes revelaram ser muito mais estáveis na presença de oxigénio. Tantos os CFM/Hemina/MWNTs/Quit com os CFM/Hemina/MWNTs diminuíram a sua resposta catalítica ao NO, sendo que para os segundos, a resposta ficou totalmente inviabilizada. Nestes testes, foram adicionados quatro volumes de PBS oxigenado até perfazer uma concentração aproximadamente 40 μ M de O₂, mimetizando as concentrações “*in vivo*”. A interferência do oxigénio em medições de NO *in vivo* está reportado para potenciais de redução negativos. A figura 3.23A mostra a média da amplitude do pico O₂ para os diferentes tipos de elétrodos após decorridos 100 scans de onda quadrada. Observa-se que o pico do oxigénio dos microsensores CFM/Hemina/MWNTs/Quit-EDC não se altera significativamente, enquanto existe uma grande diminuição para os outros dois tipos de biossensores. No desaparecimento do pico do O₂ durante os sucessivos scans, o pico do par redox Fe²⁺/Fe³⁺ é também afetado. Este processo é irreversível e o microsensor

deixa de possuir sensibilidade ao NO. Estes resultados demonstram que os microsensores em que a hemina está covalentemente ligada ao quitosano e nanotubos de carbono funcionalizados são os mais apropriados para a medição de NO em tecidos biológicos devido à sua capacidade de manter a resposta eletroquímica da hemina em condições fisiológicas de O₂. A perda de resposta observada nos sucessivos varrimentos na presença de oxigênio ficou a dever-se provavelmente à desadsorção da hemina da superfície do eletrodo. Foi reportado que muitos sistemas eletroquímicos de metaloporfirinas não são muito estáveis (Zheng et al., 2002; Cao et al.,2012).

A resposta analítica a NO pelos microsensores na presença de oxigênio foi também avaliada. Na fig. 25B mostra-se um voltamograma para CFM/Hemina/Quit-EDC após adição de 250, 500 e 1000 nM de NO. O pico de redução do NO foi observado a um potencial de -0.719 ± 0.011 V (n=15), um valor mais baixo comparado com o observado na ausência de O₂. (-0.762 ± 0.010 V, $p < 0.0001$) e estão sumariados na tabela 4. Para os microsensores CFM/MWNTs/Hemina não foi possível a quantificação de NO devido à sua fraca estabilidade eletroquímica.

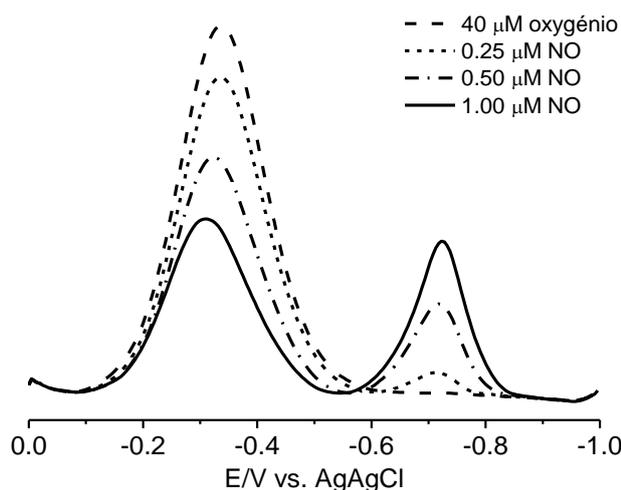
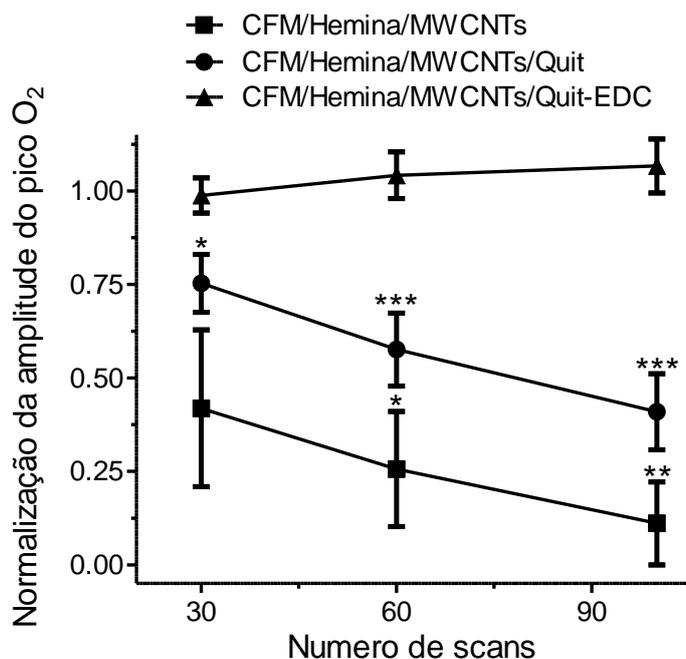


Figura 3.23 – Estabilidade e resposta a NO do microsensor na presença de O₂. (A) Média da redução da amplitude do pico de oxigénio obtida por voltametria de onda quadrada para os três tipos de sensores após 30, 60 e 100 scans. (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 vs. Amplitude do pico no primeiro scan (n=4-8)). (B) Voltamograms de onda quadrada de um microsensor CFM/Hemina/MWNTs/Quit-EDC após sucessivas adições de NO correspondentes a 250, 500 e 100 nM na presença de 43 μM de oxigénio. Adaptado de (Santos et al., 2013).

3.4 Selectividade

A seletividade dos microsensors Hemina/MWNTs/Quit-EDC contra potenciais interferentes presentes no espaço extracelular do cérebro mostra-se na figura do gráfico

3.24. O microsensor não respondeu a ascorbato (250 μM), dopamina (8 μM), DOPAC (80 μM) e nitrito (80 μM). Verificou-se um pico -0.332 V derivado do potencial de redução do peróxido de hidrogénio (H_2O_2), que no entanto não interfere com a redução electrocatalítica do NO. Os resultados indicam que os microsensores demonstram uma elevada seletividade ao NO, maior do que o reportado para os microsensores baseados na sua oxidação (Bedioui et al., 2010).

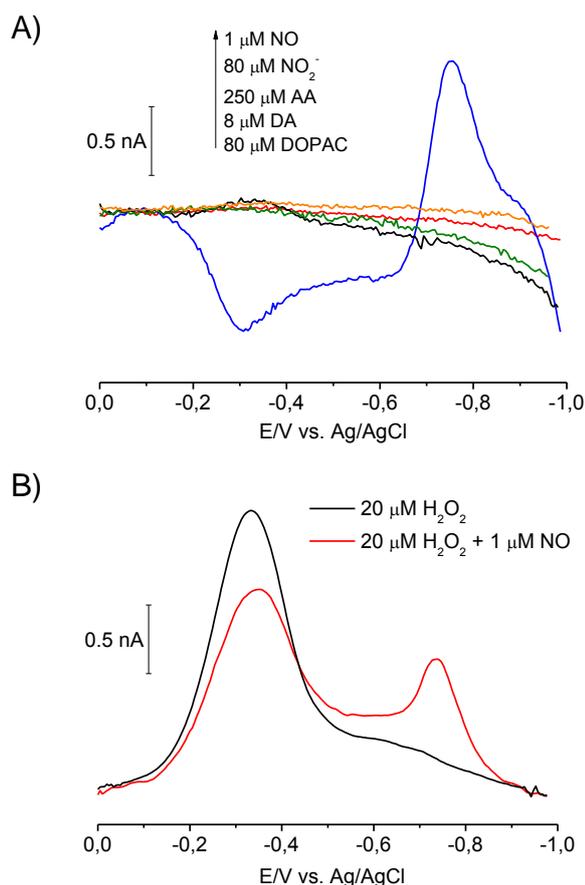


Figura 3.24 – (A) Voltametria de onda quadrada obtida por um microsensor Hemina/MWNTs/Quit EDC em PBS e na ausência de O_2 para 1 μM NO, 80 μM de NO_2^- , 250 μM ascorbato, 8 μM dopamina e 80 μM de DOPAC. (B) Scans de Voltametria cíclica contendo 20 μM H_2O_2 seguido da adição de 1 μM de NO.

3.5. Medição de Óxido Nítrico *In Vivo* em Cérebro de Rato

Para demonstrar a utilidade do microsensor CFM/MWNTs/Quit-EDC, procedeu-se à aplicação exógena “*in vivo*” em cérebro de rato de pequenos volumes de NO. Uma solução saturada foi aplicada localmente com a ajuda de uma micropipeta localizada a 250 μm da

ponta do eléctrodo. Os sinais obtidos exogenamente são de curta duração (Santos et al., 2011) e são necessários parâmetros eletroquímicos com elevada resolução temporal, e por isso a janela de potencial para os voltamogramas de onda quadrada foi dentro do intervalo de -0.5 a -1.0V com um degrau de 10 mV e uma frequência de 25 Hz.

A fig.3.25A mostra vários varrimentos obtidos após aplicação local de 125 nL da solução saturada de NO no hipocampo de rato. A amplitude máxima do pico foi obtida no terceiro varrimento após a injeção de NO, seguida de um rápido abaixamento nos varrimentos posteriores. Em todas as experiências, O NO foi detetado nos primeiros 2 a 3 varrimentos após a sua injeção pela micropipeta, correspondendo a uma duração de aproximadamente 10 s, de acordo com resultados obtidos com microeléctrodos revestidos com Nafion (Santos et al., 2011) A duração do sinal bem como o seu potencial está representado no gráfico a cores da Fig.3.25B.

Antes da inserção do microeléctrodo no cérebro de rato, o biossensor foi calibrado com soluções de NO de concentração 250, 500 e 1000 nM. A sensibilidade obtida foi de NO foi de 3.97 nA / μ M, e com base neste cálculo, a concentração máxima de NO detetada *in vivo* foi de aproximadamente 1 μ M. O potencial de pico do NO foi de -0.850 V, cerca de 0.075 V desviado do seu valor *in vitro*, devido provavelmente à composição do meio extra celular e/ou do uso de uma pseudo-referência de Ag/AgCl usada na configuração de dois eléctrodos.

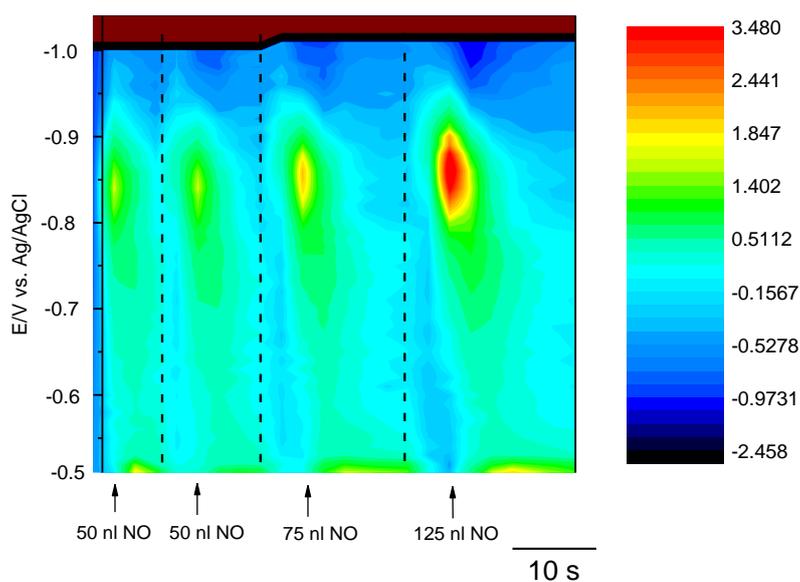
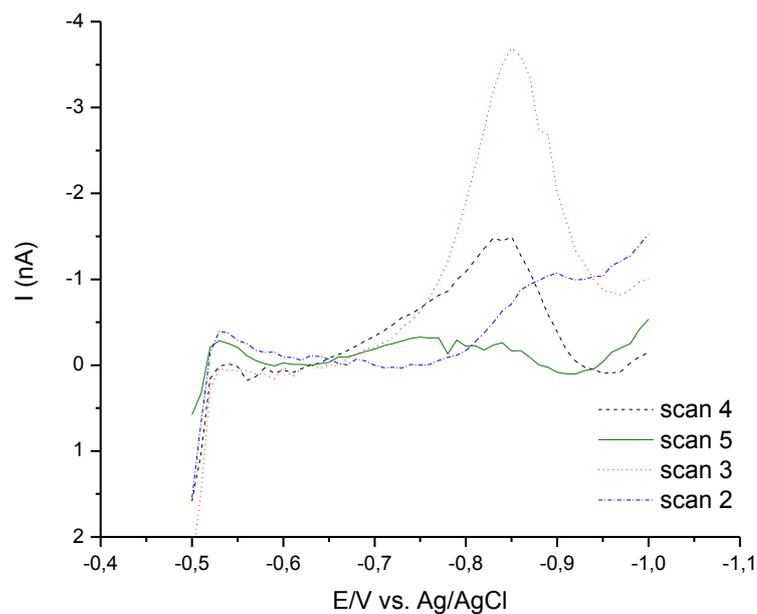


Figura 3.25 – Detecção de NO exógeno *in vivo* em cérebro de rato. O NO foi medido após injeção de pequenos volumes (nl) de uma solução saturada injetados por uma micropipeta a 250 μm do microsensor inserido no hipocampo. A) Voltamogramas de onda quadrada após injeção local de 125 nl de NO. B) Gráfico a cores da intensidade da corrente.

4. CONCLUSÕES

Devido às propriedades físico-químicas e interação com inúmeros alvos biológicos, a detecção da molécula de NO requer metodologias capazes de aliar uma medição em tempo real do analito com elevados níveis de seletividade e sensibilidade. Como o NO é responsável pela regulação de fenómenos de neurotransmissão, os microelétrodos de carbono constituem uma ferramenta analítica com grandes potencialidades para o estudo de mecanismos nos quais o NO exerce a sua atividade no cérebro. O conjunto de dados recolhidos neste trabalho permitiram concluir:

1. Os métodos de imobilização na superfície de elétrodos de carbono influenciam a forma como o NO interage com o centro ativo das diferentes macromoléculas estudadas. Apesar de todas possuírem no seu centro ativo um heme férrico, os tempos de resposta e a seletividade são distintos entre as macromoléculas, devido à distância entre o centro ativo e o analito.
2. A elaboração de microelétrodos de fibra de carbono e o seu revestimento com um filme de MWNTs/Hemina/Quit-EDC possibilitou a detecção de NO a potenciais de redução de uma forma sensível e seletiva na gama de concentrações dos nanomolar. Além disso, após inserção do biossensor no hipocampo de cérebro de rato, a resposta a NO é mantida, o que indica uma forte robustez do filme imobilizado.

5. BIBLIOGRAFIA

- Agui, L., P. Yanez-Sedeno and J. M. Pingarron (2008). "Role of carbon nanotubes in electroanalytical chemistry: a review." *Anal Chim Acta* **622**(1-2): 11-47.
- Aizawa, M. (1991). "Immunosensors." *Bioprocess Technol* **15**: 249-266.
- Alderton, W. K., C. E. Cooper and R. G. Knowles (2001). "Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition." *Biochem J* **357**(Pt 3): 593-615.
- Andreescu, S. and J. L. Marty (2006). "Twenty years research in cholinesterase biosensors: from basic research to practical applications." *Biomol Eng* **23**(1): 1-15.
- Andreescu, S. et al. (2002). "Screen-printed electrode based on AChE for the detection of pesticides in presence of organic solvents." *Talanta* **57**(1): 169-176.
- Augusto, O., R. M. Gatti and R. Radi (1994). "Spin-trapping studies of peroxynitrite decomposition and of 3-morpholinopyridone N-ethylcarbamide autooxidation: direct evidence for metal-independent formation of free radical intermediates." *Arch Biochem Biophys* **310**(1): 118-125.
- Barbosa, R. M. et al. (2008). "In vivo real-time measurement of nitric oxide in anesthetized rat brain." *Methods Enzymol* **441**: 351-367.
- Batchelor, A. M. et al. (2010). "Exquisite sensitivity to subsecond, picomolar nitric oxide transients conferred on cells by guanylyl cyclase-coupled receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(51): 22060-22065.
- Beckman, J. S. and W. H. Koppenol (1996). "Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly." *Am J Physiol* **271**(5 Pt 1): C1424-1437.
- Bedioui, F. et al. (2010). "Designing molecular materials and strategies for the electrochemical detection of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite in biological systems." *Phys Chem Chem Phys* **12**(34): 9976-9988.
- Bolado, P., F., et al. (2007) "Electrochemical characterization of screen-printed and conventional carbon paste electrodes." *Electrochimica Acta*.
- Borutaite, V. and G. C. Brown (1996). "Rapid reduction of nitric oxide by mitochondria, and reversible inhibition of mitochondrial respiration by nitric oxide." *Biochem J* **315** (Pt 1): 295-299.
- Brown, F. O., N. J. Finnerty and J. P. Lowry (2009). "Nitric oxide monitoring in brain extracellular fluid: characterisation of Nafion-modified Pt electrodes in vitro and in vivo." *Analyst* **134**(10): 2012-2020.
- Clark, L. C., Jr. and C. Lyons (1962). "Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery." *Ann N Y Acad Sci* **102**: 29-45.
- Corgier, B., C. Marquette and L. Blum (2005) "Screen Printed Electrode microarray for electrochemiluminescent measurements." *Anal Chem Acta*
- Ford, P. C., D. A. Wink and D. M. Stanbury (1993). "Autoxidation kinetics of aqueous nitric oxide." *FEBS Lett* **326**(1-3): 1-3.
- Fritzen Garcia, M. et al. (2009) "Carbon paste electrode modified with pine kernel peroxidase immobilized on pegylated polyurethane nanoparticles." *Sens Actuators B Chem*.
- Furchgott, R. F. and P. M. Vanhoutte (1989). "Endothelium-derived relaxing and contracting factors." *FASEB J* **3**(9): 2007-2018.
- Garthwaite, J. (2008). "Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission." *Eur J Neurosci* **27**(11): 2783-2802.
- Ghica, M. E. et al. (2009) "Application of functionalised carbon nanotubes immobilised into chitosan films in amperometric enzyme biosensors." *Sensors and Actuators B: Chemical*.
- Girgis, R. E. et al. (2003) "Decreased exhaled nitric oxide in sickle cell disease : relationship with chronic lung involvement." *Am J Hematol*, 177-184.
- Grassi, B. et al. (2005). "Effects of nitric oxide synthase inhibition by L-NAME on oxygen uptake kinetics in isolated canine muscle in situ." *J Physiol* **568**(Pt 3): 1021-1033.
- Griffith, O. W. and D. J. Stuehr (1995). "Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism." *Annu Rev Physiol* **57**: 707-736.

- Groot, M. T., M., Merckx.M and M. T. Koper (2005) "Heme Release in Myoglobin-DDAB Films and its Role in Electrochemical NO Reduction." JACS ARTICLES.
- Guan, W. J. et al. (2005). "Glucose biosensor based on multi-wall carbon nanotubes and screen printed carbon electrodes." Biosens Bioelectron **21**(3): 508-512.
- Guo, Z. et al. (2008). "Direct electrochemistry of hemoglobin and myoglobin at didodecyldimethylammonium bromide-modified powder microelectrode and application for electrochemical detection of nitric oxide." Anal Chim Acta **607**(1): 30-36.
- Hafizi, S., Z. L. Kruk and J. A. Stamford (1990). "Fast cyclic voltammetry: improved sensitivity to dopamine with extended oxidation scan limits." J Neurosci Methods **33**(1): 41-49.
- Hall, D. M. and G. R. Buettner (1996). "In vivo spin trapping of nitric oxide by heme: electron paramagnetic resonance detection ex vivo." Methods Enzymol **268**: 188-192.
- Hara, K. and R. A. Harris (2002). "The anesthetic mechanism of urethane: the effects on neurotransmitter-gated ion channels." Anesth Analg **94**(2): 313-318, table of contents.
- Hrapovic, S. et al. (2004). "Electrochemical biosensing platforms using platinum nanoparticles and carbon nanotubes." Anal Chem **76**(4): 1083-1088.
- Hrbac, J. et al. (2007). "Nitric oxide sensor based on carbon fiber covered with nickel porphyrin layer deposited using optimized electropolymerization procedure." Bioelectrochemistry **71**(1): 46-53.
- Hu, L., D. S. Hecht and G. Gruner (2010). "Carbon nanotube thin films: fabrication, properties, and applications." Chem Rev **110**(10): 5790-5844.
- Ignarro, L. J. et al. (1987). "Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical." Circ Res **61**(6): 866-879.
- Ignarro, L. J. et al. (1993). "Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(17): 8103-8107.
- Kornau, H. C. et al. (1995). "Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95." Science **269**(5231): 1737-1740.
- Kozlov, A. V. et al. (1996). "Electron paramagnetic resonance characterization of rat neuronal nitric oxide production ex vivo." Methods Enzymol **268**: 229-236.
- Krajewska, B. (2004) "Application of chitin-and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. ." Enzyme Microb Technol.
- Lancaster, J. R. (2000) "The Physical Properties of Nitric Oxide." Acad Press.
- Lee, Y. M. et al. (2006). "Immobilization of horseradish peroxidase on multi-wall carbon nanotubes and its electrochemical properties." Biotechnol Lett **28**(1): 39-43.
- Li, C. Z. et al. (2009). "Metallo Protoporphyrin Functionalized Microelectrodes for Electrocatalytic Sensing of Nitric Oxide." Am J Biomed Sci **1**(3): 274-282.
- Li G., Wang Y. and H. Xu (2007) "A Hydrogen Peroxide Sensor Prepared by Electropolymerization of Pyrrole Based on Screen Printed Carbon Paste Electrodes." Sensors
- Liu, S. and Y. Sun (2007). "Co-immobilization of glucose oxidase and hexokinase on silicate hybrid sol-gel membrane for glucose and ATP detections." Biosens Bioelectron **22**(6): 905-911.
- Lojou, E. and P. Bianco (2005) "Application of electrochemical concepts and techniques to amperometric biosensor devices." J Electroceram.
- Malinski, T. et al. (1993). "Diffusion of nitric oxide in the aorta wall monitored in situ by porphyrinic microsensors." Biochem Biophys Res Commun **193**(3): 1076-1082.
- Marley, R. et al. (2000) "A chemiluminescence-based assay for S-nitrosoalbumin and other plasma S-nitrosothiols." Free Radic Res, 1-9.
- McCreery, R. L. (2008). "Advanced carbon electrode materials for molecular electrochemistry." Chem Rev **108**(7): 2646-2687.
- Meulemans, A. (1994). "Diffusion coefficients and half-lives of nitric oxide and N-nitroso-L-arginine in rat cortex." Neurosci Lett **171**(1-2): 89-93.
- Michel, H. et al. (1998). "Cytochrome c oxidase: structure and spectroscopy." Annu Rev Biophys Biomol Struct **27**: 329-356.

- Miles, A. M. et al. (1996). "Determination of nitric oxide using fluorescence spectroscopy." *Methods Enzymol* **268**: 105-120.
- Moncada, S., R. M. Palmer and E. A. Higgs (1989). "Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication." *Biochem Pharmacol* **38**(11): 1709-1715.
- Monk, P. (2001). *Fundamentals of Electroanalytical Chemistry*.
- Nagababu, E. et al. (2003). "Active nitric oxide produced in the red cell under hypoxic conditions by deoxyhemoglobin-mediated nitrite reduction." *J Biol Chem* **278**(47): 46349-46356.
- Nims, R. W. et al. (1996). "Colorimetric assays for nitric oxide and nitrogen oxide species formed from nitric oxide stock solutions and donor compounds." *Methods Enzymol* **268**: 93-105.
- Palmer, R. M., A. G. Ferrige and S. Moncada (1987). "Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor." *Nature* **327**(6122): 524-526.
- Pauliukaite, R. et al. (2009). "Comparative study of different cross-linking agents for the immobilization of functionalized carbon nanotubes within a chitosan film supported on a graphite-epoxy composite electrode." *Anal Chem* **81**(13): 5364-5372.
- Ronkainen, N. J., H. B. Halsall and W. R. Heineman (2010). "Electrochemical biosensors." *Chem Soc Rev* **39**(5): 1747-1763.
- Rubbo, H. et al. (1994). "Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives." *J Biol Chem* **269**(42): 26066-26075.
- Santos, R. M. et al. (2011). "Evidence for a pathway that facilitates nitric oxide diffusion in the brain." *Neurochem Int* **59**(1): 90-96.
- Santos, R. M. et al. (2012). "Nitric oxide inactivation mechanisms in the brain: role in bioenergetics and neurodegeneration." *Int J Cell Biol* **2012**: 391914.
- Santos, R. M. et al. (2008). "A comparative study of carbon fiber-based microelectrodes for the measurement of nitric oxide in brain tissue." *Biosens Bioelectron* **24**(4): 704-709.
- Santos, R. M. et al. (2011). "Brain nitric oxide inactivation is governed by the vasculature." *Antioxid Redox Signal* **14**(6): 1011-1021.
- Santos, R. M. et al. (2013). "Biomimetic sensor based on hemin/carbon nanotubes/chitosan modified microelectrode for nitric oxide measurement in the brain." *Biosens Bioelectron* **44**: 152-159.
- Sassolas, A., L. J. Blum and B. D. Leca-Bouvier (2012). "Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors." *Biotechnol Adv* **30**(3): 489-511.
- Siervo, M. et al. (2011). "Measurement of in vivo nitric oxide synthesis in humans using stable isotopic methods: a systematic review." *Free Radic Biol Med* **51**(4): 795-804.
- Stamford, J. A. (1990). "Fast cyclic voltammetry: measuring transmitter release in 'real time'." *J Neurosci Methods* **34**(1-3): 67-72.
- Stuehr, D. J. et al. (2004). "Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases." *J Biol Chem* **279**(35): 36167-36170.
- Subczynski, W. K., M. Lomnicka and J. S. Hyde (1996). "Permeability of nitric oxide through lipid bilayer membranes." *Free Radic Res* **24**(5): 343-349.
- Tarpey, M. M. and I. Fridovich (2001). "Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite." *Circ Res* **89**(3): 224-236.
- Thevenot, D. R. et al. (2001). "Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification." *Biosens Bioelectron* **16**(1-2): 121-131.
- Tudorache, M. and C. Bala (2007). "Biosensors based on screen-printing technology, and their applications in environmental and food analysis." *Anal Bioanal Chem* **388**(3): 565-578.
- Wang, J. and M. Musameh (2004). "Carbon nanotube screen-printed electrochemical sensors." *Analyst* **129**(1): 1-2.
- Wang, J. et al. (2009). "Electrodeposition of gold nanoparticles on indium/tin oxide electrode for fabrication of a disposable hydrogen peroxide biosensor." *Talanta* **77**(4): 1454-1459.
- Whittle, B. J. (1995). "Nitric oxide in physiology and pathology." *Histochem J* **27**(10): 727-737.

- Winger, J. A., E. R. Derbyshire and M. A. Marletta (2007). "Dissociation of nitric oxide from soluble guanylate cyclase and heme-nitric oxide/oxygen binding domain constructs." *J Biol Chem* **282**(2): 897-907.
- Wink, D. A. et al. (1996). "Direct and indirect effects of nitric oxide in chemical reactions relevant to biology." *Methods Enzymol* **268**: 12-31.
- Yi, H. et al. (2005). "Biofabrication with chitosan." *Biomacromolecules* **6**(6): 2881-2894.
- Zhang, R., X. Wang and K. K. Shiu (2007). "Accelerated direct electrochemistry of hemoglobin based on hemoglobin-carbon nanotube (Hb-CNT) assembly." *J Colloid Interface Sci* **316**(2): 517-522.
- Zhou, Q. et al. (2007). "Electrodeposition of carbon nanotubes-chitosan-glucose oxidase biosensing composite films triggered by reduction of p-benzoquinone or H₂O₂." *J Phys Chem B* **111**(38): 11276-11284.