



Desenvolvimento de um Sensor Químico de Nanotubos de Carbono a Base de Ácido Ferúlico para Detecção Seletiva de Ácido Ascórbico e Ácido Úrico.

João Paixão dos Santos Neto¹, Joab Serra Rodrigues da Silva¹, Erivaldo de O. Costa², Leonardo Vieira da Silva³, Marília Oliveira Fonseca Goulart⁴, Phabyanno Rodrigues Lima⁵

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

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

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

⁴Professora do Curso de Química – UFAL. Orientadora no Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia – UFAL, Doutorado em Química – UFMG, Pós-Doutorado na Queen Mary And Westfield College. e-mail: mariliaofg@gmail.com

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

Resumo: O desenvolvimento de novos sensores químicos tem sido o foco de muitos trabalhos no campo da eletroquímica como pode ser observado na literatura científica com seletiva política editorial e alto fator de impacto, justificado, por exemplo, pela versatilidade, simplicidade e alta sensibilidade no reconhecimento de analitos-alvo. Assim sendo, no trabalho é descrito o desenvolvido de um sensor químico modificado com nanotubos de carbono funcionalizado com ácido ferúlico (AF) ativado tendo como finalidade a detecção de antioxidantes tais como o ácido ascórbico(AA) e ácido úrico (AU). Após o processo de imobilização (polimerização via técnica potenciodinâmica, $E_i = -0,25$ e $E_\lambda = 0,8$ vs. Ag/AgCl), a poli-AF, foi eletrogerada *in situ* sobre o MWCNT depositado em carbono vítreo, gerando, o par redox quinona/hidroquinona, $E^\circ = 0,20$ V vs. Ag/AgCl. Com intuito de verificar o comportamento da sonda eletrogerada, foi selecionada a técnica eletroquímica de voltametria cíclica. A sonda redox apresentou atividade eletrocatalítica ($E = 0,20$ V vs. Ag/AgCl) frente a detecção de AA. Por outro lado, o mesmo sistema nanoestruturado não é sensível ao reconhecimento eletrocatalítico de AU, sendo, portanto, uma alternativa simples e inovadora para a determinação simultânea de AA e AU em matrizes biológicas, uma vez que esses analitos apresentam o mesmo potencial de detecção quando do uso de sistemas convencionais para reconhecimento (eletrodos não modificados).

Palavras-chave: ácido ascórbico, ácido ferúlico, ácido úrico, sensor químico.

1. INTRODUÇÃO

O ácido ascórbico (AA) ou vitamina C é essencial ao homem, pois não pode ser sintetizado a partir da glicose que é seu precursor, como ocorre em plantas e na maioria dos animais. Em sistemas biológicos, em pH fisiológico (7,4), 99,95 % da vitamina C (AA) encontra-se na forma de ascorbato, que é a forma que atua como antioxidante, ao doar um H• ou $[H^+ + e^-]$ para um radical. O ascorbato, atua como antioxidante sobre ERO e ERN, em ambiente biológico aquoso, resultando na formação do ânion radical semidesidroascorbato (Asc•), ou ascorbila, pouco reativo. Atua eficientemente sobre o ânion-radical superóxido (O_2^\bullet), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o hipoclorito (ClO^-) e os radicais hidroxila ($\bullet OH$) e peroxila ($\bullet OOH$). O ascorbato pode atuar diretamente nas membranas celulares, por impedir a iniciação da peroxidação lipídica ou, indiretamente, por regenerar a vitamina E, que atua como antioxidante na face lipofílica da membrana. (BARREIROS et al., ano 2009).

O ácido úrico (AU) deriva do metabolismo das purinas e é produzido pela oxidação de hipoxantina e xantina pela xantina oxidase e xantina desidrogenase. O AU apresenta atividade antioxidante significativa e sua concentração no plasma é maior que a de outros antioxidantes, tais como as vitaminas C e E (GHISELLI et al., ano 2000).

O maior problema para determinação eletroquímica de AU é a coexistência, em amostras biológicas, de AA em concentrações relativamente elevadas no plasma (Cantarow, A.e Schepartz ,B., ano 1957)(6,0-15,0 mg L⁻¹) e urina humana (G. A. HARRISON ano 1947) (10,0-60,0 mg/24h), espécies estas, que apresentam potenciais de oxidação muito próximos (KACHOOSANGI et al.,ano 2006) dificultando a detecção seletiva e simultânea destes analitos.

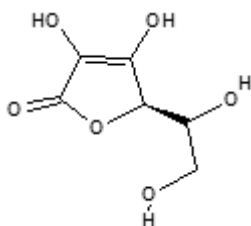


Figura 1- Ácido Ascórbico – (AA)

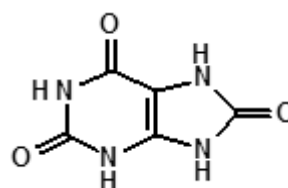


Figura 2 - Ácido Úrico – (AU)

Diversos métodos eletroquímicos têm sido desenvolvidos para a determinação de AA e AU em fluidos biológicos, buscando maior sensibilidade, seletividade, rapidez, diminuição de custos (quando comparado às técnicas colorimétricas e espectrofotométricas) . (SALIMI et al.,ano2005) e miniaturização do sistema, visando a realização de medidas in vivo (CHEN et al.,ano 2002). Assim sendo, devido à importância e dificuldade na determinação simultânea destes compostos o número de trabalhos publicados nos últimos anos enfocando o problema cresceu.

Com intuito de contornar estes problemas, os métodos eletroquímicos com foco na quantificação simultânea de AA e AU têm recebido atenção nas últimas décadas devido há uma série de vantagens inerentes a estes métodos, tais como seletividade, baixo custo, além da rapidez de análise observados durante o processo de detecção destas espécies. Por outro lado, a oxidação eletroquímica de AA e AU nos eletrodos convencionais (eletrodos na ausência de modificação) apresentam alguns problemáticas no tocante seletividade, pelo fato da detecção ocorrer no mesmo potencial de oxidação, bem como possibilidade de passivação da superfície eletródica pelo produto de oxidação destas espécies. (KACHOOSANGI et al.,ano 2006).

Neste sentido, os eletrodos quimicamente modificados (EQMs) têm sido frequentemente descritos como métodos analíticos sensíveis e seletivos para detecção, quantificação e separação dos picos de oxidação de AA e AU, como por exemplo, pelo uso de monocamadas covalentes de 5-hidroxitriptofano(LIN et al., ano 2006), eletrodos a base de enzimas(LIN et al., ano 1992), de pasta de carbono(GILMARTIN et al.,ano 1992) e (SHAHROKHIAN et al., ano2004),modificados com polímeros (YAO et al., ano 2001) ou a base de filmes de náfion (Zen J.M. e Hsu C.T.,ano1998), bem como outros sistemas baseados em meio micelar (surfactantes)(REIS et al ano 2008).Por outro lado, alguns desses catalisadores apresentam uma série de limitações como baixa sensibilidade, reprodutibilidade ou modestas constantes de velocidade. Assim, há uma busca contínua por novos dispositivos.

Para contornar tais problemas, o presente trabalho lança mão do ácido ferúlico, ácido-4-hidroxi-3-metoxicinâmico (AF) como candidato em potencial para reconhecimento dos analitos-alvo, Figura 2. O AF é um fenol muito encontrado no tecido de plantas. Este ácido é um constituinte bioativo de muitos alimentos, tais como, grãos, frutas cítricas, banana, brócolis, entre outras. Além de ser aprovado como um aditivo conservante / antioxidante no Japão, seu sal de sódio é usado na China para o tratamento de doenças cardiovasculares e cerebrais(G. A. HARRISON ano 1947).

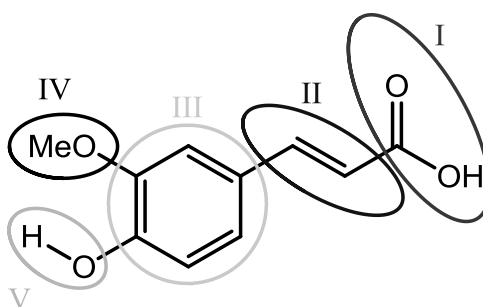


Figura 3. Ácido Ferúlico - (AF)

Apesar de possuir uma estrutura química relativamente simples, o que o viabiliza como bom candidato a mediador, o AF possui subunidades estruturais químicas estratégicas. Estas subunidades, Figura 3, podem desempenhar papéis fundamentais na confecção de um eletrodo quimicamente modificado:

- I) O grupo carboxila é fundamental, pois permite a introdução da enzima requerida;
- II) A dupla ligação permite a conjugação entre a parte aromática e a carboxila ajudando a estabilizar espécies transientes formadas, o que é importante, pois diminui o sobre potencial de oxirredução;
- III) O anel aromático, altamente conjugado pode estabilizar radicais e cátions formados, possibilitar ainda a formação de polímeros e conferir alta estabilidade;
- IV) A hidroxila fenólica localizada na posição *para*, portanto conjugada com II e I, pode perder elétrons de forma relativamente fácil, para constituir um possível par redox;
- V) A metoxila em *orto* à hidroxila possui pares de elétrons não ligantes e, portanto, em conjugação com possíveis espécies deficientes em elétrons que se formam a partir da hidroxila, torna-se um bom nucleófilo, que, carregado positivamente, sofre ataque nucleofílico por uma molécula de água, com quebra do éter e formação de uma *orto*-quinona. Apesar de possuir uma estrutura química relativamente simples, o que viabiliza como bom candidato a mediador na qual estas subunidades estruturais químicas em posição estratégica. Podendo desempenhar papéis fundamentais na confecção de um eletrodo quimicamente modificado.

Neste sentido, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver e empregar tecnologias simples e eficientes a partir da construção de novos sensores químicos, fundamentados em AF para a detecção e quantificação de ácido ascórbico e ácido úrico em amostras biológicas e alimentícia.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A detecção voltamétrica foi obtida empregando um potenciostato modelo PGSTAT-30 Eco Chemie da AUTOLAB (Utrecht, The Netherlands), interfaceado a um microcomputador (software: GPES 4.9). Uma célula eletroquímica com capacidade para três eletrodos foi utilizada com um eletrodo de Ag/AgCl saturado como referência, um fio de platina como eletrodo auxiliar e o eletrodo de trabalho de carbono vitreo (Figura 4).

As medidas foram realizadas usando 5,0 mL de solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0. A eliminação de oxigênio dissolvido foi feita pelo borbulhamento de um fluxo de nitrogênio (N_{2(g)}) nas soluções, durante 10 minutos, antes das análises.

Quanto à modificação do eletrodo utilizou-se a metodologia de adsorção consiste na dissolução do agente modificador em um solvente apropriado e na exposição, em geral por imersão, do eletrodo a esta solução (BARREIROS et al ano 2009) e (GHISELLI et al ano 2007)

Inicialmente trabalhamos com eletrodos a base de carbono, pois estes oferecem versatilidade, baixo custo, facilidade de renovação da superfície, por exemplo.

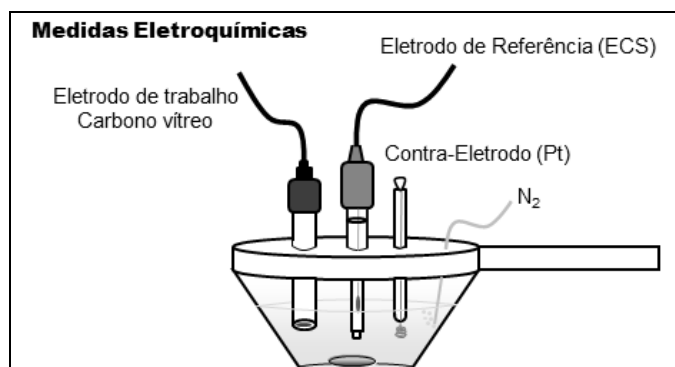


Figura 4 - Esquema ilustrando a célula eletroquímica com capacidade para três eletrodos (ECV = eletrodo de carbono vítreo (forma de disco), eletrodo de referência Ag/AgCl saturado e Pt = eletrodo auxiliar) e um local para entrada de N₂.

Os dispositivos foram preparados a partir da dispersão de nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) apresentando assim, uma superfície nanoestruturada com muitas possibilidades de interações.

O MWNCT utilizado na modificação do eletrodo foi dispersos em solvente aprótico N,N dimetil formamida (DMF), depositando alíquotas de 1µL, logo após de cada alíquota foi colocado na estufa a 80° C.

Posteriormente, as plataformas nanoestruturadas foram modificadas com ácido ferúlico, por meio de interações eletrostática ou ligações químicas com seus respectivos grupos funcionais em solução de tampão fosfato pH 4,5.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, o eletrodo de carbono vítreo (ECV) foi modificado, depositando-se 5 µL de uma dispersão 2 mg mL⁻¹ de nanotubos de carbono (MWCNT), em DMF. Posteriormente, o AF foi eletrodepositado *in situ* sobre ECV/MWCNT, a partir de uma solução 0,8 mmol L⁻¹, através de sucessivas varreduras de potencial com $E_{inicial} = -0,25$ V e $E_{\lambda} = 0,8$ V vs. Ag/AgCl (10 ciclos, $v = 0,02$ V s⁻¹) (Figura 5A). Em seguida, o ECV/MWCNT-poli-AF obtido foi lavado e imerso em uma nova solução tampão. Assim, foi possível observar a formação de um sistema quinônico (Figura 5B) com $E^{0'} = 0,18$ V vs. Ag/AgCl, a partir da oxidação irreversível do grupo funcional hidroxila eletrogerado a partir do AF, isto porque o ácido ferúlico, pode ter seu grupo metoxila quebrado e convertido a carbonila, formando assim, o sistema orto-quinona .

Esse processo de ativação *in situ* do AF apresenta uma série de vantagens e perspectivas, tais como (i) possibilidade de formação de polímero, (ii) formação de sistema quinona, responsável pelas ondas Ia/Ic.

Como pode ser visto na primeira varredura do voltamograma da Figura 5, dois picos anódicos irreversíveis foram formados, um em 0,50 e outro em 0,69 V, na mesma varredura foi gerado uma onda catódica em 0,29 V. Na segunda e subsequentes varreduras, pode-se observar a formação de uma nova onda anódica, a onda reversa da onda catódica Ic, que continuou a ser formada nas varreduras posteriores, constituindo assim um sistema redox bem definido, o qual não desaparece quando o eletrodo é lavado e transferido a uma nova solução tampão livre de AF, o que indica a permanência do novo material formado em superfície.

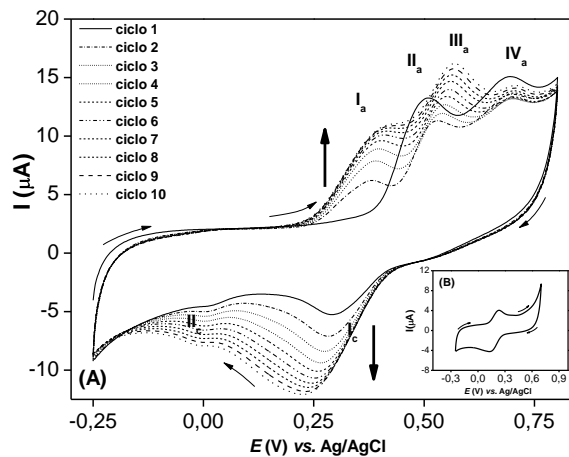


Figura 5 - (A) Voltamograma das 10 ciclagens na faixa de -0,25 a 0,8 V vs. Ag/AgCl para a polimerização e ativação do ECV/MWCNT com ácido ferúlico a $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$, em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5 e $v = 0,020 \text{ V s}^{-1}$ e (B) par redox eletrogerado.

Como pode ser visto na primeira varredura do voltamograma da figura 5, dois picos anódicos irreversíveis foram formados um em 0,50 e outro em 0,69 V, na mesma varredura foi gerado uma onda catódica em 0,29 V. Na segunda e subsequentes varreduras, pode-se observar a formação de uma nova onda anódica, a onda reversa da onda catódica I_c , que continuou a ser formada nas varreduras posteriores, constituindo assim um sistema redox bem definido, o qual não desaparece quando o eletrodo é lavado e transferido a uma nova solução tampão livre de AF, o que indica a permanência do novo material formado em superfície.

Para isto, após o processo de polimerização *in situ*, a faixa de potencial do par redox foi selecionada, e usando a voltametria cíclica, as características cinéticas do ECV/MWCNT/poli-AF foram estudadas.

Os voltamogramas cíclicos representativos obtidos para o ECV/MWCNT/poli-AF são mostrados (dados não apresentados), para várias velocidades de varredura de potencial ($0,005 - 0,10 \text{ V s}^{-1}$). A observação de picos voltamétricos persistentes e bem definidos indica que o processo redox do par (quinona/hidroquinona) exibe características de espécies confinadas na plataforma nanoestruturada à base de nanotubos de carbono, o que pode ser confirmado com a correlação linear entre a corrente de pico e a velocidade de varredura (Figura 6).

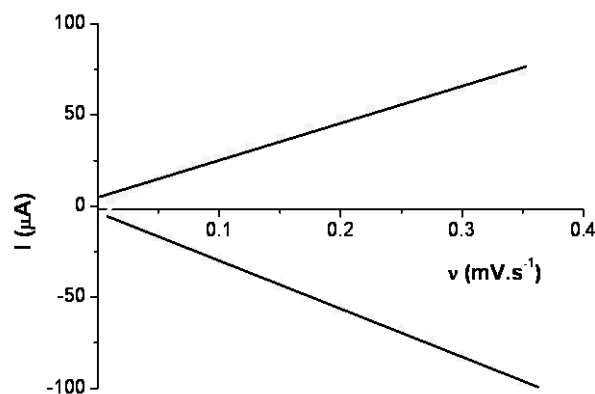


Figura 6 - Dependência da corrente de pico anódico (I_{pa}) e catódico (I_{pc}), em função da velocidade de varredura em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0.

Após o procedimento de ativação *in situ* na superfície do eletrodo modificado o eletrodo modificado foi aplicado com intuito de testar a atividade electrocatalítica do par redox quinona/hidroquinona para oxidação de AA e AU. Inicialmente, as respostas voltamétricas foram obtidas em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ e pH 7 na ausência e presença de AA com $E_{\text{inicial}} = -0,015$ V e $E_{\lambda} = 0,45$ V, Figura 7.

Na ausência de AA, um par redox de picos bem definidos de hidroquinona/quinona pode ser observado (Figura 7). Após adição de AA $9,9 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, houve um aumento drástico da corrente de pico anódica, ao passo que houve uma diminuição da corrente catódica observada na varredura reversa. Este comportamento é consistente com um forte efeito electrocatalítico. Além disso, sob as mesmas condições experimentais, a oxidação direta de AA no eletrodo não modificado foi observada um pico irreversível em potenciais mais positivos. O potencial de pico catalítico é observado em 200 mV *versus* Ag/AgCl, enquanto o pico na ausência de efeito catalítico é de aproximadamente 300 mV. Assim, uma diminuição do sobrepotencial de aproximadamente 100 mV e um aumento da corrente de pico são alcançados com o eletrodo modificado após o processo de ativação.

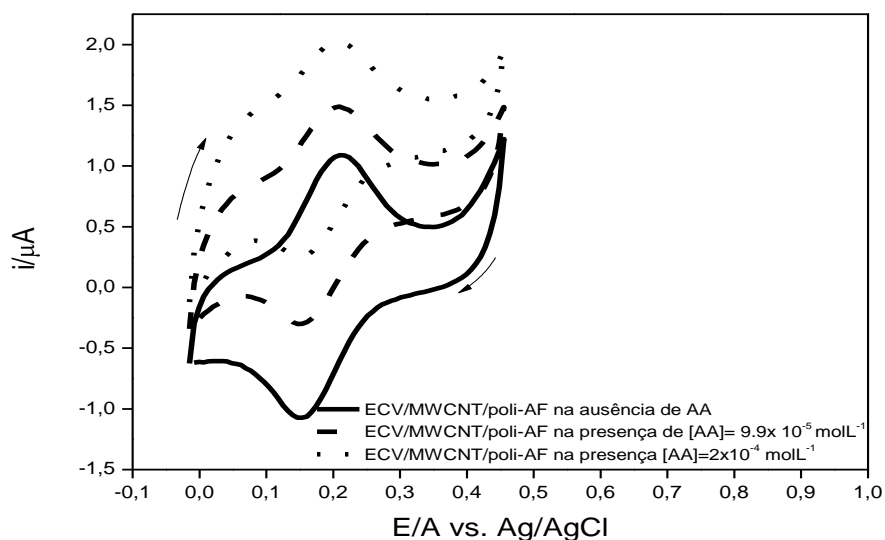


Figura 7. Voltamogramas cíclicos em ECV/MWCNT/poli-AF em solução de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 na ausência e presença de AA. $E_{\text{inicial}} = -0,015$ V e $E_{\lambda} = 0,45$ V, varredura no sentido anódico.

Um dos objetivos principais destes estudos foi o desenvolvimento de um eletrodo modificado hábil para realizar a oxidação electrocatalítica de AA e permitir a separação das respostas electroquímicas de AA e AU. Assim, com intuito de verificar a atividade catalítica do quinona/hidroquinona na presença de AA e AU, alguns ensaios foram realizados.

A Figura 9 mostra os voltamogramas cíclicos para o ECV/MWCNT/poli-AF em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH7, usando uma varredura no sentido anódico, com $E_{\text{inicial}} = -0,015$ V e $E_{\lambda} = 0,45$ V *versus* Ag/AgCl, na ausência e presença de AA e AU. É conhecido que a oxidação electroquímica direta de AU e AA nos eletrodos convencionais requerem altos sobrepotenciais e o potencial de oxidação são também próximos. Por outro lado, na presença do sistema redox, relativo ao par redox quinona/hidroquinona, a resposta voltamétrica sobreposta pode ser resolvida, o qual apresentou dois picos bem definidos em 0,2V e 0,3V *versus* Ag/AgCl, correspondente a oxidação electroquímica de AA e AU, respectivamente. Além disso, para garantir que o sistema redox não responde para o AU, realizou-se, nas mesmas condições, uma medida na ausência de AA e presença

de AU e a partir da Figura 8, observa-se que a sonda não apresenta atividade catalítica frente ao AU, sendo, portanto, uma das justificativas para o sucesso da separação do AA e AU.

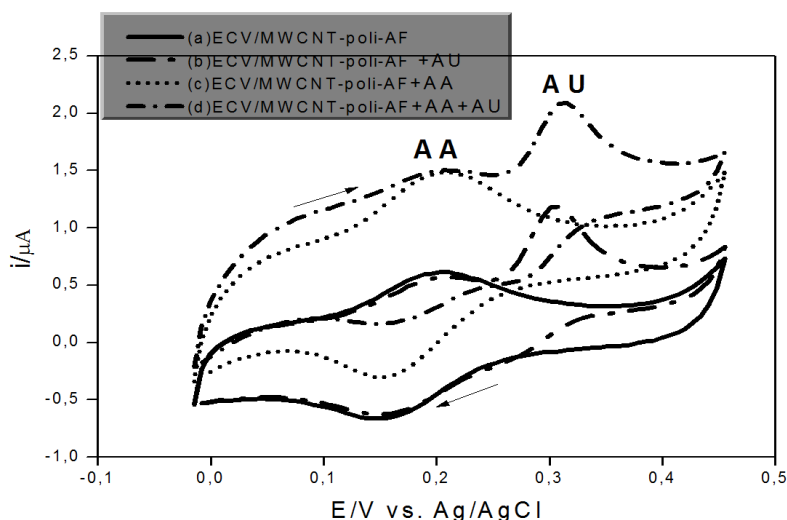


Figura 8. VC da oxidação de AA e AU no eletrodo modificado, separadamente e simultaneamente. Dados obtidos em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0 e velocidade de varredura (v_r) = 5 mV s^{-1} .

6. CONCLUSÕES

A construção do sensor desenvolvido a partir de uma plataforma nanoestruturada de nanotubos de carbono e poli-ácido ferúlico, mostrou-se de forma efetiva como uma alternativa promissora para detecção seletiva de AA na presença de AU em amostras de interesse biológica e alimentícia.

AGRADECIMENTOS

A CAPES, CNPq, FAPEAL IFAL, UFAL, INCT-bio.

REFERÊNCIAS

- Barreiros, A. L. B. S., David, J. M., David, J. P., *Quim. Nova*, v.29, p.113, 2009.
- Cantarow A., Schepartz B., *Biochemistry*. philadelphia: saunders. p. 744 e 778,1957.
- Chen J. C, chung, H. H.; Hsu, C. T; Tsai, D.M.; Kumar, A. S.; Zen, J. M. A
- Ghiselli A., Serafini M., Natella F., Scaccini C. i, *Free Radical Biol. Med*,v.29, p.1106, 2000.
- Gilmartin ,M.A., J.P. Hart, Birch B., *Analyst* , v.117, p.1299.1992
- Harrison, G. A., *Chemical Methods in Clinical Medicine*. London: Churchill,. p. 292. 1947
- Kachoosang,R.T., Banks,C.E., Compton, R.G., *Electroanalysis* . , v.18,p. 741, 2006
- Kachoosang,R.T., Banks,C.E., Compton, R.G., *Electroanalysis* . , v.18,p. 741, 2006
- Lin,X. , Li,Y. , *Electrochim. Acta* .v 51, p.5794. 2006



Reis A.P., Tarley C. R., Martin L. D. M. M, Kubota L.T., *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 24, p. 1569. 2008

Salimi, A., Alizadeh, V., Compton, R. G., *Analytical Sciences.* , p.21, 2005.

Sensor and Actuators B. v. 110, p. 364-369, 2002.

Shahrokhian S., Ghalkhani M., *Electrochim.* v. 51, p. 2599. 2006.

Shahrokhian S., Taghani A., Hamzehloei A., Mousavi S.R., *Electroanalysis* v.16, p.915, 2004.

Yao, H., Sun Y., Lin, X., Y. , Huang, L., *Electrochim.* V. 52, p. 6165, 2007

Zen, J.M. , Hsu, C.T. , *Talanta* v.46, p.1363, 1998