

**FRANCISCO DE ASSIS DOS SANTOS SILVA**

**DESENVOLVIMENTO DE ELETRODOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS PARA  
ELETROANÁLISE DE ANTIOXIDANTES DE IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências com ênfase em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Marília Oliveira Fonseca Goulart

Coorientador: Prof. Dr. Phabyanno Rodrigues Lima

Maceió  
2013

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
**Bibliotecário: Roselito de Oliveira Santos**

S586d Silva, Francisco de Assis dos Santos.  
Desenvolvimento de eletrodos quimicamente modificadas para  
eletroanálise de antioxidantes de importância biológica / Francisco de Assis  
dos Santos Silva. – 2013.  
115 f. : il., graf.

Orientadora: Marília Oliveira Fonseca Goulart.  
Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade  
Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2013.

Inclui Bibliografia.

1. Sensores. 2. Antioxidantes. 3. Eletroanalise. I. Título.

CDU: 577.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E  
BIOTECNOLOGIA

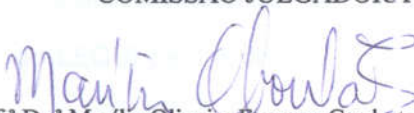



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões  
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins  
57072-970, Maceió-AL, Brasil  
Fone: (82) 3214-1144  
Email: ppgqb.ufal@gmail.com


## FOLHA DE APROVAÇÃO


Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese do Doutorando **FRANCISCO DE ASSIS DOS SANTOS SILVA**, intitulada: **“Desenvolvimento de Eletrodos Quimicamente Modificados para Eletroanálise de Antioxidantes de Importância Biológica”**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 10 de dezembro de 2013, às 09:00 h, na Sala de Reuniões do IQB/UFAL.

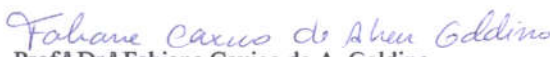
### COMISSÃO JULGADORA

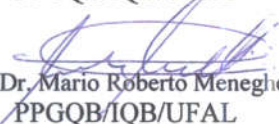
  
Prof.ª Dr.ª Marília Oliveira Fonseca Goulart - Orientadora  
Orientadora - PPGQB/IQB/UFAL


  
Prof. Dr. Phabyanno Rodrigues Lima -  
Coorientador – IFAL

  
Prof.ª Dr.ª Rosa Amalia Fireman Dutra  
UFPE

  
Prof.ª Dr.ª Wilney de Jesus Rodrigues Santos  
IFAL

  
Prof.ª Dr.ª Fabiane Caxico de A. Galdino  
PPGQB/IQB/UFAL

  
Prof. Dr. Mario Roberto Meneghetti  
PPGQB/IQB/UFAL

  
Prof.ª Dr.ª Fabícia da Rocha Ferreira  
CAPES/PNPD

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Geraldo e Josefa pelo apoio e presença em todos os momentos difíceis e por sempre buscarem o melhor para todos os seus filhos.

Aos meus irmãos Cícero, Marisa, Elisabeth e Elisângela por me ajudar em todos os momentos difíceis.

A Profa. Marília Goulart pela confiança, paciência, dedicação e ensinamentos.

Ao Prof. Lauro Kubota pela receptividade, apoio e discussões.

Ao Prof. Phabyanno Lima pela co-orientação, paciência e amizade.

A CAPES e ao INCT-Bioanalítica pelo apoio financeiro.

Aos Amigos Charles, Cleylton e Wilson que me ajudaram nessa longa caminhada.

A todos os amigos do LEQUI pelo excelente convívio e companheirismo no dia-a-dia.

Aos professores do Instituto de Química e Biotecnologia pela paciência, ensinamentos, compreensão e contribuição acadêmica e em especial aos professores da pós-graduação os quais tive a oportunidade de conhecer melhor: Fabiane Caxico, Dennis Imbrosi, Mario Meneghetti, Simoni Meneghetti e Lúcia Conserva.

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

*“A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente, antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos.”*

Charles Chaplin

## RESUMO

A presente tese descreve a construção de três eletrodos quimicamente modificados (EQM), na presença de nanotubos de carbono de paredes múltiplas, obtidos por diferentes metodologias de modificação: eletropolimerização a partir de fenóis, com complexos metálicos e com nanopartículas de ouro. Estes eletrodos foram caracterizados por diversas técnicas eletroquímicas (voltametria cíclica, cronoamperometria, eletrodo de disco rotatório e espectroscopia de impedância). As técnicas de espectroscopia no UV-Vis, no infravermelho, de Raman, espectrometria de massas e microscopia de transmissão eletrônica foram aplicadas para caracterização das plataformas produzidas. Os EQM desenvolvidos foram aplicados como sensores para eletroanálise de antioxidantes de importância biológica, sendo possível determinar com sucesso o ácido ascórbico ( $LD = 0,19 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) em presença de ácido úrico, cisteína ( $LD = 8,25 \text{ nmol.L}^{-1}$ ) e homocisteína ( $LD = 0,26 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ), os quais apresentaram excelentes limites de quantificação e detecção, faixa linear e sensibilidade.

Palavras-chave: Sensores, antioxidantes, eletroanalise.

## ABSTRACT

This thesis describes the construction of three chemically modified electrodes (CME), in the presence of multi-walled carbon nanotubes, by different methods of modification: phenol electropolymerization, metal complexes and with gold nanoparticles. These platforms were characterized by various electrochemical techniques (cyclic voltammetry, chronoamperometry, rotating disk electrode and impedance spectroscopy). The techniques of UV-Vis spectroscopy, infrared, Raman, mass spectrometry and transmission electron microscopy were employed to characterize the produced systems. The CMEs were applied as sensors for the electroanalysis of biologically important antioxidants. It was possible to successfully determine ascorbic acid (DL = 0,19  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) in the presence of uric acid, cysteine (DL = 8,25  $\text{nmol.L}^{-1}$ ) and homocysteine (DL = 0,26  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) which showed excellent limits of detection and quantification, sensitivity and linear range.

Keywords: Sensors, antioxidants, electroanalysis.

## **LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

<b>Figura 1</b> - Número de artigos publicados nos últimos anos sobre sensores eletroquímicos.....	16
<b>Figura 2</b> - Número de artigos publicados nos últimos anos sobre sensores eletroquímicos para Antioxidantes .....	17
<b>Figura 3</b> - Representação esquemática das várias rotas para preparação de EQM.	20
<b>Figura 4</b> - Representação esquemática para a reação de oxidação Red → Oxi em eletrodo convencional (A) e em condições mediadas (B) e (C). .....	24
<b>Figura 5</b> - Ciclo oxidativo do ascorbato .....	31
<b>Figura 6</b> - Ataque das ERO e ERN à membrana celular. ....	32
<b>Figura 7</b> - Mecanismo de proteção da membrana celular pelo tocoferol e pelo ascorbato. ....	33
<b>Figura 8</b> - Reações envolvendo a atividade antioxidante do ácido úrico. ....	35
<b>Figura 9</b> - Síntese da Glutathiona.....	37
<b>Figura 10</b> - Reação de oxidação da Glutathiona e sua regeneração.....	38
<b>Figura 11</b> - Síntese da Cisteína e dissulfeto produto de sua oxidação.....	39
<b>Figura 12</b> - Mecanismo da ação da Homocisteína no estresse oxidativo.....	41



## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1-** Doenças selecionadas relacionadas ao estresse oxidativo. ....27

**Tabela 2-** Grupo de biomarcadores no sangue e principais métodos de análise .....29

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

<b>AA</b>	Ácido ascórbico
<b>AU</b>	Ácido úrico
<b>CPE</b>	“ <i>Constant phase element</i> ” - Elemento de fase constante
<b>CTAB</b>	“ <i>Cetyltrimethylammonium bromide</i> ” - Brometo de cetiltrimetilamônio
<b>Cys</b>	Cisteína
<b>D</b>	Coeficiente de difusão
<b>DMF</b>	Dimetilformamida
<b>E<sup>0</sup></b>	Potencial formal
<b>EQM</b>	Eletrodo químicamente modificado
<b>ER</b>	Espécie reativa
<b>ERN</b>	Espécies reativas de nitrogênio
<b>ERO</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>ERON</b>	Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio
<b>F</b>	Constante de Faraday
<b>FRAP</b>	“ <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> ” Poder antioxidante redutor do ferro
<b>GSH</b>	Glutationa
<b>hCys</b>	Homocisteína
<b>HPLC</b>	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> Cromatografia líquida de alta eficiência

<b>LD</b>	Limite de detecção
<b>LQ</b>	Limite de Quantificação
<b>M</b>	Mediador
<b>M<sub>O</sub></b>	Mediador oxidado
<b>M<sub>R</sub></b>	Mediador reduzido
<b>MWCNT</b>	<i>“Multi-walled carbon nanotubes”</i> - Nanotubos de carbono de paredes múltiplas
<b>n</b>	Número de elétrons
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina de nucleotídeo
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina fosfato de nucleotídeo
<b>ORAC</b>	<i>“Oxygen Radical Absorbance Capacity”</i> - Capacidade de absorvância do radical oxigênio
<b>Oxi</b>	Espécie oxidada
<b>PBS</b>	<i>“Phosphate buffer solution”</i> - Tampão fosfato
<b>R<sub>ct</sub></b>	<i>“Charge-transfer resistance”</i> - Resistência à transferência de carga
<b>Red</b>	Espécie reduzida
<b>R<sub>s</sub></b>	<i>Electrolyte resistance</i> Resistência do eletrólito
<b>SAM</b>	<i>“Self assembly monolayer”</i> - Monocamadas automontadas
<b>TEAC</b>	<i>“Trolox equivalent antioxidant capacity”</i> - Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox
<b>TEM</b>	<i>“Transmission Electron Microscopy”</i> - Microscopia eletrônica de transmissão

<b>TRAP</b>	<i>“Total Reactive Antioxidant Potential”</i> - Potencial antioxidante reativo total
<b>Zw</b>	<i>“Warburg impedance”</i> - Impedância de Warburg
$\eta$	Sobrepotencial
$\nu$	Velocidade de varredura
<b>Xa</b>	<i>“Xanthurenic Acid”</i> - Ácido Xanturênico
$\omega$	Velocidade de rotação

## SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO.....	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 Considerações Gerais .....	16
2.2 Eletrodos quimicamente modificados .....	19
2.3 Modificação dos eletrodos .....	20
2.3.1 Fisissorção/Quimissorção.....	21
2.3.2 Ligação covalente .....	21
2.3.3 Filmes poliméricos .....	22
2.3.4 Compósitos.....	23
2.4 Eletrocatalise .....	23
2.5 Estresse Oxidativo .....	24
2.6 Sensores e biossensores na quantificação de biomarcadores do desbalanço redox.....	27
2.7 Antioxidantes.....	29
2.7.1 Ácido Ascórbico .....	30
2.7.2 Ácido Úrico .....	34
2.7.3 Glutathione .....	36
2.7.4 Cisteína.....	38
2.7.5 Homocisteína.....	40
2.8 Referências.....	42
3 OBJETIVOS .....	47
3.1 Objetivo Geral.....	47
3.2 Objetivos Específicos.....	47
4 POLY-XANTHURENIC ACID MODIFIED ELECTRODES: AN AMPEROMETRIC SENSOR FOR THE SIMULTANEOUS DETERMINATION OF ASCORBIC AND URIC .....	48
Abstract.....	49
1 Introduction .....	50
2 Experimental .....	51
2.1 Chemicals and solutions.....	51
2.2 Construction of the sensors and electrochemical measurements .....	52

2.3 Real samples analyses .....	52
3 Results and discussion.....	53
3.1 Electrocatalytic oxidation of AA and UA. ....	53
3.2 Chronoamperometric studies .....	56
3.3 Rotating disc electrode studies.....	58
3.4 Amperometric detection of AA and UA.....	60
3.5 Samples analysis and recovery tests .....	63
4 Conclusions.....	65
5 Acknowledgements .....	66
6 References .....	66
<b>5 A VERY LOW POTENTIAL ELECTROCHEMICAL DETECTION OF L-CYSTEINE BASED ON A GLASSY CARBON ELECTRODE MODIFIED WITH MULTI-WALLED CARBON NANOTUBES/GOLD NANORODS .....</b>	<b>69</b>
Abstract.....	70
1 Introduction .....	71
2 Experimental .....	72
2.1 Chemicals and solutions.....	72
2.2 Gold Nanorods Syntheses.....	72
2.3 Construction of the sensors.....	73
2.4 TEM, UV-Vis/near-IR, Raman and Electrochemical Characterization .....	73
2.5 Real sample analysis .....	74
3. Results and discussion.....	75
3.1 Sensor characterization.....	75
3.2 Active surface area and gold amount determination. ....	77
3.3 Electrocatalytic activity of the nanohybrid sensor .....	78
3.4. Chronoamperometric studies .....	80
3.5. Amperometric detection of Cys .....	83
3.6 Interferents study.....	84
3.7 Real sample analysis .....	86
4 Conclusions.....	86
5 Acknowledgements .....	87
6 References .....	87

6 A NOVEL AMPEROMETRIC SENSOR FOR DETERMINATION OF HOMOCYSTEINE ON IRON(II) – XANTHURENIC ACID COMPLEX/MWCNT MODIFIED ELECTRODES.....	90
Abstract.....	91
1 Introduction.....	92
2 Experimental.....	93
2.1 Chemicals and solutions.....	93
2.3 Construction of the sensors and electrochemical measurements.....	94
3 Results and discussion.....	95
3.1 Iron (II) – xanthurenic acid complex synthesis and characterization.....	95
3.2 IES- Electrochemical Impedance Spectroscopy study.....	97
3.3 Electrocatalytic oxidation hCys.....	98
3.4 Chronoamperometric studies for hCys oxidation.....	100
3.5 Amperometric determination of hCys.....	102
3.6 Stability of modified electrode.....	103
4 Conclusions.....	104
5 Acknowledgements.....	104
6 References.....	104
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	107
ANEXOS.....	108

## 1 APRESENTAÇÃO

O processo de oxidação é parte fundamental da vida aeróbia e do nosso metabolismo e, assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. Esses radicais livres, cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio, são denominados ERO (Espécies Reativas de Oxigênio) ou ERN (Espécies Reativas de Nitrogênio). No organismo, encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, aos carboidratos e ao DNA.

O excesso de radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta. Os níveis destes antioxidantes em matrizes biológicas, tais como sangue e urina, podem ser utilizados como biomarcadores para o desequilíbrio redox, em favor dos oxidantes, processo denominado estresse oxidativo, daí, a necessidade de sua quantificação, seletiva.

Vários métodos eletroanalíticos para a determinação de diversos antioxidantes utilizando Eletrodos Quimicamente Modificados têm possibilitado a realização de análises com maior seletividade, rapidez, sensibilidade, baixo custo e simplicidade com imobilização de espécies eletroativas na superfície do eletrodo. Neste contexto, a presente tese descreve o processo de construção de três eletrodos quimicamente modificados como dispositivos simples, sensíveis e seletivos para detectar e quantificar antioxidantes de forte relevância, como ácido ascórbico, ácido úrico, cisteína e homocisteína.

A tese é apresentada na forma de três artigos científicos. Esta estruturação já é utilizada em alguns programas de pós-graduação (PG), é prática, objetiva e propicia uma divulgação mais rápida dos resultados obtidos. A escolha da língua inglesa, neste contexto, é uma tendência, em vista da necessidade de internacionalização dos programas de PG.



O trabalho é iniciado com uma revisão das metodologias para preparação de eletrodos quimicamente modificados, do estresse oxidativo (EO) e dos principais biomarcadores de algumas patologias selecionadas, com base bioquímica ligada ao EO. Além disso, são apresentados os principais antioxidantes presentes em meio biológico e como eles atuam no estresse oxidativo.

Na sequência, temos o primeiro artigo (*Poly-xanthurenic acid modified electrodes: an amperometric sensor for the simultaneous determination of ascorbic and uric acids*) que foi publicado na revista *Sensors and Actuators B: Chemical* e relata um sensor amperométrico para a determinação simultânea de ácidos ascórbico e úrico, utilizando um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono e um filme polimérico de ácido xanturênico, o qual foi depositado eletroquimicamente.

Em seguida, o segundo artigo (*A very low potential electrochemical detection of L-cysteine based on a glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes/gold nanorods*) o qual foi publicado no periódico *Biosensors and Bioelectronics*, e descreve a utilização de nanobastões de ouro modificando nanotubos de carbono de forma não covalente e sua aplicação para a determinação de cisteína, com alta seletividade e sensibilidade em amostras de urina humana.

No último artigo (*A new amperometric sensor for determination of homocysteine on iron(II) – xanthurenic acid complex/MWCNT modified electrodes*), foi desenvolvido um sensor para homocisteína, utilizando um complexo metálico sintetizado a partir do ácido xanturênico e de íons ferro (II). Este artigo encontra-se em redação para posterior submissão.

Por fim, faz-se uma análise dos três artigos nas considerações finais, destacando-se a importância dos trabalhos realizados e as perspectivas para trabalhos futuros.

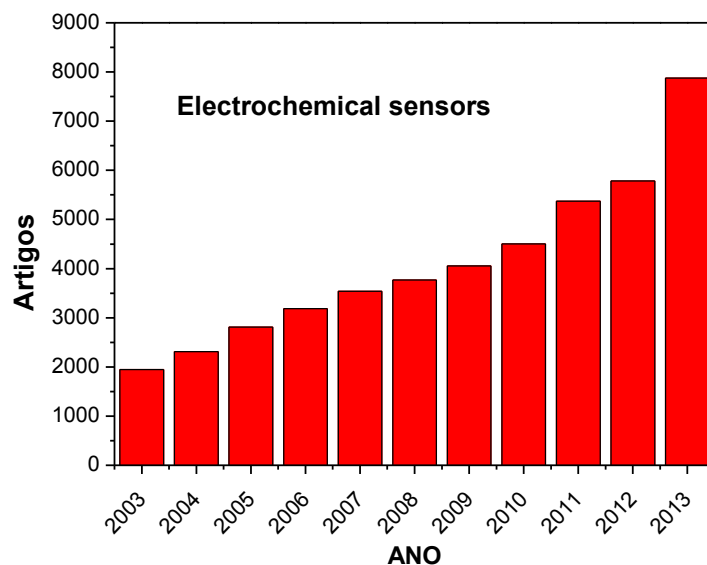
Os artigos estão compilados dentro da formatação exigida por cada um dos periódicos científicos, os quais foram publicados ou em preparação.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Considerações Gerais

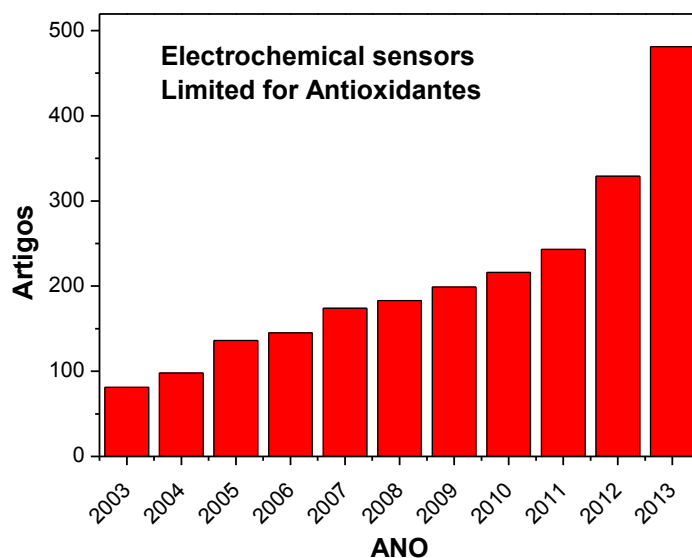
Um grande número de artigos tem sido publicado ao longo dos anos de modo a fabricar e utilizar sensores eletroquímicos com qualidades atrativas, incluindo uma resposta rápida, baixo custo, miniaturização, aumento da sensibilidade e da seletividade e com limites de detecção apropriados, a depender da amostra. Cerca de 8000 artigos sobre sensores eletroquímicos foram publicados em 2013, segundo na base de dados ScienceDirect (Electrochemical sensors) mostrando a relevância e a atualidade da pesquisa em curso nesta área (Figura 1) e particularmente na determinação de antioxidantes como pode ser observado na Figura 2.

**Figura 1** - Número de artigos publicados nos últimos anos sobre sensores eletroquímicos.



Fonte: SILVA, 2013.

**Figura 2** - Número de artigos publicados nos últimos anos sobre sensores eletroquímicos para Antioxidantes



Fonte: SILVA, 2013.

No mais diversificado campo de química (e bioquímica), a detecção em sensores é regulada tanto pelo aspecto do ambiente da medida e da matriz na qual ela esta inserida, bem como o tipo de transferência de energia que eles utilizam: óptico (Anker et al., 2008), térmico (Yi e La Van, 2012) e baseado em massa (Waggoner e Craighead, 2007). Os sensores eletroquímicos também são bem conceituados na área analítica. A eletroquímica é atraente, uma vez que converte diretamente informações químicas em um sinal elétrico com notável simplicidade experimental e com baixos custos. Não há necessidade de uma instrumentação sofisticada. Uma característica muito atraente da eletroquímica é que ele depende de um fenômeno de superfície, e não de um caminho óptico, e, portanto, volumes de amostra podem ser muito pequenos, tornando mais fácil a miniaturização.

O interesse em sensores eletroquímicos continua em crescimento, estimulado pela ampla gama de aplicações. O seu impacto é mais claramente ilustrado no uso generalizado de sensores eletroquímicos, na vida diária, onde continuam a atender à crescente necessidade de métodos rápidos, simples e econômicos de determinação

de inúmeros analitos (Holford et al., 2012; Palchetti e Mascini, 2012 ; Perfezou et al., 2012).

Ocorre constante aperfeiçoamento das tecnologias de detecção existentes, juntamente com o desenvolvimento de materiais e sensores funcionais inovadores, incluindo nano e materiais biológicos (Lei e Ju, 2012; Liu et al., 2012; Sun, et al., 2012 ; Silvester, 2011), a análise de dados é constantemente melhorada (Ni e Kokot, 2008), assim como os métodos de miniaturização (Adibi et al., 2011; Lin e Yan, 2012 ; Scampicchio et al., 2012).

Três ramos de sensores eletroquímicos estão em desenvolvimento: sensores com maior especificidade, sensores capazes de determinação simultânea / multiplex além daqueles *point-of-care*, para uso em saúde. Atualmente, um dos grandes desafios enfrentados pelos programas de saúde no Brasil consiste na manutenção e disponibilidade de exames laboratoriais que são necessários não somente no atendimento ambulatorial ou hospitalar, mas também para um adequado levantamento epidemiológico. Em muitos casos, a ausência de exames nos sistemas públicos gera ciclos econômicos negativos que repercutem no retardo do diagnóstico, implicando em internamentos hospitalares desnecessários, complicações na terapêutica e conseqüente redução da qualidade de vida global dos pacientes, além de subnotificações de vigilância/controle. Neste sentido, o desafio por alcançar métodos analíticos alternativos de menor custo que aliem a possibilidade de fornecer resultados de modo mais seguro, prático e no local do atendimento, em consonância com os novos sistemas descentralizados de saúde pública, é uma tarefa imperativa. Os testes rápidos são considerados na atualidade, uma das possibilidades analíticas mais atrativas, pois podem atender às demandas citadas. A indústria diagnóstica e, em número cada vez maior, os usuários de testes rápidos nos Estados Unidos e na Europa são unânimes em afirmar que o *point-of-care testing* (POCT) é uma tecnologia prática, hoje, considerada uma tendência a curto, médio e longo prazo.

Nestas áreas, a capacidade de operar em matrizes biológicas complexas permanecerá crítico, forçando os investigadores a resolver os problemas da biocompatibilidade e estabilidade (Kimmel et al., 2012). Como tal, as propriedades analíticas e físicas que devem ser consideradas para se desenvolver (e comercializar) sensores químicos e biológicos incluem:

- ✓ Custo

- ✓ Portabilidade
- ✓ Sensibilidade
- ✓ Reprodutibilidade
- ✓ Seletividade / Especificidade
- ✓ Detecção multi-analito
- ✓ Estabilidade
- ✓ Operação mais simples, sem alto grau de especialização

Somente alguns sensores, se algum, apresentam características ideais para todas as propriedades. Por exemplo, para aplicação *in vivo*, devido ao ambiente complexo destas medições, a seletividade torna-se crítica assim como o tempo de resposta necessário (Chen et al., 2012). Ao desenvolver sensores eletroquímicos, algumas propriedades podem ser priorizadas em detrimento de outras, dependendo da aplicação final. Um sensor eletrocatalítico de peróxido hidrogênio com um milimolar (1 mM) de limite de detecção pode ter, por exemplo, aplicação em águas residuais ou em aplicações industriais. No entanto, de modo a ser viável para aplicação em diagnósticos clínicos, a sensibilidade deveria ser várias ordens de grandeza inferior (Chen et al., 2012).

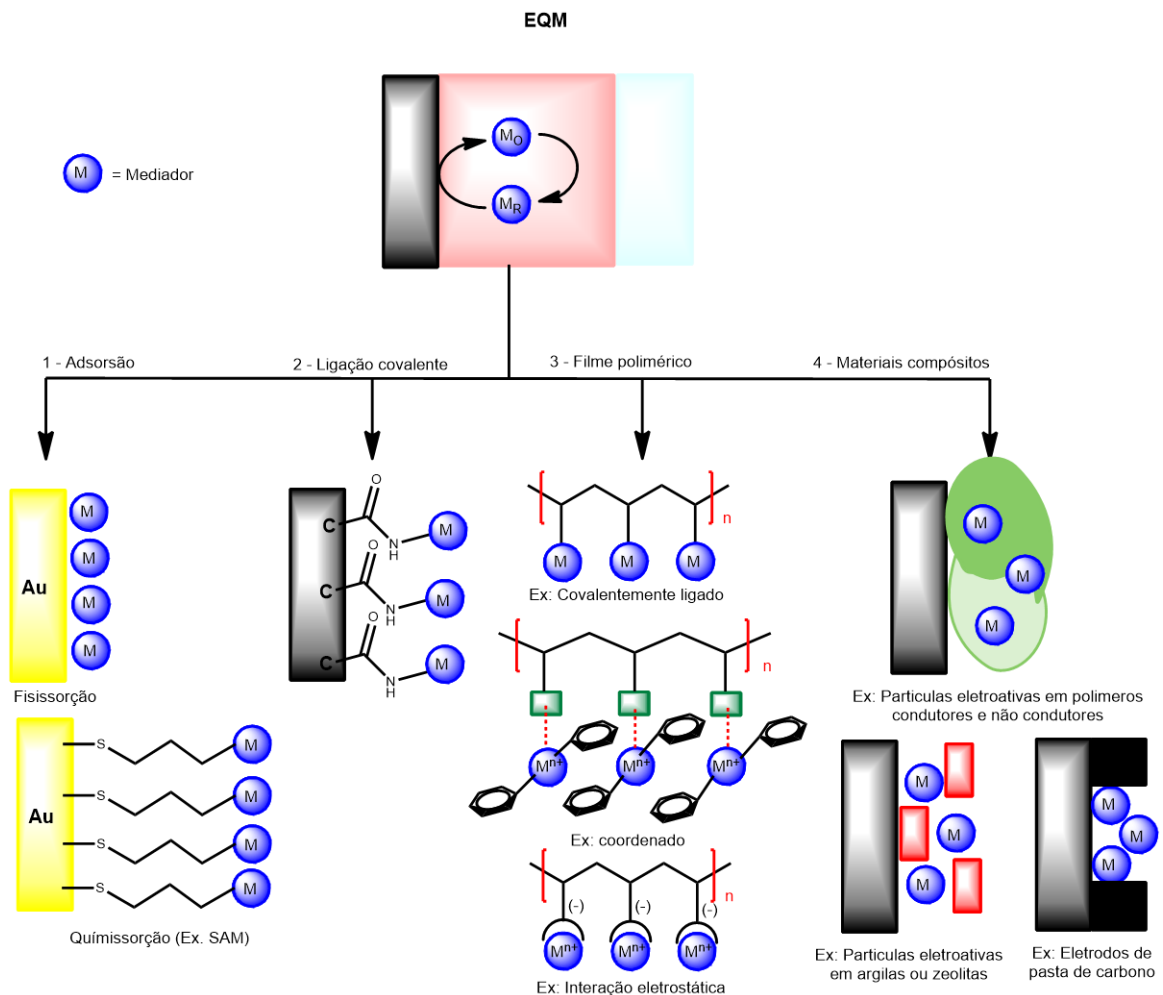
## 2.2 Eletrodos quimicamente modificados

Um eletrodo quimicamente modificado (EQM) é aquele constituído de um material condutor ou semicondutor, o qual foi deliberadamente tratado com alguma substância com propriedades determinadas, de modo que este eletrodo apresente propriedades desejáveis em comparação com aqueles não modificados. Assim é possível construir eletrodos para diversos propósitos e aplicações, tais como: conversão e armazenamento de energia solar, síntese eletro-orgânica seletiva, “*displays*”, dispositivos, proteção à corrosão e eletroanálise. Com o propósito de aplicação em eletroanálise, a manipulação da composição molecular do eletrodo ajuda a aumentar a sensibilidade, seletividade e/ou estabilidade dos eletrodos, possibilitando respostas de acordo com as necessidades analíticas. A possibilidade de manipular a arquitetura molecular da matriz de um eletrodo e em particular de sua superfície tem gerado uma ampla gama de aplicações analíticas dos EQMs e criado uma nova visão para a eletroanálise (Radi, 2010).

## 2.3 Modificação dos eletrodos

Uma ampla variedade de métodos encontra-se em uso para modificar eletrodos quimicamente. A imobilização ou a incorporação da substância ou assembléia de substâncias modificadoras no sistema do eletrodo deve manter suas propriedades (eletro) químicas e físicas no estado imobilizado. Assim sendo, a seleção de substâncias pode ser feita visando a função do eletrodo. A este respeito, as rotas de imobilização de substâncias eletroquimicamente reativas são de grande importância. Os métodos de modificação são geralmente agrupados em quatro categorias principais: fisissorção/quimissorção, ligação covalente, filmes poliméricos e modificação compósita. (Figura 3)

**Figura 3** - Representação esquemática das várias rotas para preparação de EQM.



Fonte: SILVA, 2012. (Adaptado de Zen et al., 2003)

### 2.3.1 Fisissorção/Quimissorção

O procedimento de modificação mais simples é a adsorção física ou química. Sua vantagem consiste no fato de não precisar de reagentes especiais para acoplar o agente modificador; este procedimento é suficiente para modificar adequadamente a superfície do eletrodo. Entretanto, o tempo de vida do eletrodo é relativamente pequeno e a substância lixivia gradativamente para a solução. Vários procedimentos que aumentam o tempo de retenção do agente modificante no eletrodo têm sido descritos (Stoecker e Yacynych, 1990). Uma grande quantidade de compostos orgânicos aromáticos pode se adsorver em grafite; a extensão da adsorção aumenta com o número de anéis aromáticos (Brown et al., 1976; Brown e Anson, 1977). A adsorção é devida à forte interação entre o plano basal do grafite e o sistema de elétrons  $\pi$  das moléculas. Isto é baseado no princípio da similaridade estrutural entre os anéis benzênicos e os hexágonos na superfície do carbono. Além disso, a adsorção é promovida por uma baixa solubilidade destes compostos em soluções aquosas.

### 2.3.2 Ligação covalente

O procedimento de modificação requer uma reação química entre o substrato e o eletrodo. Assim, sua superfície deve, primeiro, sofrer um pré-tratamento. O modificador pode também ser ligado covalentemente ao eletrodo empregando-se, por exemplo, reações de silanização envolvendo organossilanos e óxidos presentes na superfície do eletrodo. A maioria dos eletrodos metálicos, quando oxidados em meio ácido, é recoberta com uma camada fina de óxidos bastante reativa em relação aos silanos. Portanto, um metal após ser oxidado pode ser silanizado e posteriormente reagir com outra molécula, contendo o grupo funcional que se queira imobilizar. O silano atuará como um tipo de ponte para fixar um grupo funcional específico na superfície do eletrodo. Superfícies de carbono apresentam grupos funcionais óxidos tais como: fenóis, ácidos carboxílicos, cetonas (quinonas) e anidridos resultantes da oxigenação de átomos de carbono do plano vertical. Estas funções, cuja concentração pode ser aumentada através de reações de oxidação, são capazes de formar ligações covalentes como, por exemplo, ligações amidas (Evans et al., 1977; Stutts e Wightman, 1983). Portanto, a modificação de superfícies de carbono via ligação covalente com o modificador, tem sido em grande parte,

baseada na manipulação da reatividade destes grupos funcionais, frente a reagentes como aminas, organossilanos, cloreto de tionila, e cloreto cianúrico, entre outros. Entretanto, também tem sido explorada a possibilidade de modificar covalentemente superfícies de carbono livres de óxidos. Nestes casos as reações envolvem os próprios átomos de carbono do plano vertical. Tratamentos como abrasão mecânica ou fratura sob atmosfera inerte, “decapagem” por plasma de argônio ou termólise sob vácuo, são capazes de gerar superfícies livres de óxidos, com grande reatividade frente a uma ampla variedade de reagentes. Os eletrodos modificados via ligação covalente são mais estáveis em relação aos obtidos pelos demais métodos, entretanto são mais difíceis de preparar. Da mesma forma que a modificação por adsorção, esta metodologia também gera coberturas com no máximo uma camada imobilizada (Janata e Huber, 1985).

### 2.3.3 Filmes poliméricos

Outra técnica bastante atrativa para a preparação de eletrodos modificados é o recobrimento da superfície do eletrodo com filmes poliméricos, que devem ser condutores ou permeáveis ao eletrólito de suporte e à espécie de interesse. Ao contrário da modificação por adsorção ou por formação de ligação covalente, a modificação com filmes poliméricos permite a imobilização de muitas camadas (1 a 20.000) da espécie ativa na superfície modificada, o que resulta na ampliação da resposta eletroquímica. Dependendo da aplicação, pode ser escolhido um polímero eletroativo (se o objetivo é uma eletrocatalise), quimicamente ativo (propriedades ligantes ou de troca iônica para pré-concentração) ou inerte (apenas para exclusão de interferentes).

Os filmes eletroativos se subdividem em duas categorias principais, dependendo de como o centro redox é imobilizado: polímeros redox, se o centro redox é parte do esqueleto polimérico; e polímeros de troca iônica se o componente redox ativo é um contra-íon de um filme poli-iônico como polivinilpiridina ou Nafion<sup>®</sup>. A cobertura polimérica pode ser obtida a partir de soluções de polímeros pré-formados, ou através de polimerização *in situ*, a partir de unidades monoméricas. Neste último caso, o recobrimento polimérico pode ser obtido via eletropolimerização



ou por meio de métodos não eletroquímicos como, por exemplo, polimerização ativada por plasma, foto-induzida por UV ou polimerização de organossilanos.

### 2.3.4 Compósitos

Um compósito é uma mistura de componentes, portanto outra forma de preparar um EQM é simplesmente misturar o agente modificador com o substrato do eletrodo. Esta técnica é adequada para modificar eletrodos à base de carbono em pó (grafite, nanotubos de carbono, etc.), tais como: eletrodos de pasta de carbono, de grafite-epóxi e pastilhas. Quando possível é preferencialmente utilizada uma variante do método descrito anteriormente, que consiste em misturar o carbono em pó a uma solução adequada do agente modificador.

Após a evaporação do solvente, as partículas de carbono ficam recobertas pelo modificador, isto resulta numa distribuição mais homogênea deste último. Em ambos os casos também pode ocorrer perda gradual do modificador para a solução de medida, prejudicando a reprodutibilidade.

## 2.4 Eletrocatalise

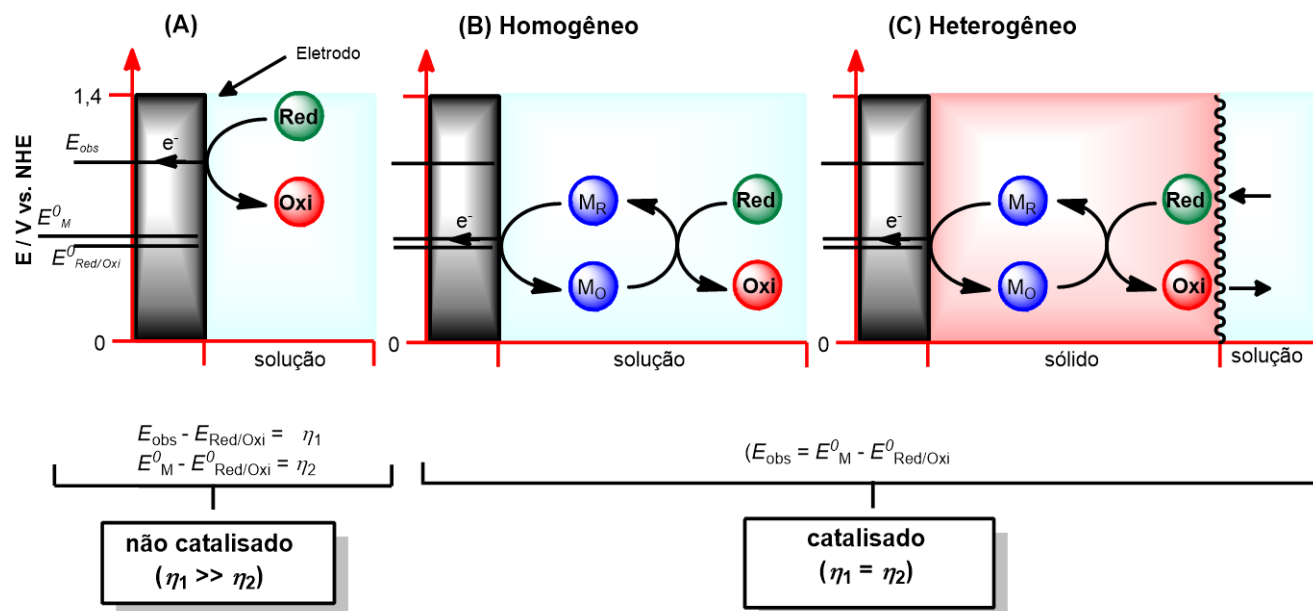
EQMs são usados para acelerar a transferência heterogênea de elétrons de/para o analito alvo, a qual é lenta em eletrodos convencionais. A aceleração da cinética de reação por eletrocatalisadores confinados no eletrodo permite a quantificação do analito em potenciais mais favoráveis, quando comparado com aqueles obtidos em eletrodos não modificados. A diminuição (oxidação)/aumento (potenciais menos negativos) do potencial aplicado pode substancialmente aumentar a performance analítica. Em particular, a diminuição do potencial de detecção pode resultar em melhores limites de detecção e seletividade, por causa de menor nível de ruídos e faixa restrita de componentes eletrolisáveis da amostra. Mais importante, entretanto, são os casos em que há mudanças no potencial, possibilitadas por efeitos eletrocatalíticos em que o processo do eletrodo normalmente ocorreria próximo ou no mesmo potencial de outras espécies ou da corrente de fundo do solvente sendo deslocado para uma região útil de potencial (Lubert e Kalcher, 2010). Nestes casos, as vantagens podem ser estendidas por EQM eletrocatalíticos para novos grupos de compostos que não dão uma resposta analítica útil nos eletrodos

convencionais. Existe uma ampla variedade de pares redox de atividade eletrocatalítica apreciável frente a um grande gama de analitos. A velocidade de eletrocatalise depende primariamente da diferença do potencial redox formal do catalisador e do analito, assim a seletividade pode ser incorporada, por seleção do catalisador apropriado (Radi, 2010).

A propriedade eletrocatalítica é uma das características desejadas para que um EQM possa ser aplicado em química eletroanalítica.

A figura 4 ilustra um exemplo típico de um processo eletrocatalítico em um EQM com diminuição do sobrepotencial ( $\eta$ ). Um mediador redox reversível ( $M_R/M_O$ ) com potencial formal  $E_M^0$  foi funcionalizado no eletrodo para promover a reação de oxidação irreversível  $Red \rightarrow Oxi$ . Um  $\eta$  relativamente alto foi observado em eletrodo não modificado, enquanto na presença de  $M_R/M_O$  a reação ocorreu por mediação redox no  $E_M^0$  com um baixo  $\eta$ . Este tipo EQM não é apenas seletivo e sensível, mas também rápido e robusto nas medidas analíticas (Zen et al., 2003).

**Figura 4** - Representação esquemática para a reação de oxidação  $Red \rightarrow Oxi$  em eletrodo convencional (A) e em condições mediadas (B) e (C).



Fonte: SILVA, 2013 (Adaptado de Zen et al., 2003)

## 2.5 Estresse Oxidativo

Os seres vivos se adaptaram, no transcorrer dos últimos dois bilhões de anos, a uma crescente concentração de oxigênio atmosférico, aproveitando-se dos benefícios da ativação pelo oxigênio e construindo, ao mesmo tempo, uma complexa rede de controle, para equilibrar suas ações deletérias. A molécula diatômica de oxigênio possui dois elétrons desemparelhados, em sua última camada eletrônica e pode, portanto, sofrer redução, gerando diferentes metabólitos, conhecidos pelo nome coletivo de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), que podem reagir com outras espécies, gerando novos radicais ou moléculas (Bergamini et al., 2004, Vasconcelos et al., 2007).

As espécies reativas de maior importância nos sistemas biológicos são: as Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), as Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN), os radicais derivados dos tióis ou radicais enxofre ( $RS^{\bullet}$ ), as Espécies Reativas de Cloro (ERCl), as Espécies Reativas de Carbono (ERC) e os íons de metais de transição Fe, Cu, Mn e Zn. Espécies reativas incluem, em cada grupo, não só os radicais ( $O_2^{\bullet-}$ ,  $^{\bullet}OH$ ,  $NO^{\bullet}$ ), mas também intermediários neutros ou carregados ( $H_2O_2$ ,  $ONOO^-$ ) e outras espécies capazes de formar radicais livres no organismo humano ( $^1O^*_2$ ,  $O_3$ , Fe, Cu), oriundas do próprio organismo ou do ambiente externo (Halliwell e Gutteridge, 2007).

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), de nitrogênio (ERN), entre outras espécies reativas (ER) é parte integrante do metabolismo humano e é observada em diversas condições fisiológicas. ERO e ERN têm importante função biológica. Por outro lado, quando sua produção é danosa, o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio. O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante, com predomínio dos oxidantes, com dano conseqüente aos vários constituintes celulares.

Em sistemas biológicos, um dos focos para atuação de ERO e ERN é a membrana celular, cuja função é vital à célula. Além da membrana que circunda a célula, as membranas das organelas intracelulares tais como mitocôndria, retículo endoplasmático, núcleo e outras, apresentam uma estrutura bilipídica e uma variedade de proteínas e açúcares que são passíveis de ataque radicalar. Assim, o dano celular é, basicamente, o resultado do ataque das ERON (espécies reativas de oxigênio e nitrogênio) sobre as macromoléculas, tais como carboidratos, DNA,

proteínas e lipídios (Bergamini et. al., 2004; Berlett e Stadtman, 1997; Vasconcelos et al., 2007).

Níveis tóxicos de ERO representam um evento extremo que pode resultar em consequências deletérias, provocando uma série de patologias, como asma, aterosclerose, acidente vascular cerebral, diabetes, hipertensão, infarto do miocárdio, pneumonia e outros (Finkel e Holbrook, 2000; Davies, 2000). O dano celular resulta basicamente do ataque das ERO e ERN sobre as macromoléculas. Algumas doenças de grande incidência e prevalência têm como uma das causas o desbalanço redox (Tabela 1). No entanto, a produção subtóxica de ERO pode ocasionar alterações no estado redox celular e extracelular, que sinalizarão, por sua vez, mudanças nas funções celulares, como por exemplo, na expressão genética, no estímulo de fatores de transcrição nuclear e na determinação do destino das células, se necrose ou apoptose (Vertuani et al., 2004).

**Tabela 1 - Doenças selecionadas relacionadas ao estresse oxidativo.**

<b>Doença</b>	<b>Natureza do envolvimento com ER</b>
Aterosclerose, Síndrome de Bloom, Síndrome de Down, Kwashiorkor, Doença de Keshan	Falha ou consumo excessivo de defesas antioxidantes.
Doença de Parkinson, estados tóxicos causados por álcool, fumo, CCl <sub>4</sub> , etc.	Uso de drogas e toxinas. Na doença de Parkinson, as toxinas produzidas estariam envolvidas com a produção de radicais livres.
Doença de Alzheimer, Asma, Artrite reumatóide, asbestose, Síndrome de Insuficiência Respiratória do Adulto	Produção de O <sub>2</sub> <sup>-•</sup> , H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e HClO, por células fagocíticas ativadas.
Esclerose múltipla	Perturbação estrutural da célula. As hemácias se tornam mais susceptíveis à ação dos radicais livres.
Doença granulomatosa crônica	Defeito genético no sistema antioxidante.
<i>Diabetes mellitus</i> , anoxia, injúria da reperfusão, pré-eclâmpsia	Oxidação anormal de substratos ou mudanças na concentração de oxigênio.
Hipertensão arterial sistêmica	Produção de O <sub>2</sub> <sup>•</sup> por NADPH/NADP oxidase.
Hemocromatose idiopática, talassemia, anemia falciforme, doença de Wilson	Transferência de elétrons ao oxigênio por metais de transição.
Doença granulomatosa crônica, Deficiência de enzimas antioxidantes (Acatlassemia, p. ex.)	Defeito genético no sistema antioxidante, especificamente o sistema NADPH oxidase.

**Fonte:** Vasconcelos et al., 2007.

## 2.6 Sensores e biossensores na quantificação de biomarcadores do desbalanço redox

Biossensores são definidos como dispositivos analíticos incorporados a um material biológico (tecidos, micro-organismos, organelas, enzimas, ácidos nucleicos etc), a um material derivado biologicamente ou material similar, intimamente associado ou integrado com um transdutor, que pode ser óptico, eletroquímico, termométrico, piezoelétrico ou magnético. A tecnologia de biossensores constitui-se em um campo de grandes possibilidades em termos de inovação em várias áreas do conhecimento. É fundamental a pesquisa realizada para elucidar ou modular mecanismos de transferência de elétrons, sejam eles, diretos ou mediados. Além disto, é importante compreender os princípios do reconhecimento molecular e da

comunicação entre enzimas e transdutores em biossensores amperométricos e outros (Anker et al., 2008).

Os biomarcadores são medidas biométricas que carregam informações sobre a condição biológica de um indivíduo que está sendo testado. Biomarcadores mudaram a maneira pela qual, doenças são diagnosticadas, os efeitos de terapia são monitorados, toxinas são detectadas, incluindo desenvolvimento de novas drogas. Estão presentes em todas as experiências relacionadas à saúde, como diagnóstico de doenças cardiovasculares, diabetes, gravidez anormal, entre outras. De modo geral, a grande maioria das moléculas diagnósticas ou que levam ao reconhecimento de quadros patológicos são proteínas, daí a ligação entre proteômica e biomarcadores. Entretanto ainda é necessário um aperfeiçoamento das técnicas no sentido de conseguir o aumento da sensibilidade, da especificidade, e da acurácia dos testes. É necessária muita cautela com exame crítico dos novos métodos. (Kimmel et al., 2012).

Os biomarcadores possuem características passíveis de serem medidas e avaliadas como indicadores de processos biológicos normais, processos patogênicos ou de resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica. Como tal, refletiriam as mudanças em sistemas biológicos que estariam relacionadas à exposição ou aos efeitos de xenobióticos, outros tipos de fatores ou a materiais tóxicos (aqui incluiríamos aqueles relacionados a doenças), podendo ser classificados em (a) biomarcadores de exposição, (b) biomarcadores de efeito e (c) biomarcadores de susceptibilidade. O biomarcador ideal deve reunir as seguintes características: 1) possuir alta especificidade para o efeito de interesse; 2) refletir o efeito desde a fase inicial; 3) ter determinação e análise fáceis e de baixo custo; 4) ser passível de análise por técnica não invasiva, com alta sensibilidade no fluido biológico de interesse; 5) existir uma relação bem estabelecida entre a resposta do biomarcador e a exposição e ainda com o dano induzido.

## 2.7 Antioxidantes

O sistema antioxidante é classificado em enzimático, composto por: superóxido dismutase que catalisa a dismutação do  $O_2^{\bullet-}$  a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ); a catalase, que atua na decomposição de  $H_2O_2$  a  $O_2$  e  $H_2O$ , e a glutatona peroxidase, que atua sobre peróxidos em geral e não enzimático (glutaciona, principal composto antioxidante intracelular, tocoferóis, ascorbato, ácido úrico e  $\beta$ -caroteno, além de proteínas de transporte de metais de transição, como a transferrina (ferro) e ceruloplasmina (cobre) (Halliwell e Gutteridge, 2007). Substâncias envolvidas no binômio antioxidante – pró-oxidante podem ser quantificadas associando às técnicas bioquímicas tradicionais, técnicas de química analítica (Tabela 2). Esta combinação possibilita relacionar tal fenômeno em indivíduos com aspectos demográficos, clínicos e nutricionais, surgindo assim como uma importante ferramenta no estudo de fenômenos biológicos vinculados ao estresse oxidativo.

**Tabela 2 - Grupo de biomarcadores no sangue e principais métodos de análise**

Grupos de biomarcadores	Sub-grupos	Principais substâncias e métodos de análise
<b>Antioxidantes</b>	Capacidade antioxidante total	TRAP, ORAC, FRAP, TEAC, por espectrofotometria
	Enzimas antioxidantes	SOD, GPx e CAT são avaliadas espectrofotometricamente.
	Antioxidantes não enzimáticos	Vitaminas E, C e $\beta$ -caroteno avaliadas por HPLC; glutatona avaliada por espectrofotometria; ceruloplasmina e transferrina por turbidimetria e ácido úrico pelo método enzimático, razão GSH/GSSG por métodos enzimáticos e por espectrofotometria.
<b>Marcadores de dano oxidativo</b>	Proteínas oxidadas	Detecção de grupos carbonila por espectrofotometria.
	Lipídeos oxidados	Detecção de malondialdeído por HPLC com detecção no ultravioleta.
	Proteínas nitradas	3-Nitrotirosina (3-NO <sub>2</sub> -Tyr) por HPLC, com detecção eletroquímica.
	Oxidação das bases do DNA	Detecção de 8-oxo-2'-desoxiguanosina (8-oxodG) em linfócitos por HPLC
	Quebra de DNA	Teste do cometa ("comet assay") em leucócitos

Fonte: Vasconcelos et al., 2007

A determinação de diversos biomarcadores por métodos eletroanalíticos utilizando os Eletrodos Quimicamente Modificados tem possibilitado a realização de análises com maior versatilidade, rapidez, sensibilidade, baixo custo e simplicidade,

desde que, a imobilização de uma espécie eletroativa na superfície do eletrodo não necessite, em muitos casos, da adição de reagentes. (Lima et al., 2008, 2009, Silva et al., 2009).

### 2.7.1 Ácido Ascórbico

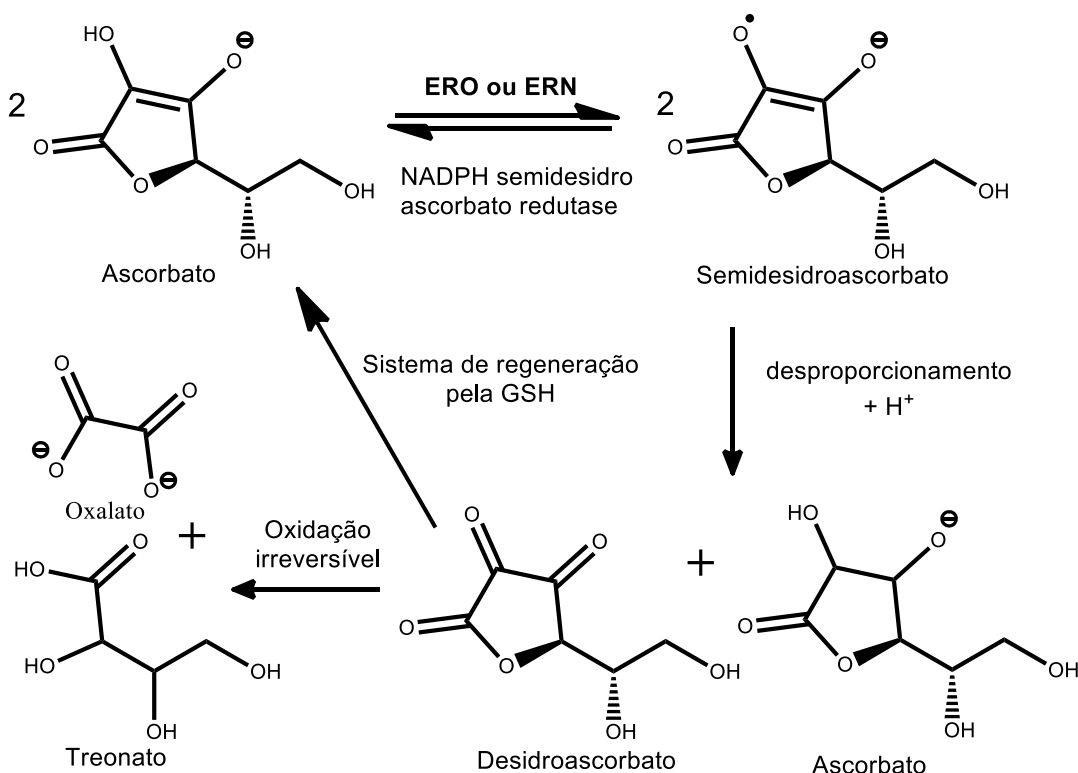
O ácido ascórbico ou vitamina C é comumente encontrado em nosso organismo na forma de ascorbato. Por ser muito solúvel em água, está localizado nos compartimentos aquosos dos tecidos orgânicos. O ascorbato desempenha papéis metabólicos fundamentais no organismo humano, atuando como agente redutor, reduzindo metais de transição (em particular  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ ) presentes nos sítios ativos das enzimas ou nas formas livres no organismo (Babior, 1997). Por ser um bom agente redutor o ascorbato pode ser oxidado pela maioria das ERO e ERN que chegam ou são formadas nos compartimentos aquosos dos tecidos orgânicos.

Sua oxidação produz inicialmente o radical semidesidroascorbato, que é pouco reativo. Esse radical pode ser reconvertido em ascorbato, ou duas moléculas dele podem sofrer desproporcionamento originando uma molécula de desidroascorbato e regenerando uma molécula de ascorbato.

O desidroascorbato pode ser então regenerado para ascorbato através de um sistema enzimático, ou ser oxidado irreversivelmente gerando oxalato e treonato (Halliwell, 1999; Levine et al., 1998; Podmore et al., 1998) (Figura 5). Tendo em vista que o ascorbato converte as ERO e ERN em espécies inofensivas e que os derivados do ascorbato são pouco reativos, esse age como antioxidante *in vivo*. Devido a estas propriedades, muitos autores sugerem a ingestão diária de doses maiores de ascorbato, para proteção contra o desenvolvimento de doenças crônicas, cardiovasculares e de alguns tipos de câncer (Halliwell, 1999; Levine et al., 1998; Podmore et al., 1998).



**Figura 5 - Ciclo oxidativo do ascorbato**

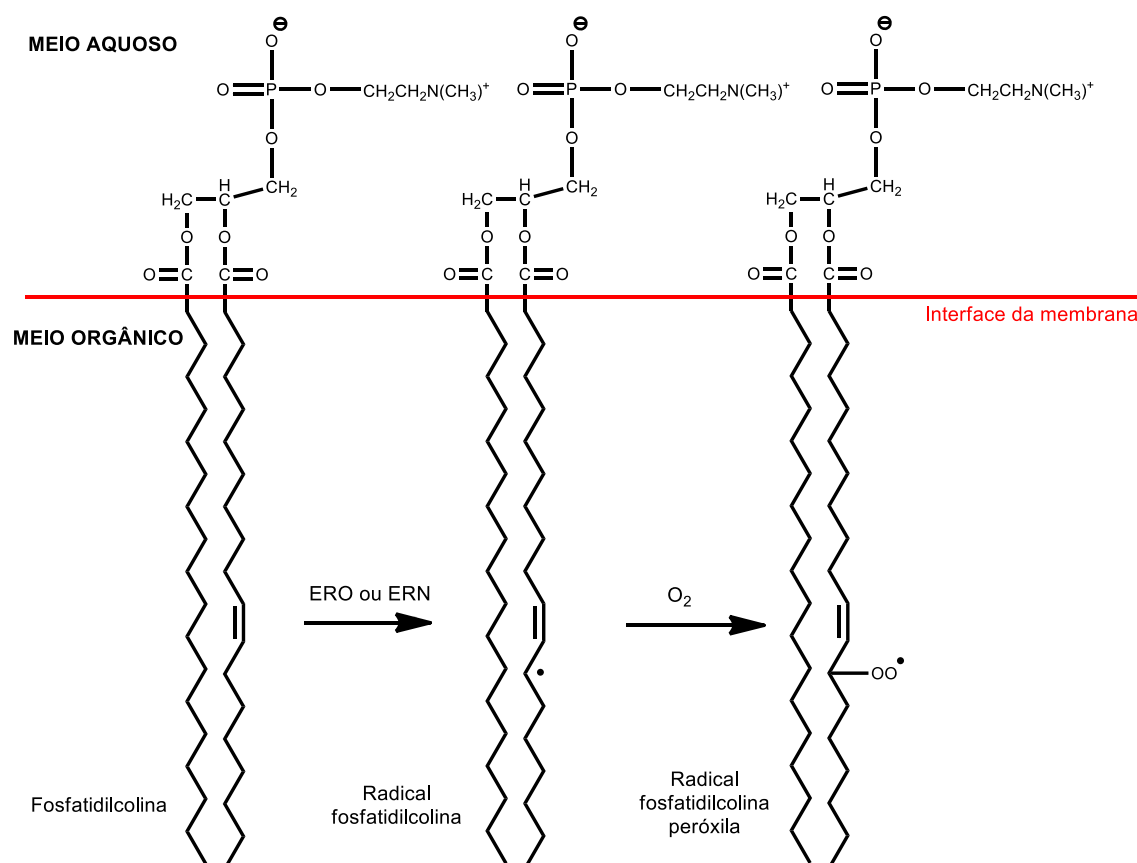


**Fonte:** Silva, 2013.

O ascorbato possui também propriedades pró-oxidantes, pois os íons Fe<sup>2+</sup> e Cu<sup>2+</sup> reagem com o peróxido de hidrogênio (reação de Fenton), gerando o radical hidroxila. Indiretamente, o ascorbato pode induzir as reações de radicais livres. Porém, o Fe encontra-se, na maior parte do tempo, ligado a proteínas de transporte ou armazenamento, em situação normal, as propriedades antioxidantes do ascorbato suplantam suas propriedades pró-oxidantes (Halliwell, 1999; Levine et al., 1998; Podmore et al., 1998). O ascorbato pode atuar contra a peroxidação de lipídios de duas maneiras: no plasma sanguíneo, atua na prevenção através da reação com as ERO e ERN presentes, ou na restauração doando hidrogênio ao radical lipídico. Isso explica seu papel na prevenção de doenças cardiovasculares, devido ao fato de que sem a formação dos radicais lipídico-peroxila não ocorre o ataque às proteínas das paredes dos vasos e artérias sanguíneos, evitando o acúmulo de lipídios nessas paredes e, conseqüentemente, seu entupimento. Por outro lado, nas membranas celulares ele atua em parceria com o  $\alpha$ -tocoferol. O radical livre normalmente abstrai um próton do carbono metilênico alílico e o radical lipídico formado rapidamente adiciona oxigênio tripleto gerando o radical lipídico-

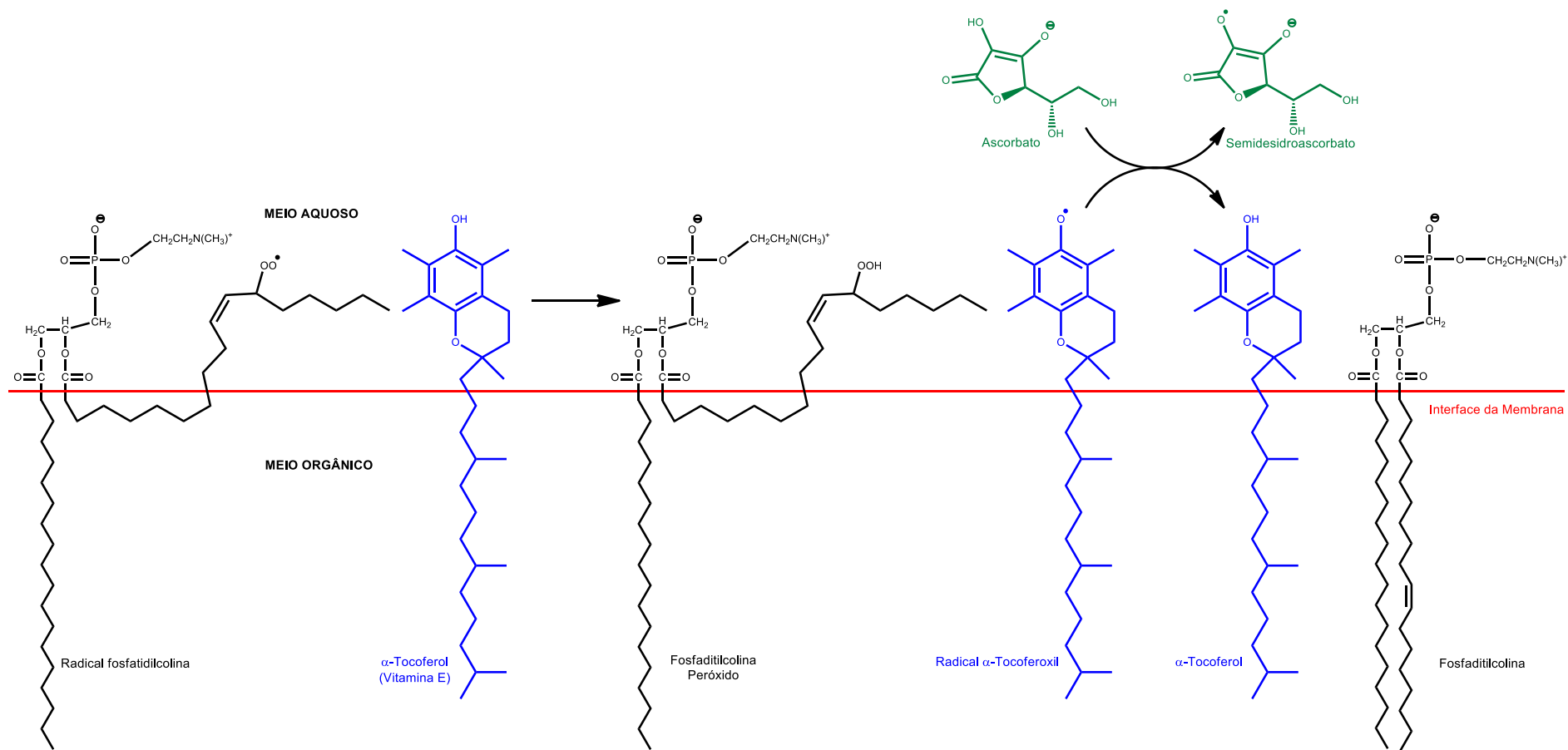
peróxila (Figura 6). Nesta etapa, o tocoferol age doando um hidrogênio para esse radical formando o lipídio-hidroperóxido e o radical tocoferoxila. O ascorbato na interface da membrana celular regenera o tocoferol doando um hidrogênio, transformando-se em semidesidroascorbato (Figura 7). As enzimas fosfolipase A<sub>2</sub>, fosfolípido hidroperóxido glutationa peroxidase, GPx e ácido graxo coenzima A restauram o lipídio (Buettner, 1993).

**Figura 6 - Ataque das ERO e ERN à membrana celular.**



Fonte: Silva, 2013.

**Figura 7 - Mecanismo de proteção da membrana celular pelo tocoferol e pelo ascorbato.**



Fonte: Silva, 2013.

O papel do ascorbato na proteção à oxidação do DNA e, conseqüentemente, sua ação preventiva no câncer é ambíguo. Estudos indicam que o consumo de ascorbato inferior ao recomendado (40-60 mg/dia), por ex., o consumo de 5 mg/dia aumentou os níveis de 8OHdG (5'-8-ciclo-2'-desoxiguanosina) em 91%. O consumo de 60 mg/dia reduziu os níveis de 8OHdG e 8OHG no organismo, reduzindo-se, assim, o risco de câncer. Foi verificado que uma suplementação superior a 500 mg/dia de ascorbato fez com que os níveis de 8OHdG e 8OHG decrescessem ainda mais, porém ocorrendo aumento nos níveis de 8OHA, Fapy-A (4,6-diamino-5-formamido-pirimidina) e Fapy-G (2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina). Mesmo com o aumento dessas espécies, o processo pode ser considerado benéfico, pois o 8OHdG e o 8OHG têm maior poder mutagênico que 8OHA, Fapy-A e Fapy-G. Não está estabelecido se a queda nos níveis de 8OHdG e 8OHG é consequência direta da ação do ascorbato como antioxidante ou da sua atuação como cofator das enzimas de reparo. Além disso, os níveis de 8OHA, Fapy-A e Fapy-G só aumentam expressivamente quando a concentração de ascorbato no plasma sanguíneo está acima de 70  $\mu\text{M}$ . Como a ingestão de 100 mg/dia promovia uma concentração de 60  $\mu\text{M}$  no plasma, recomendou-se uma ingestão entre 100-200 mg/dia, para otimizar suas propriedades antioxidantes sem causar danos ao DNA (Halliwell, 1999; Levine et al., 1998; Podmore et al., 1998).

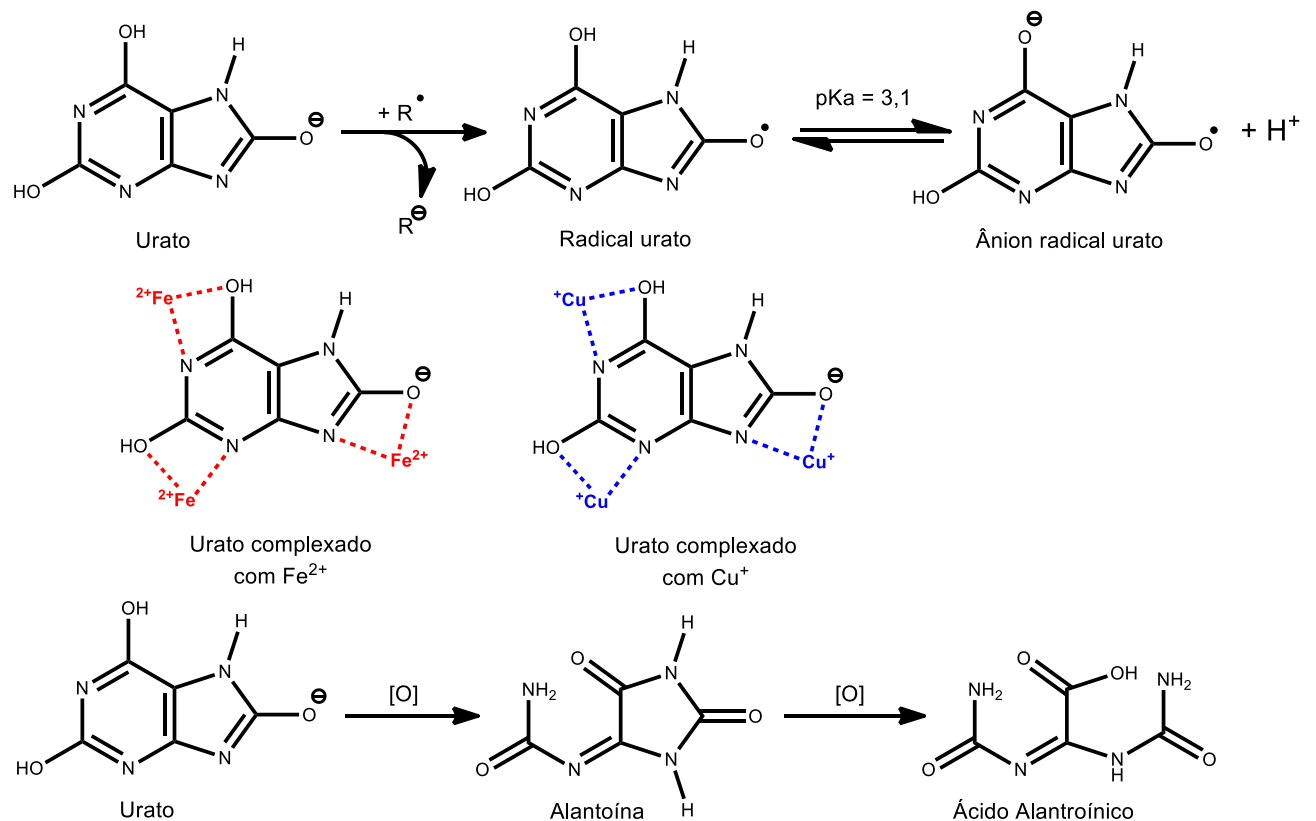
### 2.7.2 Ácido Úrico

O ácido úrico é a principal forma de excreção de nitrogênio das aves e dos répteis. Nos mamíferos, é produto secundário de excreção, derivado das bases purínicas. Na maioria dos tecidos orgânicos encontra-se na forma de ânion urato ( $\text{pK}_{a1}=5,4$ ). Somente a partir dos anos 80 foi demonstrado que é um antioxidante efetivo nos sistemas biológicos, capaz de proteger o DNA e lipídios de ERO e ERN. A alta polaridade do ácido úrico restringe sua atividade ao meio aquoso. A sua concentração nos compartimentos aquosos do organismo encontra-se muito próxima do limite de solubilidade (300  $\mu\text{M}$ ). Indivíduos com aterosclerose podem apresentar nível elevado de ácido úrico no sangue, que é indicativo da existência de um mecanismo compensatório

encontrado pelo organismo para controlar o estresse oxidativo (Larson, 1997; Nieto et al., 2000; Simic e Jovanovic, 1986).

O mecanismo antioxidante do urato pode ser resumido pela reação com a maioria dos agentes oxidantes em velocidade superior a das outras purinas (Figura 8). Nessa reação, há formação do radical urato estabilizado. Devido ao baixo  $pK_a=3,1$  do radical urato, esse se encontra na forma de ânion radical urato, o que facilita a doação de um próton em conjunto com o elétron. O  $pK_a$  de segunda ionização de 9,5 não permite que o radical urato se encontre na forma de um diânion no organismo (Nieto et al., 2000; Simic e Jovanovic, 1986)

**Figura 8 - Reações envolvendo a atividade antioxidante do ácido úrico.**



Fonte: Silva, 2013.

O urato reage rapidamente com o radical hidroxila  $HO^\bullet$ , no entanto, o urato é inerte às espécies superóxido ( $HOO^\ominus$ ), radical ânion superóxido ( $O_2^{\bullet\ominus}$ ), peróxidos ( $ROOH$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Sozinho não é capaz de desativar o oxigênio singlete  $^1O_2$ , porém no meio biológico ele causa

indiretamente sua desativação através da desativação de outras espécies excitadas. Sua reação mais importante é com os radicais peroxila ( $\text{ROO}^\bullet$ ) e  $\text{NO}_2^\bullet$  (gerando  $\text{NO}_2^-$ ). Essa grande atividade contra os radicais peroxila é a base do seu efeito antioxidante protetor do DNA e lipídios. Como ocorre em meio aquoso, o urato reage com os radicais peroxila antes desses penetrarem a membrana e iniciarem seus danos.

O urato é capaz de recuperar estruturas já atacadas que se tornaram radicais livres através da doação de um elétron e um próton. Ele também é responsável pela estabilização do ascorbato no plasma sanguíneo, inibindo a reação de Fenton (Larson, 1997; Nieto et al., 2000; Simic e Jovanovic, 1986) através de sua capacidade de quelar íons metálicos como  $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$  e  $\text{Cu}^+$  (Figura 6).

O ânion radical urato pode ser regenerado a urato pelo ascorbato, gerando semidesidroascorbato. Porém, o urato não é capaz de regenerar a vitamina E. A decomposição oxidativa irreversível do urato leva à formação inicialmente da alantoína e prossegue gerando o ácido alantoínico, ácido cianúrico, ácido parabênico, ácido oxálico e ácido glioxílico (Nieto et al., 2000; Simic e Jovanovic, 1986).

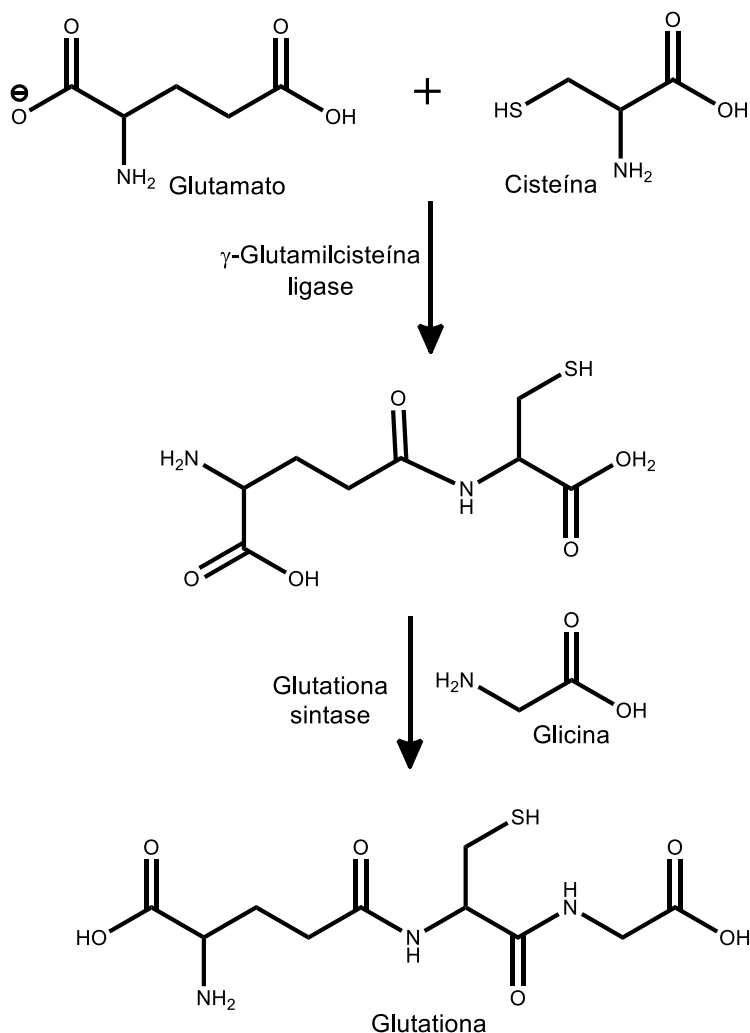
### 2.7.3 Glutationa

A glutaciona (GSH -  $\gamma$ -glutamilcisteinilglicina) é um antioxidante hidrossolúvel, reconhecido como o tiol não proteico mais importante nos sistemas vivos, sendo o grupo tiol da cisteína, o local ativo responsável pelas suas propriedades bioquímicas. Existe, na maioria das células, em concentrações compreendidas entre 1 e 8 mM, estando, geralmente, na sua maior quantidade no fígado. Em nível extracelular, a concentração de glutaciona é da ordem de 5-50  $\mu\text{M}$  (Huber; Almeida; Fátima, 2008).

A glutaciona é formada pelos aminoácidos glutamato, cisteína e glicina. O glutamato e a glicina são encontrados em concentrações milimolares, enquanto que a cisteína livre é limitada, com maioria de cisteína não proteica

sendo armazenada em GSH. Duas enzimas envolvidas na síntese da GSH são a ligase  $\gamma$ -glutamilcisteína (também chamado sintetase  $\gamma$ -glutamilcisteína) e glutaciona sintase (Figura 9) (Pocernich et al., 2000).

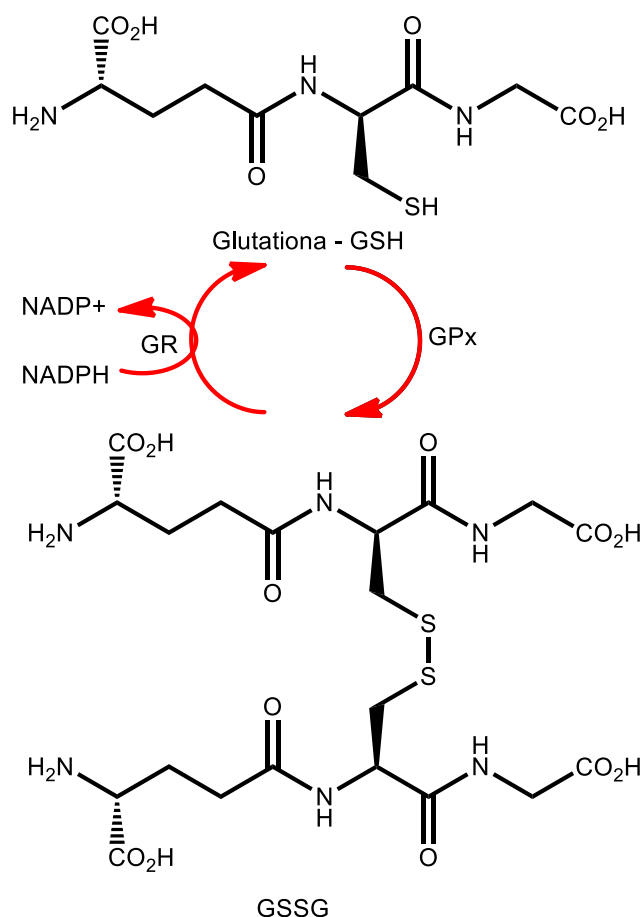
**Figura 9 - Síntese da Glutaciona.**



**Fonte:** SILVA, 2013 (Adaptado de Pocernich et al., 20012)

A GSH é capaz de reagir com espécies reativas de oxigênio (ROS) e compostos nucleófilos, tais como HNE (4-hidroxi-2-nonenal) e acroleína, produtos da peroxidação lipídica que reagem com tióis nas proteínas. GSH reduzida reage com os radicais livres para formar a glutaciona oxidada (GSSG), que pode ser catalisada pela enzima glutaciona peroxidase (GPx), ou ocorrem de forma independente. GSSG é reduzido para duas moléculas de GSH por GSH redutase (GR), utilizando os equivalentes redutores de NADPH (Figura 10) (Pocernich e Butterfiled, 2012).

**Figura 10 - Reação de oxidação da Glutaciona e sua regeneração.**



**Fonte:** SILVA, 2013.

Os níveis de GSH são reduzidos e os níveis de GSSG são aumentados em doenças relacionadas ao estresse oxidativo e com a idade, consistentes com aumento do estresse oxidativo. A proporção de GSH em relação a GSSG é utilizada como um marcador do estado redox tiol e estresse oxidativo (Pocernich e Butterfiled, 2012).

### 2.7.4 Cisteína

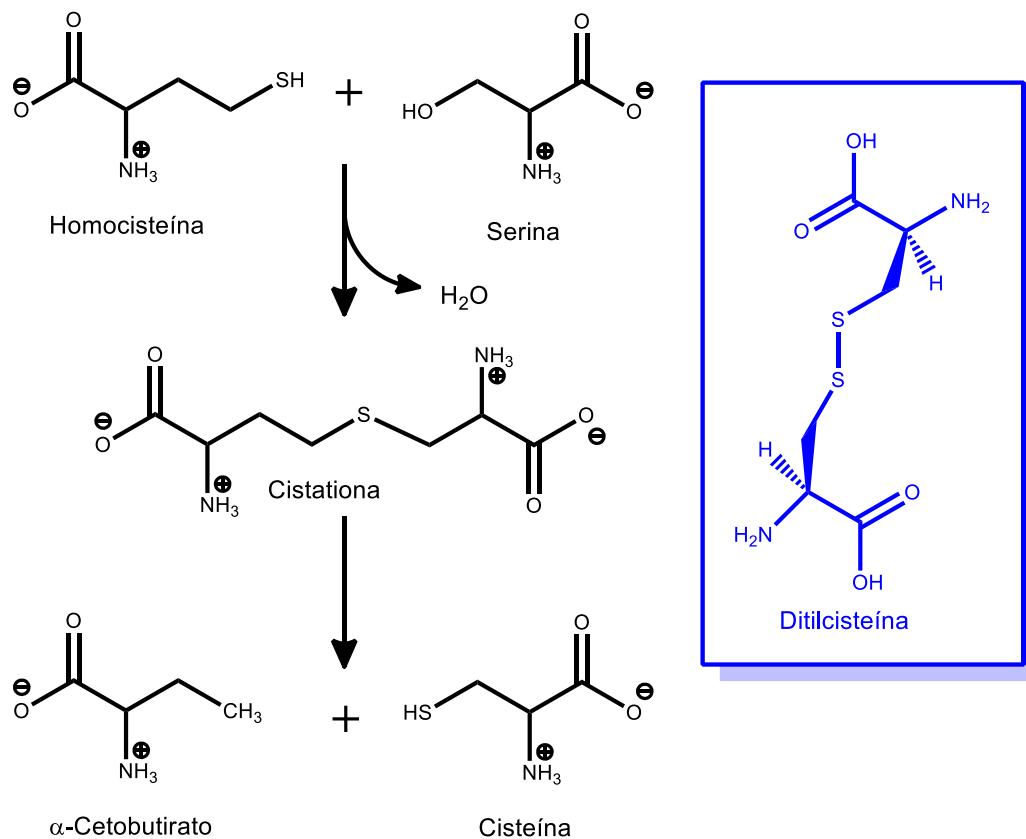
A cisteína (Cys) é um aminoácido semi-essencial, o que significa que ele pode ser biossintetizado em humanos a partir da homocisteína e da serina (Figura 11). O grupo tiol na cadeia lateral da cisteína frequentemente participa de reações enzimáticas, atuando como um nucleófilo. Os tióis são suscetíveis à oxidação, levando à formação de um dissulfeto, semelhante a GSH, sendo



importante para definição da estrutura de muitas proteínas (Figura 11) (Shew et al., 2005)

O grupo tiol da Cys é um nucleófilo e é facilmente oxidável. A reatividade é aumentada quando o tiol é ionizado e resíduos de cisteína em proteínas tem valores de pKa próximos da neutralidade, assim são frequentemente reativos nas células na forma de tiolatos. Por causa da alta reatividade, o grupo tiol da cisteína tem inúmeras funções biológicas.

**Figura 11 - Síntese da Cisteína e dissulfeto produto de sua oxidação.**



Fonte: SILVA, 2013. (Adaptado de Shew et AL., 2005)

Tendo em vista a facilidade dos tióis em sofrerem reações redox, a Cys tem propriedades antioxidantes. Estas propriedades são tipicamente expressadas no tripeptídeo glutathiona, o qual ocorre em humanos bem como em outros organismos.

## 2.7.5 Homocisteína

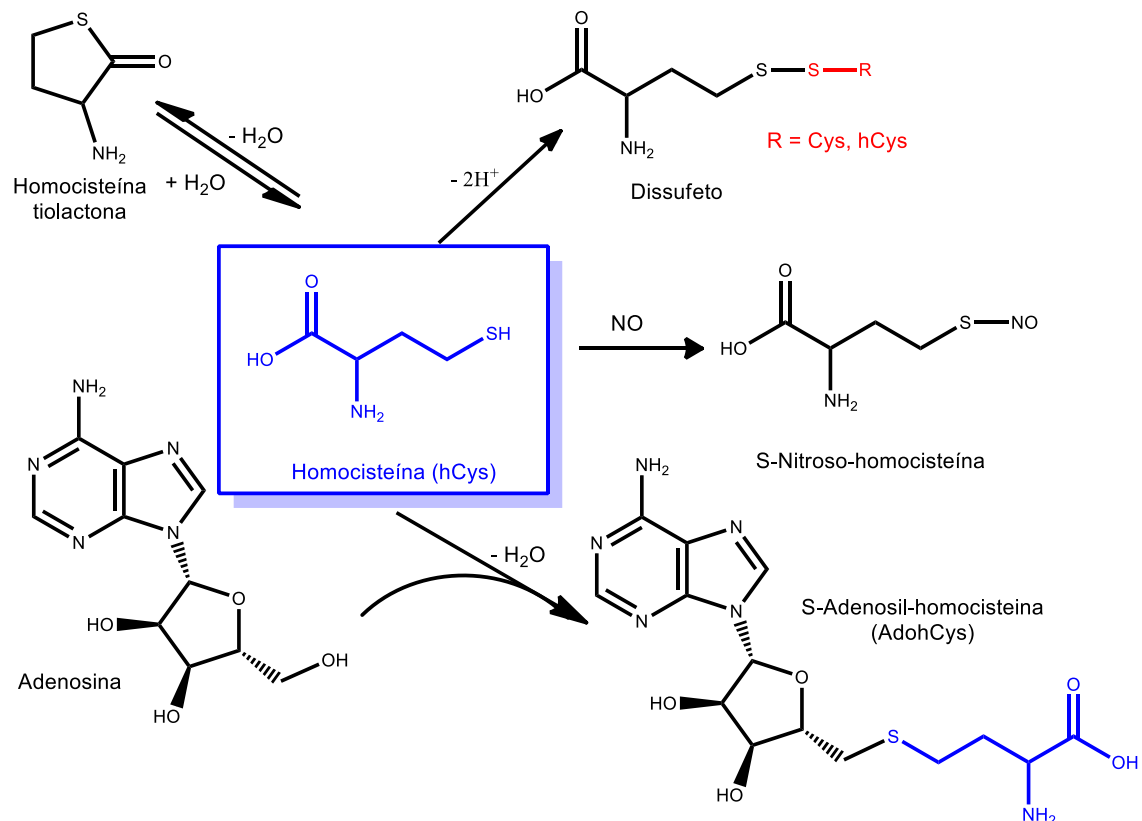
A homocisteína foi descoberta por De Vigneaud em 1932 (Ueland e Refsum, 1989), e corresponde a um aminoácido intermediário da síntese da cisteína, produzido no organismo a partir da metionina. A concentração elevada de homocisteína no plasma é reconhecida há alguns anos como um fator independente de risco para doenças cardiovasculares, incluindo aterosclerose e trombose venosa e outras várias doenças, compreendendo a doença neurodegenerativa, diabetes mellitus, disfunção renal, doença de fígado gordo. (Deminice et al., 2013). A concentração total deste aminoácido no plasma compreende a faixa de 5 a 15  $\mu\text{M}$ , e valores acima de 100  $\mu\text{M}$  podem ser considerados como condição de hiper-homocisteinemia. A incidência do aumento de homocisteína na população é de 1:200.000 (Refsum et al., 1998).

No entanto, ainda não existe um consenso sobre valores que identificam um potencial tóxico para o desenvolvimento de doença cardiovascular. Os mecanismos patológicos precisos pelos quais a homocisteína pode causar lesões vasculares não estão totalmente esclarecidos, apesar de inúmeros estudos terem documentado efeitos significativos da homocisteína, considerando esta classe de componentes e os modelos ateroscleróticos (Stamler e Slivka, 1996). Vários estudos “*in vitro*” vêm sendo realizados, sugerindo que níveis elevados de homocisteína atuam como um fator de risco para patologias de doenças vasculares, podendo ser discutida por duas questões fundamentais tais como a falta de especificidade (outros tióis produzem efeitos similares) e ao aumento extremamente elevado de suas concentrações séricas (100-1000  $\mu\text{M}$  em níveis “*in vivo*”). Outros estudos “*in vivo*” recentemente foram realizados, onde foram demonstrados os efeitos sobre a expressão da quimiocina sobre as células endoteliais aórticas (Jacobsen e Poddar, 1998), através de experimentos onde primeiramente haja inibição do crescimento das células vasculares do endotélio e a seguir a recuperação deste crescimento em resposta ao acúmulo deste aminoácido (Wang et al., 1997). Portanto, existem muitos trabalhos que vem sendo realizados para elucidar o papel deste aminoácido no organismo bem como entender a sua participação principalmente nas doenças cardiovasculares.

Níveis elevados de homocisteína ocorrem em 95% dos pacientes que apresentam deficiência de folato ou vitamina B12 (Kang et al., 1987 ; Stabler et al., 1988). A deficiência do folato leva a uma redução da N5-metilenotetraidrofolato-transferase, necessária para a remetilação da homocisteína em metionina, aumentando conseqüentemente, os níveis de homocisteína plasmática (Chu e Hall, 1988).

A deficiência da vitamina B6 prejudica a função das enzimas cistationina- $\alpha$ -sintase e  $\alpha$ -cistationase, promovendo uma falha no catabolismo da homocisteína via transsulfuração, levando conseqüentemente a uma hiperhomocisteinemia por um mecanismo ainda não bem esclarecido. Estas alterações podem ser induzidas pelo estresse oxidativo, através da formação de  $H_2O_2$  e a formação irregular de óxido nítrico (Figura 12) (Perna et al., 2003).

**Figura 12 - Mecanismo da ação da Homocisteína no estresse oxidativo.**



**Fonte:** Silva, 2013 (adaptado de Perna et al., 2003)

## 2.8 Referências

ADIBI, M. et al., Copper Nano-composite Potentiometric Sensor, **International Journal of Electrochemical Science**, v.6 p. 717-726, 2011.

ANKER J.N., et al., Biosensing with plasmonic nanosensors. **Nature Materials**, v. 7, p. 442-453, 2008.

ARRIBAS, A. S. et al. Analytical applications of glassy carbon electrodes modified with multi-wall carbon nanotubes dispersed in polyethylenimine as detectors in flow systems. **Anal. Chim. Acta**, v. 596, p.183-194, 2007.

BABIOR, B. M. Superoxide: a two-edged sword. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.30, p. 141-155, 1997.

BERGAMINI C.M. et al., Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. **Curr. Pharm. Design**, v. 10, p.1611-1626, 2004.

BERLETT, B.S.; STADTMAN, E.R.J. Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. **Biol. Chem.**, v. 272, p. 20313-20316, 1997.

BROWN, A.P.; ANSON, F.C. Cyclic and differential pulse voltammetric behaviour of reactants confined to the electrode surface. **Anal. Chem.**, v. 49, p. 1589-1595, 1977.

BROWN, A.P.; KOVAL, C.; ANSON, F.C. Illustrative electrochemical behavior of reactants irreversibly adsorbed on graphite electrode surfaces. **J. Electroanal. Chem.**, v. 72, p. 379-387, 1976.

BUETTNER, G. R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. **Arch. Biochem. Biophys**, v. 300, p. 535-543, 1993.

CHEN, W. et al., Recent advances in electrochemical sensing for hydrogen peroxide: a review, **Analyst** v. 137 p. 49-58, 2012.

CHU, R. C., HALL, C. A., The total serum homocysteine as an indicator of vitamin B12 and folate status. **Am J. Clin Pathol.**, v. 90, p. 446-449, 1988.

DAVIES, K.J.A. An overview of oxidative stress. **IUBMB Life**, v. 50, 241-244, 2000.

EVANS, J.F. et al. Electrocatalysis of solution species using modified electrodes. **Electroanal. Chem.**, v. 80, p. 409, 1977.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239-246, 2000.

GRISHAM, M.B. Reactive oxygen species in immune responses. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 12, p. 1479-1480, 2004.

HALLIWELL, B. Vitamin C: poison, prophylactic or panacea? **Trends Biochem. Sci.**, v. 24, p.255, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radical in Biology and Medicine. **Oxford University Press**, Oxford, 4. ed., p. 851, 2007

HENSLEY, K. et al. Reactive oxygen species, cell signaling and cell injury. **Free Radical Biol. Med.**, v. 28, p. 1456-1462, 2000.

HOLFORD, T.R.J. et al., Recent trends in antibody based sensors, **Biosensors & Bioelectronics** v. 34 p.12-24. 2012.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA. A. glutationa e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Quim. Nova**, v. 31 p. 1170-1179, 2008

JACOBSEN, D. W.; PODDAR, R. Vascular dysfunction at the cellular level. **Neth. J. Med**, v.52, p. S1, 1998.

JANATA, J.; HUBER, R.J. Solid State Chemical Sensors. **Academic Press**, Orlando, FL, 1985.

JOSEPH, P. D.; MANNERVIK, B.; MONTELLANO, O. P. Molecular Toxicology. **Oxford University Press**, New York, 1<sup>st</sup> ed., p.152-186, 1997.

KANG, S. S.; WONG, P. W., NORUSIS, M.. Homocysteinemia due to folate deficiency. **Metabolism**, v. 36, p. 458-462, 1987.

KIMMEL, D. W. Et al. Electrochemical Sensors and Biosensors. **Analytical Chemistry**, v. 84, p. 685-707, 2012.

LARSON, R. A. Naturally Occurring Antioxidants. **Lewis Publishers**, New York, p. 7, 1997.

LEI, J.; JU, H. Signal Amplification Using Functional Nanomaterials for Biosensing, **Chemical Society Reviews** v. 41, p. 2122-2134, 2012.

LEVINE, M. et al. **Nature**, v. 395, p. 231, 1998.

LIMA P. R. et al., In situ activated 4-nitrophthalonitrile-modified carbon paste electrode for kinetic investigation and for simultaneous determination of ascorbic and uric acids. **Electroanalysis**, v. 21, p. 2311-2320, 2009.

LIMA, P. R. et al., Alternating layers of iron(III) tetra(n-methyl-4-pyridyl)-porphyrin and copper tetrasulfonated phthalocyanine for amperometric

detection of 4-nitrophenol in nanomolar levels. **Electroanalysis**, v. 20, p. 2333-2339, 2008.

LIMA, P. R. et al., Electrocatalytic activity of 4-nitrophthalonitrile-modified electrode for the L-glutathione detection. *J. Pharm. Biomed. Analysis*, v. 47, p. 758-764, 2008.

LIMA, P. R. et al., Electrochemical investigations of the reaction mechanism and kinetics between NADH and redox-active  $(\text{NC})_2\text{C}_6\text{H}_3\text{-NHOH}/(\text{NC})_2\text{C}_6\text{H}_3\text{-NO}$  from 4-nitrophthalonitrile- $(\text{NC})_2\text{C}_6\text{H}_3\text{-NO}_2$ -modified electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, p. 448–454, 2008.

LIN, P.; YAN, F. Organic Thin-Film Transistors for Chemical and Biological Sensing, **Advanced Materials** v.24 p. 34-51, 2012.

LIU, Y.; DONG, X.; CHEN, P. Biological and Chemical Sensors Based on Graphene Materials, **Chemical Society Reviews** v. 41v. 2283-2307, 2012.

LUBERT, K. H.; KALCHER, K. History of Electroanalytical Methods, **Electroanalysis**, v. 22, p.1937-1946, 2010.

MAMEDOV, A. A. et al. Molecular design of strong single-wall carbon nanotube/polyelectrolyte multilayer composites. **Nature Mater.**, v. 1, p. 90-194, 2000.

MECKLENBURG, S. et al. The Design of Multifunctional Antioxidants Against the Damaging Ingredients of Oxidative Stress, **Phosphorus, Sulfur and Silicon and the Related**, v. 183, p. 863–888, 2008.

NI, Y. N.; KOKOT, S. Does Chemometrics Enhance the Performance of Electroanalysis, **Analytica Chimica Acta** v.626 p.130-146, 2008.

NIETO, F. J. et al. **Atherosclerosis**, v. 148, p.131, 2000.

PALCHETTI, I.; MASCINI, M. Electrochemical Nanomaterial - Based Nucleic Acid Aptasensors, **Analytical and Bioanalytical Chemistry** v. 402, p. 3103-3114, 2012.

PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. DE S.; KUBOTA, L.T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. **Química Nova**, v. 25, p. 1012-1021, 2002.

PERFEZOU, M.; TURNER, A.; MERKOCI, A. Cancer Detection Using Nanoparticle - Based Sensors, **Chemical Society Reviews**, v. 41, p. 2606-2622, 2012.

PERNA, A. F., INGROSSO, D., DE SANTO, N. G. Homocysteine and oxidative stress. **Amino Acids**, v. 25, p. 409-417, 2003.

POCERNICH, C.B.; BUTTERFIELD D.A. Elevation of glutathione as a therapeutic strategy in Alzheimer disease. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 1822 p. 625–630, 2012.

POCERNICH, C.B.; LA FONTAINE, M.; BUTTERFIELD, D.A. In-vivo glutathione elevation protects against hydroxyl free radical-induced protein oxidation in rat brain, **Neurochem. Int.** v. 36 p.185–191, 2000.

PODMORE, I. D. et al. **Nature**, v. 392, p. 559, 1998.

RADI, A. E. Recent updates of chemically modified electrodes in pharmaceutical analysis. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 13, p. 728-752, 2010.

REFSUM, H., UELAND, P. M., NYGARD, O., VOLLSET, S. E., Homocysteine and cardiovascular disease. **Annu Rev Med.**, v. 49, p. 31-62, 1998.

SCAMPICCHIO, M. et al., Electrospun Nonwoven Nanofibrous Membranes for Sensors and Biosensors, **Electroanalysis** v.24 p.719-725, 2012.

SHEW, S.B. et al., Assessment of cysteine synthesis in very low-birth weight neonates using a c-13(6) glucose tracer, **Journal of Pediatric Surgery** v. 40 p. 52-56, 2005.

SIDDONS, G. P. et al. Highly Efficient Gating and Doping of Carbon Nanotubes with Polymer Electrolytes. **Nano Lett.**, v. 4, p. 927-931, 2004.

SILVESTER, D.S. Recent Advances in the use of Ionic Liquids for Electrochemical Sensing, **Analyst** v. 136 p.4871-4882, 2011.

SIMIC, M. G.; JOVANOVIC, S. V. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 111, p. 5778, 1989.

STABLER, S. P. et al. Elevation of total homocysteine in the serum of patients with cobalamin or folate deficiency detected by capillary gas chromatography-mass spectrometry. **J Clin Invest.**, v.81, p. 466-474, 1988.

STAMLER, J. S., SLIVKA, A. Biological chemistry of thiols in the vasculature and in vascular-related disease. **Nutr Rev.**, v. 54, p. 1-30, 1996.

STOECKER, P.R.; YACYNYCH, A.M. Chemically modified electrodes as biosensors. **Selective Electrode Rev.**, v. 12, p. 137, 1990.

STUTTS, K.J.; WIGHTMAN, R.M. Electrocatalysis of ascorbate oxidation with electrosynthesized, surface-bound mediators. **Anal. Chem.**, v. 55, p. 1576-1579, 1983.

SUN, Y.F. et al., Metal Oxide Nanostructures and Their Gas Sensing Properties: A Review, **Sensors** v.12, p. 2610-2631, 2012.

UELAND, P.M., REFSUM, H. Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: plasma levels in health, disease, and drug therapy. **J Lab Clin Med.**, v. 114, p. 473-501, 1989.

VASCONCELOS, S.M.L. et al. Espécies Reativas de Oxigênio e de Nitrogênio, Antioxidantes e Marcadores de Dano Oxidativo em Sangue Humano: Principais Métodos Analíticos. **Química Nova**, v. 30, p.1323-1338, 2007.

VERTUANI, S.; ANGUSTI, S.; MANFREDINI, S. The antioxidants and pro-antioxidants: an overview. **Curr. Pharm. Design**, v. 10, p.1677-1694, 2004.

WAGGONER, P.S.; CRAIGHEAD, H.G. Micro- and Nanomechanical Sensors for Environmental, Chemical and Biological Detection, **Lab on a Chip**, v. 7, p.1238-1255, 2007.

WANG, H. et al. Inhibition of growth and p21ras methylation in vascular endothelial cells by homocysteine but not cysteine. **J Biol Chem.**, v. 272, p. 25380-5, 1997.

WANG, J. Carbon-Nanotube Based Electrochemical Biosensors: A Review. **Electroanalysis**, v. 17, p. 7-14, 2005.

YI, F.; LA VAN, D.A. Nanoscale Thermal Analysis for Nanomedicine by Nanocalorimetry, **Nanomedicine and Nanobiotechnology** v. 4 p. 31-4, 2012.

ZEN, J. M. KUMAR, S. A., TSAI, D. M. Chemically Modified Electrodes in Analytical Chemistry. **Electroanalysis**, v. 15, p. 1073-1087, 2003



### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Desenvolver novas plataformas para a eletroanálise de antioxidantes de importância biológica.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Promover a modificação de eletrodos de carbono vitreo com nanotubos de carbonos, filmes poliméricos, nanoparticulas de ouro e complexos metálicos, afim de possibilitar a redução do sobrepotencial para a oxidação de substâncias biologicamente importantes;
- Otimizar os parâmetros de modificação sobre o comportamento eletroquímico;
- Estudar a cinética de transferência de elétrons entre as espécies imobilizadas e os eletrodos;
- Caracterizar a morfologia dos sistemas desenvolvidos;
- Aplicar estes eletrodos como sensores para quantificação dessas espécies em amostras reais.

#### 4 POLY-XANTHURENIC ACID MODIFIED ELECTRODES: AN AMPEROMETRIC SENSOR FOR THE SIMULTANEOUS DETERMINATION OF ASCORBIC AND URIC

Francisco de Assis dos Santos Silva<sup>a,d</sup>, Cleylton Bezerra Lopes<sup>a,b,d</sup>, Lauro Tatsuo Kubota<sup>c,d</sup>, Phabyanno Rodrigues Lima<sup>a,b,d\*\*</sup>, Marília Oliveira Fonseca Goulart<sup>a,d\*</sup>

<sup>a</sup>*Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, 57072-970 Maceió, AL, Brazil*

<sup>b</sup>*Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Alagoas, IFAL, 57020-600 Maceió-AL, Brazil*

<sup>c</sup>*Instituto de Química, UNICAMP, C. Postal 6154, 13084-971 Campinas, SP, Brazil*

<sup>d</sup>*Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Bioanalítica, UNICAMP, C. Postal 6154, 13084-971 Campinas, SP, Brazil*

---

Corresponding author. *E-mail address:* [mofg@qui.ufal.br](mailto:mofg@qui.ufal.br) (M. O. F. Goulart)

\*\* Tel.: +55 82 3214-1393; fax: +55 19 3214-1389

*E-mail address:* [phabyanno.lima@ifal.edu.br](mailto:phabyanno.lima@ifal.edu.br) (P. R. Lima)

## Abstract

The poly-xanthurenic acid (poly-Xa)/ multi-walled carbon nanotube (MWCNT) / glassy carbon modified electrode (MWCNT/poly-XA/GCE) was successfully applied for the simultaneous determination of ascorbic (AA) and uric (UA) acids. Cyclic voltammetric results show that the modified electrode displays an excellent electrocatalytic activity toward the oxidation of AA at a low potential (0.05 V *versus* Ag/AgCl) and anodic peak resolution ( $\Delta E_{pa}$ ), close to 300 mV *vs.* Ag/AgCl, in solutions containing AA and UA. Values in the order of  $10^6 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  were obtained for the kinetic constant  $\kappa$  for the catalytic oxidation of ascorbic acid, upon evaluation by cyclic voltammetry, chronoamperometry and RDE. Furthermore, the sensor provided limits of detection of  $0.19 \mu\text{mol L}^{-1}$  and  $0.31 \mu\text{mol L}^{-1}$  for AA and UA, respectively. The sensor was applied for the simultaneous determination of AA and UA in urine samples and the average recoveries for these samples were 99.9 ( $\pm 2.5$ )% and 99.9 ( $\pm 2.6$ )%, respectively.

**Keywords:** Xanthurenic Acid; MWCNT; Ascorbic Acid; Uric Acid; Electrocatalysis; Chemically Modified Electrodes.

## 1. Introduction

Ascorbic acid (AA) and uric acid (UA) usually coexist in real biological matrices, thus, the development of a selective and sensitive method for their simultaneous determination is highly desirable for analytical and diagnostic applications. AA is a soluble vitamin widely present in many biological systems and in multivitamin preparations, commonly used as antioxidants [1]. AA has been used for the prevention and treatment of common cold, mental illness, infertility, cancer, AIDS and others [2,3]. Furthermore, often coexisting with AA in biological fluids such as blood and urine, UA is a primary end product of purine metabolism and its abnormal level is, normally, indicative of some diseases like gout, hyperpiesia, and Lesch-Nyhan disease [4,7].

Electrochemical determination methods of AA and UA have received much attention because they can be more selective, less expensive and faster. Simultaneous detection of AA and UA is necessary not only in the field of biomedical chemistry but also for diagnostic and pathological research. However, it is still difficult the simultaneous determination of AA and UA directly at ordinary (for instance, carbon and metal) electrodes, because they undergo oxidation at an overlapping potential and electrode fouling takes place due to the adsorption of oxidation products [8-10].

To overcome these problems, various modified electrodes have been built and used for simultaneous determination of these compounds. Ruthenium oxide-modified electrode could attain the capability for simultaneous determination of AA in the presence of UA [11]. More recently, poly(4-amino-1,1'-azobenzene-3,4'-disulfonic acid)-coated electrode has been described for the selective detection of UA in the presence of AA [12]. Pt-Au hybrid film-modified electrode [13], pyrolytic graphite modified electrode [14], zinc oxide composite film [15], palladium nanoparticle-loaded

carbon nanofibers [16], surfactant-induced iron(II) phthalocyanine [17] and 4-nitrophthalonitrile modified carbon paste electrode [18] have been reported for the simultaneous determination of AA and AU. Various voltammetric techniques using electrodes modified by materials such as metal NPs [19,20] carbon nanostructures [21,22] and polymers [23] have been proposed to improve detection of AA in the presence of AU. However, all of the reported modified electrodes have their advantages and limitations, such as, low sensitivity, high detection and quantification limits and poor stability. Thus, it is necessary to have further efforts for the development of simple, rapid, selective, and sensitive electrochemically modified electrodes that can improve the simultaneous detection of different species in the presence of each other and other interferents.

Recently, we reported the preparation, characterization and application of a simple and efficient multiwalled carbon nanotubes (MWCNT)/poly-xanthurenic acid (Xa)-modified glassy carbon electrode (GCE) based on the electropolymerization of Xa (MWCNT/poly-XA/GCE) for the electrocatalytic oxidation of NADH [24]. Based on our work, Zhang and coworkers prepared poly-xanthurenic acid/Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> membranes and applied to DNA sensing [25].

In the present case, MWCNT/poly-XA/GCE was investigated towards oxidation for the simultaneous determination of AA and UA.

## **2. Experimental**

### ***2.1. Chemicals and solutions***

All the chemicals were of analytical grade and used as received, with no further purification. Multi-walled carbon nanotubes (MWCNT, > 95 %, 7-15 nm x 0.5-10 μm), ascorbic acid, uric acid and xanthurenic acid (~96%, Xa) were acquired from Sigma -

Aldrich, St. Louis, USA). All the solutions were freshly prepared prior to each experiment.

## **2.2. Construction of the sensors and electrochemical measurements**

GCE (3 mm in diameter) was manually polished with alumina powder ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ , 1  $\mu\text{m}$ ) and rinsed with Milli-Q water. After cleaning the electrode, a suspension was prepared by sonication, mixing 2.0 mg of MWCNT and 1 mL of DMF. Two  $\mu\text{L}$  of this suspension were then deposited directly upon the GCE surface and dried at 80  $^\circ\text{C}$  to form a MWCNT on the GCE surface (MWCNT/GCE)[24].

The electroactive system was electrogenerated *in situ* from Xa oxidation, after cycling (10 scans) in the potential range of -0.5 to +1.0 V vs. Ag/AgCl, at 50  $\text{mV s}^{-1}$ , in a solution of Xa (120  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) in 0.1  $\text{mol L}^{-1}$  PBS (pH 5.5). Prior to the electropolymerization experiments, PBS was bubbled with nitrogen for 10 min [24].

The voltammetric measurements were performed in an Echo Chemie Autolab PGSTAT-30 potentiostat (Utrecht, The Netherlands). All the measurements were run using an electrochemical cell with three electrodes, with an Ag/AgCl electrode as reference, a Pt wire as auxiliary and an unmodified or modified glassy carbon, in the latter case, with MWCNT/GCE and poly-Xa (MWCNT/poly-Xa/GCE) as working electrodes. The actual surface area (0.10  $\text{cm}^2$ ) of the MWCNT/poly-Xa/GCE electrode was estimated as earlier reported [25].

## **2.3. Real samples analyses**

The utilization of the proposed modified electrode in the analysis of real samples was also investigated by a direct analysis of AA and UA in human urine obtained from volunteers. At first, a human urine sample was diluted 50 times with a 0.1  $\text{mol L}^{-1}$

phosphate buffer (pH 7.0). Then the urine samples were spiked with  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  of AA and UA.

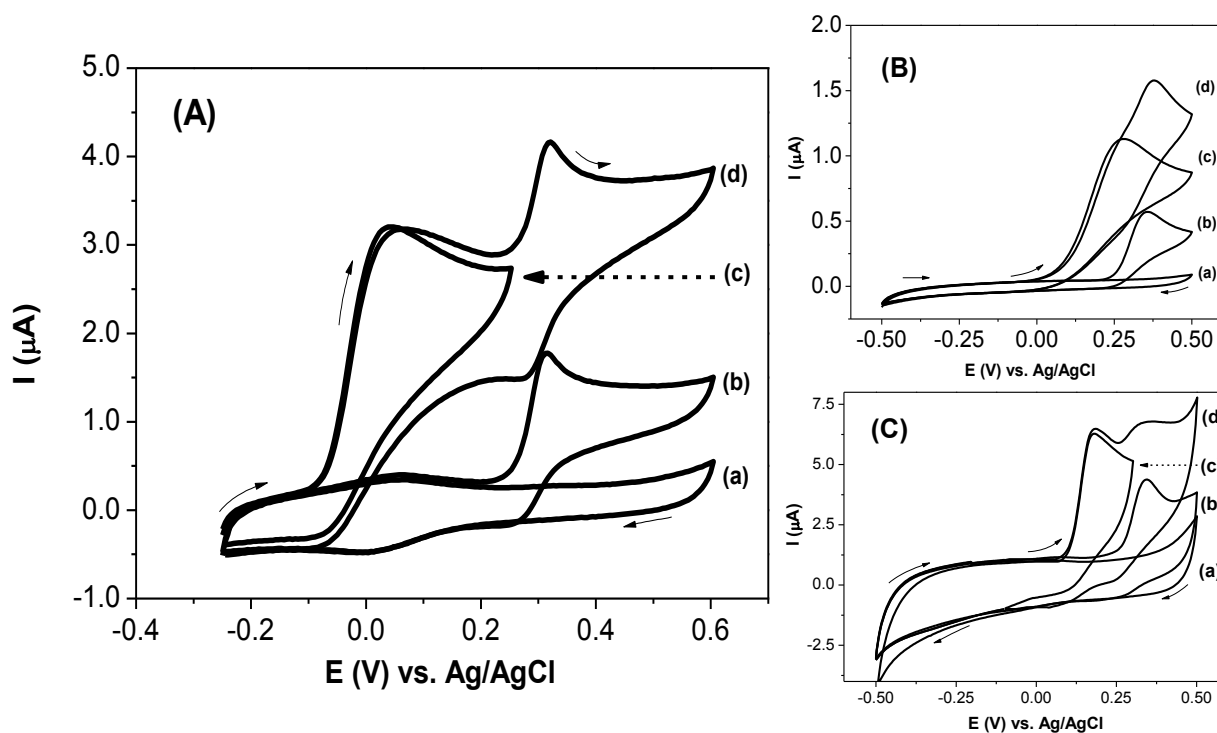
### 3. Results and discussion

#### 3.1. Electrocatalytic oxidation of AA and UA.

The electrocatalytic activity of the MWCNT/poly-Xa/GCE was evaluated toward the oxidation of AA and UA. In Figure 1A, the cyclic voltammogram (a) represents MWCNT/poly-Xa/GCE which has as a mediator, the already reported polymer-based quinone/hydroquinone system [24]. When a solution of AA is added, the oxidation peak,  $E_{\text{paAA}} = 0.05 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  significantly increased with the concomitant disappearance of the reduction peak (Figure 1A (a,c)). However, with the addition of the UA solution, a catalytic effect is not observed, and the UA oxidation occurs at  $E_{\text{paUA}} = 0.35 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  (Figure 1A (b)). To confirm the catalytic activity of the modified electrode toward AA oxidation, AA and UA solutions were added simultaneously (Figure 1A (d)). The analysis of Figure 1A (d) allows us to suggest the catalytic nature of AA oxidation with no effect on the UA oxidation. Furthermore, the difference between the two peak potentials is close to  $300 \text{ mV vs. Ag/AgCl}$ , large enough to allow the selective and simultaneous determination of AA and UA, in their binary mixture.

Figures 1B and 1C display control experiments: firstly unmodified GCE where the oxidation potential peaks of AA and UA are very closed (1B, (b,c)). It is practically impossible to analyze the contribution current of each compound in mixture (1B, (d)). However in Figure 1C, with GCE modified with only carbon nanotubes (MWCNT/GCE),  $E_{\text{paAA}}$  and  $E_{\text{paUA}}$  are now slightly separated (1C, (b) and (c)), more evident in Figure 1B(d) with AA and UA together. This result shows a synergistic effect between the carbon nanotubes and the xanthurenic acid polymer film on the

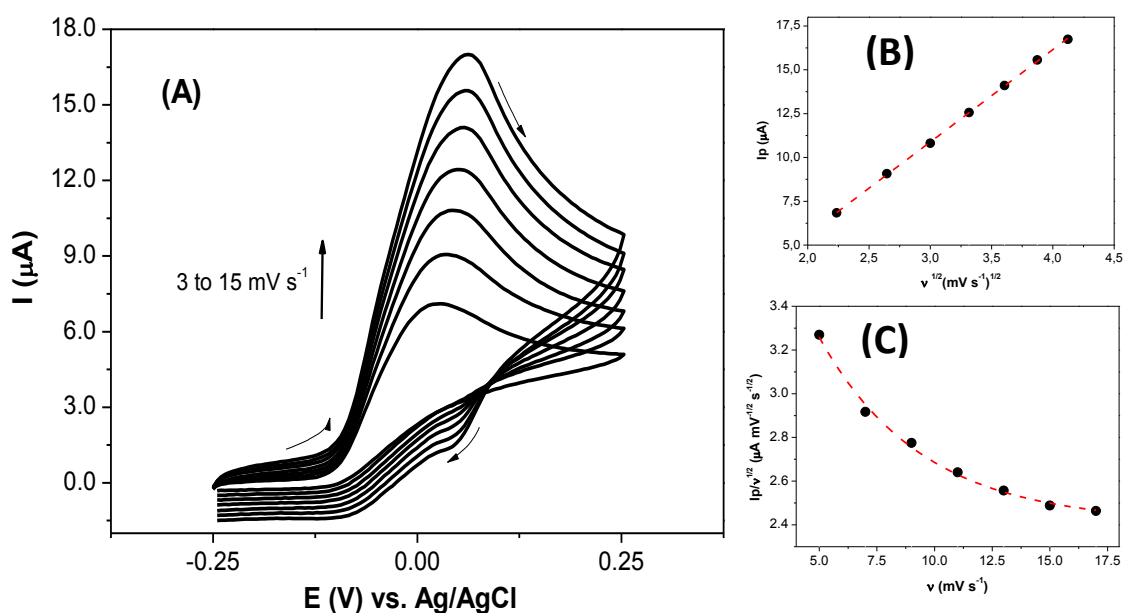
electrode surface to the catalytic activity toward AA oxidation and simultaneous determination of AA and UA. This behavior may be explained by a faster electron-transfer rate due to the modification by poly-Xa.



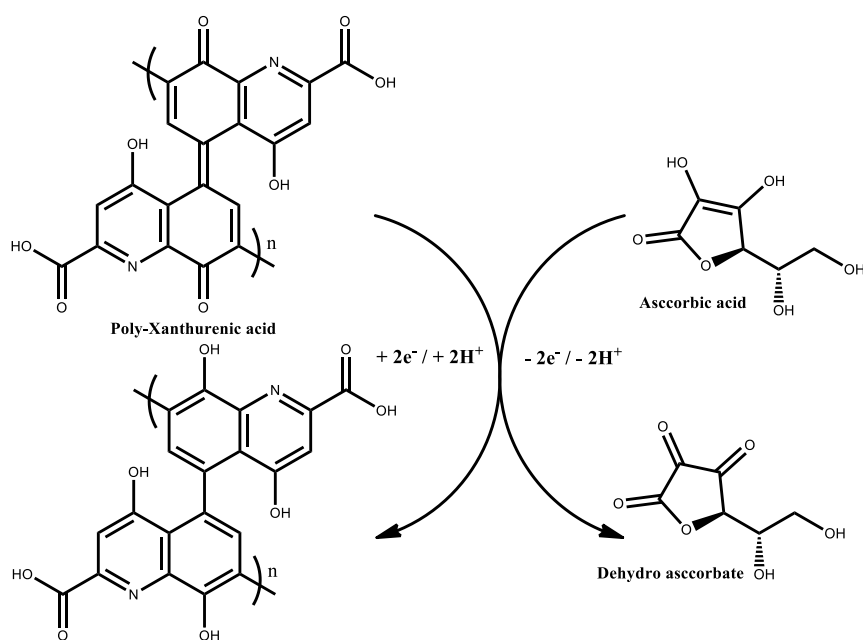
**FIGURE 1** - Cyclic voltammograms of the MWCNT/poly-Xa/GCE (A), GCE (B) and MWCNT/GCE (C), in PBS  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7.0 and scan rate of  $5 \text{ mV s}^{-1}$  (a), in presence of UA  $0.25 \text{ mmol L}^{-1}$  (b), in presence of AA  $0.25 \text{ mmol L}^{-1}$  (c), and in presence of AA  $0.25 \text{ mmol L}^{-1}$  + UA  $0.25 \text{ mmol L}^{-1}$  (d).



To get mechanistic details of the catalytic reaction with AA, cyclic voltammetry at various scan rates was performed (Figure 2A). The oxidation peak potential had moved toward more positive values and a reduction peak appeared. The peak current was shown to be proportional to  $\nu^{1/2}$ , as expected to a diffusion-controlled redox process (Figure 2B). Furthermore, the normalized peak current by the square root of the scan rate ( $I_p/\nu^{1/2}$ ) plotted *versus* the scan rate shows characteristic of an electrochemical – chemical catalytic process (EC') (Figure 2C) [27]. A mechanistic proposal for AA oxidation depends on the reduction of the quinonoid group present in the polymeric structure of poly-Xa (Figure 3). Considering the behavior of the peak potential with the pH solution, between 5.0 and 8.0, the relationship is close to 0.059 ( $n_p/n_e$ ) V/pH where  $n_p = n_e$  was obtained, so, the number of protons involved in this process should be equal to the number of electrons, as showed by Kubota and coworkers and expected to a quinone/hydroquinone system [18].



**FIGURE 2** - (A) Cyclic voltammograms of the MWCNT/poly-Xa/GCE in PBS 0.1 mol  $\text{L}^{-1}$  pH 7.0, in presence of 0.5 mmol of AA at various scan rates (from 3 to 15  $\text{mV s}^{-1}$ ), (B) Liner correlation between peak current and  $\nu^{1/2}$ . (C) Plot of the peak current normalized with  $\nu^{1/2}$  *versus* scan rate.



**FIGURE 3** - Proposed mechanism for AA oxidation on the modified electrode.

### 3.2. Chronoamperometric studies

The double step chronoamperometry was applied for the investigation of the electrocatalytic process on MWCNT/poly-Xa/GCE. Figure 4A shows a series of well-defined chronoamperograms of MWCNT/poly-Xa/GCE, in absence and in presence of various AA concentrations. As can be seen, there is no net cathodic current corresponding to the reduction of the mediator in the presence of AA, while the forward and backward potential step chronoamperograms for mediator in the absence of AA show very symmetrical chronoamperometry with an equal charge consumed for the oxidation and reduction of the quinone/hydroquinone redox system at the surface of MWCNT/poly-Xa/GCE.

The current increases with the concentration of AA at +0.050 V and the reduction current kept unaltered at -0.100 V *vs.* Ag/AgCl. The area under each chronoamperogram was integrated (Figure 4B).

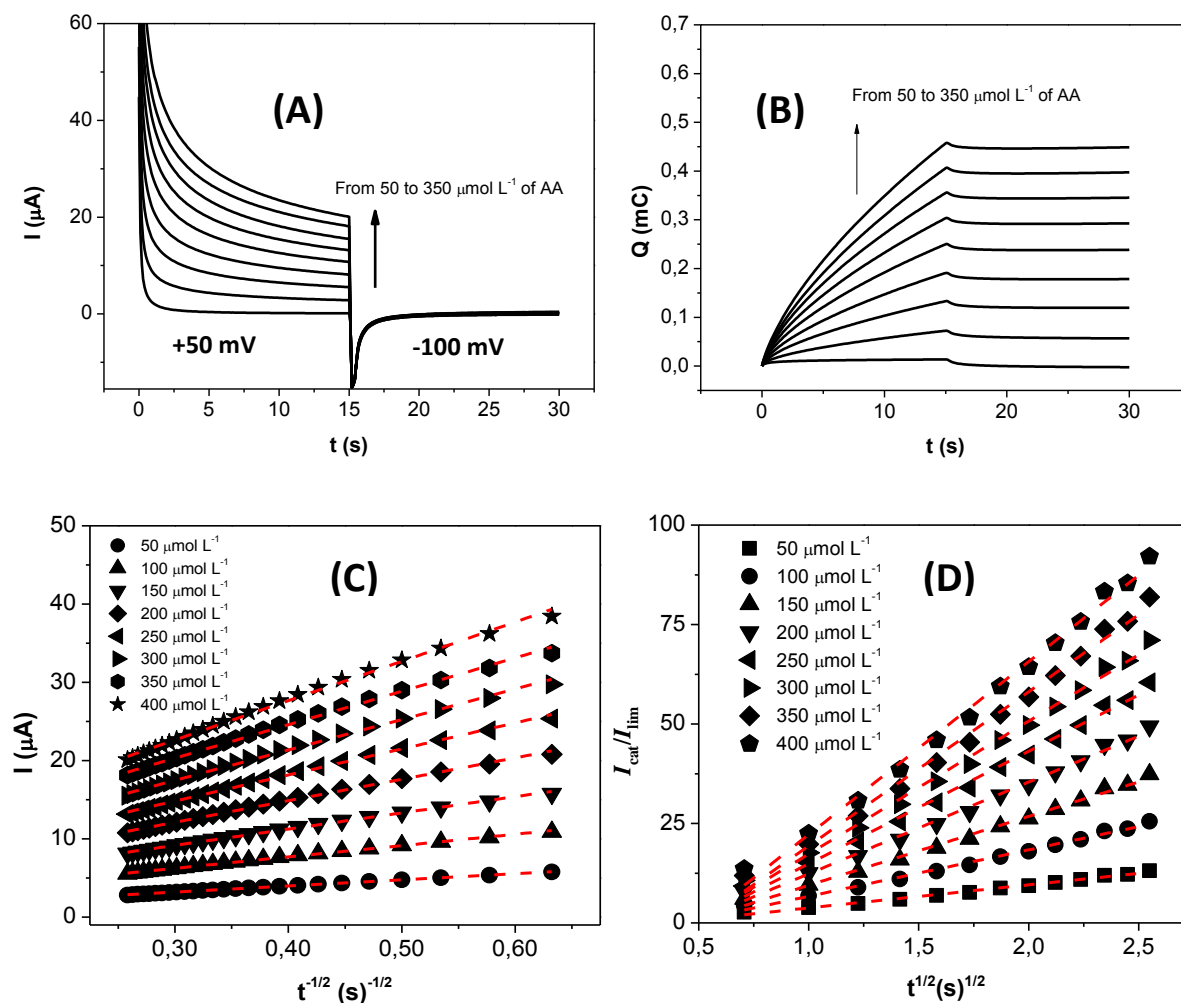
Chronoamperometry was used to estimate AA diffusion coefficient in solution. For an electroactive compound with diffusion coefficient ( $D$ ), the corresponding current of the electrochemical reaction (under diffusion control) is described by Cottrell's law [26].

$$I = nFAD^{1/2}C_{bulk}(\pi t)^{-1/2} \quad (1)$$

where  $D$  and  $C_{bulk}$  are the diffusion coefficient and the bulk concentration, respectively. The average value of  $D$ , obtained from the slopes of  $I$  versus  $t^{-1/2}$  plots (Figure 4C) for different concentrations of AA, is  $2.73 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ . The catalytic rate constant ( $k_{cat}$ ) was calculated by chronoamperometry, according to the method described in [27].

$$\frac{I_{cat}}{I_L} = \pi^{1/2}(k_{cat}C_{bulk}t)^{1/2} \quad (2)$$

where  $I_{cat}$  and  $I_L$  are the current of the MWCNT/poly-Xa/GCE in presence and absence of AA, respectively,  $k_{cat}$ ,  $C_{bulk}$  and  $t$  are the catalytic rate constant, the bulk concentrations of AA and time elapsed, respectively. From the slope of  $I_{cat}/I_L$  versus  $t^{1/2}$  plot (Figure 3D) we can simply calculate the value of  $k_{cat}$  for a given concentration of AA. The average value of  $k_{cat}$  was found to be  $1.1 \times 10^6 \text{ mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .



**FIGURE 4** - (A) Chronoamperograms of the MWCNT/poly-Xa/GCE in PBS 0.1 mol L<sup>-1</sup> pH 7.0 in the presence of various concentrations of AA; (B) Integral of the chronoamperograms; (C) plot of  $I$  versus  $t^{-1/2}$ ; (D) Plot of  $I_{\text{cat}}/I_{\text{L}}$  versus  $t^{1/2}$ .

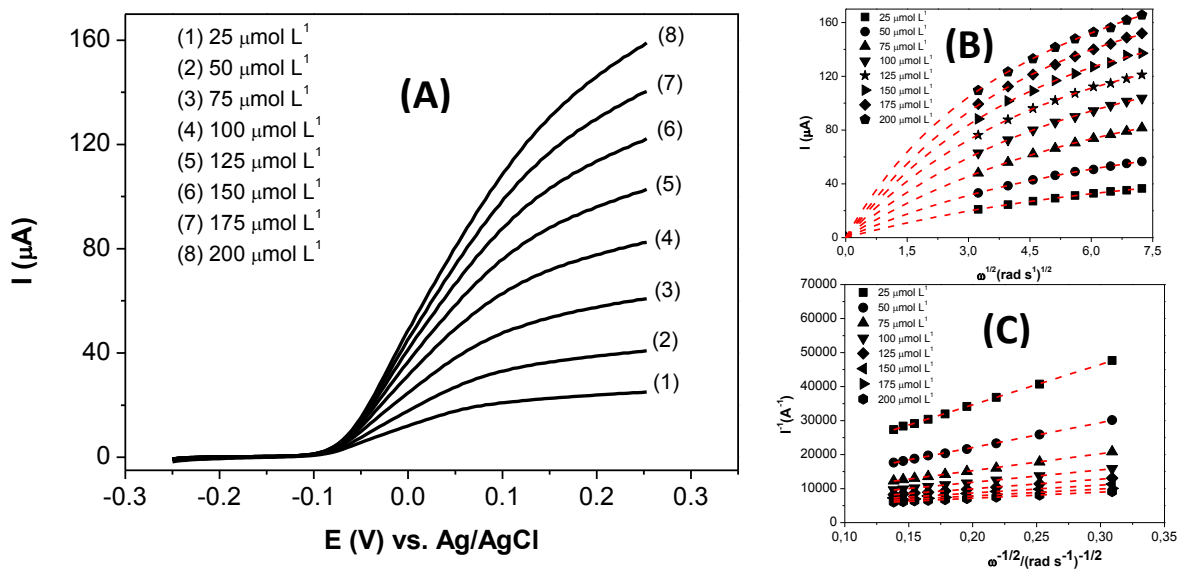
### 3.3. Rotating disc electrode studies

Rotating disk electrode measurements were performed for quantification of the kinetic parameters corresponding to the electrocatalytic oxidation of AA, using MWCNT/poly-XA/GCE. For this purpose, the catalytic currents were recorded at various rotation speeds for different AA concentrations (Figure 5A). It is well known that Koutecky-Levich equation can be used to determine the rate constant,  $k_{\text{cat}}$  for the catalytic reaction between the oxidized mediators and AA and is formulated as follows:

$$\frac{1}{I} = \frac{1}{nFAk_{cat}\Gamma[AA]} + \frac{1}{0.62nFAD^{2/3}\nu^{-1/6}[AA]\omega^{1/2}} \quad (3)$$

where  $n$  is the number of transferred electrons,  $F$  is the Faraday constant,  $A$  is the electrode area ( $\text{cm}^2$ ),  $\Gamma$  is the total surface coverage of the catalyst ( $\text{mol}/\text{cm}^2$ ),  $\omega$  is the electrode rotation speed ( $\text{rad}/\text{s}$ ),  $D$  is the diffusion coefficient ( $2.73 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ ),  $[AA]$  is the substrate concentration ( $\text{mol}/\text{cm}^3$ ), and  $\nu$  is the kinematic viscosity ( $0.01 \text{ cm}^2/\text{s}$ ).

From the above equation, the value of  $k_{cat}$  can be determined from the intercept of  $I^{-1}$  versus  $\omega^{-1/2}$  plots, which is called Koutecky-Levich plots (Figure 5C). The  $k_{cat}$  values were evaluated from the intercepts of Koutecky-Levich plots at infinite rotation speed, on the basis of the known number of electrons (2) and the surface coverage ( $\Gamma$ ), for different AA concentrations. The mean value for  $k_{cat}$  in the concentration range 25-200  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , was found to be  $2.3 \times 10^6 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . This result is close to those obtained from chronoamperometric experiments. It can be noted that the present  $k_{cat}$  value is higher when compared to the previously published values for other chemically modified electrodes [28, 29].



**FIGURE 5** - (A) Rotating disk voltammograms for AA oxidation at various rotation speeds on MWCNT/poly-Xa/GCE in PBS  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7.0, scan rate:  $5 \text{ mV s}^{-1}$ . (B) Levich plots for the catalytic oxidation of AA at the modified electrode with various concentrations. (C) Koutecky–Levich plots derived from data of (B).

### 3.4. Amperometric detection of AA and UA

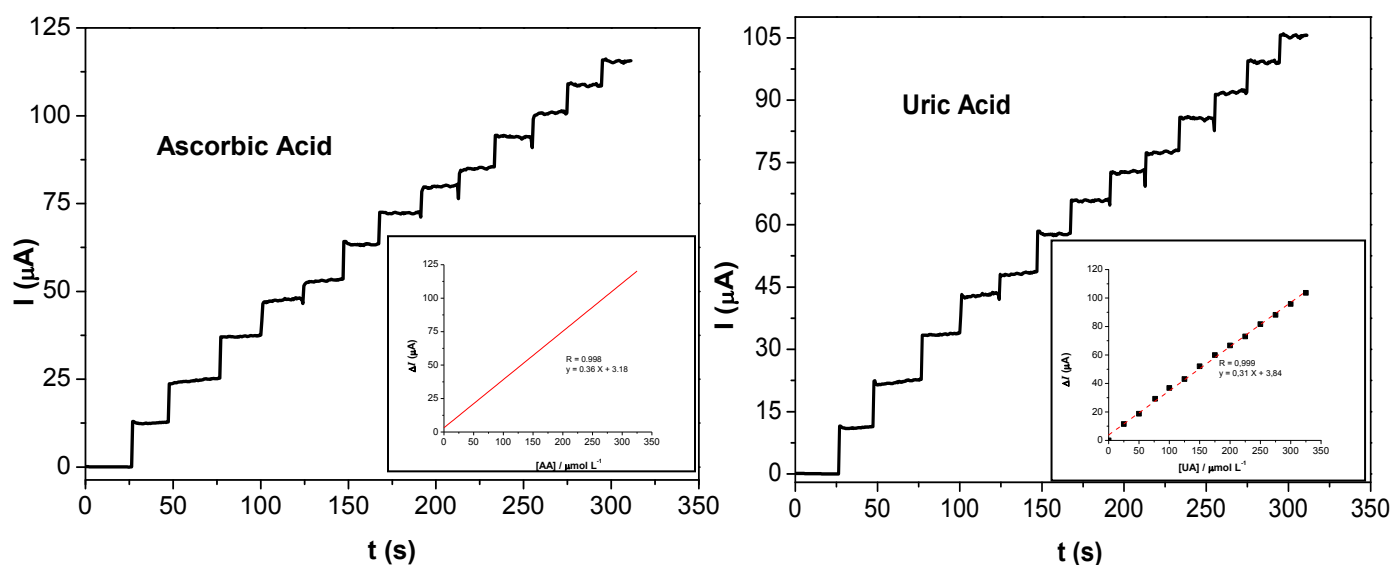
Amperometry under stirred conditions has a much higher current sensitivity than cyclic voltammetry. Thus, the pulsed potential amperometric detection was used for this purpose. The method is based on the application of multistep potential-time waveforms to manage the sequential analytical process as earlier reported [18]. For AA and UA oxidations, it was carried out simultaneous at  $E_1=50 \text{ mV}$  and  $E_2 = 350 \text{ mV}$  versus Ag/AgCl, respectively (at  $E_1 = 50 \text{ mV}$ , there is oxidation of AA). However, at  $E_2 = 350 \text{ mV}$ , both oxidations of AA and UA occurs. For that reason, to obtain the liquid amperogram or UA analytical curve, in other words, without the contribution of the oxidation current of AA, it is necessary to subtract the currents of the amperograms

between  $E_2$  and  $E_1$ ), at different concentrations in  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  phosphate buffer at pH 7.0, after optimizing the experimental parameters (Fig. 6A and 6B for AA and UA, respectively). The proposed sensor showed a linear response range from 25.0 up to  $325.0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  (insert of Fig. 6A and 6B) for AA and UA, which can be expressed according to the following equation:

$$\Delta I (\mu\text{A cm}^{-2}) = 3.18(\pm 0.2) + 0.36(\pm 0.1) [\text{AA}] / \mu\text{mol L}^{-1} \quad (4)$$

$$\Delta I (\mu\text{A cm}^{-2}) = 3.84(\pm 0.5) + 0.31(\pm 0.1) [\text{UA}] / \mu\text{mol L}^{-1} \quad (5)$$

with a correlation coefficient of 0.998 (for  $n = 12$ ) and 0.999 (for  $n = 12$ ) for AA and UA, respectively, with low potential, better sensitivity, detection limits and  $k_{cat}$  than those reported in the literature and listed in Table 1. The modified electrode has large peak potential separation combined with high catalytic rate constant and high sensitivity. Such good sensitivity of  $0.36 \text{ } \mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$  and  $0.31 \text{ } \mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$  can be attributed to the efficiency of the electron transfer between poly-XA and AA. A limit of detection (LOD) of  $0.19 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  and  $0.31 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  for AA and UA were determined using a  $3\sigma/\text{slope}$  ratio, respectively, and limits of quantification (LOQ) were  $0.64 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  and  $1.03 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  for AA and UA, respectively, using  $10\sigma/\text{slope}$ , where  $\sigma$  is the standard deviation of the mean value for ten amperograms of the blank, determined according to the IUPAC recommendations [35].



**FIGURE 6** - Amperometric measurements combined with pulsed potential for the simultaneous determination of AA and UA at  $E_1 = 0.050$  V (A) and  $E_2 = 0.350$  V (B) vs. Ag/AgCl, respectively, on the activated MWCNT/poly-Xa/GCE obtained in  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  phosphate buffer solution at pH 7.0. The insets are the respective analytical curves.

After the polymerization of Xa on the MWCNT/GCE, the stability of the redox couple was checked performing successive amperometric measurements in the presence of  $50.0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  AA and UA in  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  phosphate buffer solution at pH 7.0. After 100 determinations, no significant change was observed in the response of the modified electrode. When the modified electrode was stored at room temperature, no significant change in the response was observed for at least 3 months. The modified electrode presents a good repeatability for AA and UA determination. The relative standard deviation (R.S.D.) for 10 determinations of  $50.0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  AA and UA was 4.3%. Additionally, a series of 10 sensors prepared in the same manner, tested at phosphate buffer (pH 7.0) containing  $50.0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  AA and UA gives responses with a relative



standard deviation lower than 5.0%, indicating a good repeatability in the electrode preparation.

### *3.5 Samples analysis and recovery tests*

The proposed method was applied for simultaneous determination of AA and UA in three urine samples and determination of AA in vitamin C tablet in triplicate using the standard addition method. To fit into the linear range of AA and UA determination, all the urine samples were diluted 50 times; this dilution can actually help in reducing the matrix effects of real samples. To check the correctness of the results, the samples were spiked with standard solutions of UA and AA and then the total amounts were detected. The recovery values of the spiked samples were determined to be between 99.1% and 100.6% (Table 2).

A tablet of vitamin C (1.0 g per tablet) was first dissolved in 100 mL 0.1 mol L<sup>-1</sup> PBS (pH 7.0). After filtration, the AA solution was transferred into 200 mL measuring flask and diluted to the mark with 0.1 mol L<sup>-1</sup> PBS (pH 7.0), thus a AA solution with content of  $2.84 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> was obtained. Then 50  $\mu$ L of the sample solution were placed into the electrochemical cell (5 mL) using amperometric detection combined with pulsed potential. The average determination result of AA in tablet was 0.98 g per tablet, which is in agreement with the nominal value. This determination procedure was repeated five times and the relative standard deviation was 3.5%.

**Table 1** - Comparison of the analytical performance of the current strategy with reported CME proposed for the determination of AA.

Electrode	Modifier	pH	$E_{pAA}$ (V)	$E_{pUA}$ (V)	$\Delta E_p$ (V)	Linear Range ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Limit of Detection ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Sensitivity ( $\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$ )	$k_{cat}$ ( $\text{M s}^{-1}$ )	References
CP	4-nitrophthalonitrile	7.0	0.150	0.400	0.250	5 – 120	1.6	0.54	$6.0 \times 10^6$	[18]
Au	Gold nanoparticles	7.2	0.450	0.700	0.250	–	0.05	–	–	[30]
Au	1,6-Hexanedithiol	7.0	0.27	0.450	0.180	1.0 – 110	1.0	–	–	[31]
Pt	Polypyrrole/Naphthol green B	4.5	0.32	–	–	240 – 25,000	–	0.007	$4.4 \times 10^3$	[32]
GC	Polycalconcarboxylic acid	6.0	0.090	0.390	0.300	1.0 – 500	0.5	–	–	[33]
GC	Ferricyanide with polyelectrolyte – calcium carbonate microsphere	7.0	0.270	–	–	1.0 – 2,143	0.7	0.004	–	[34]
GC	Cobalt film	8.0	0.400	–	–	0.3 – 100	0.2	0.04	–	[35]
CP	Mesoporous silica	7.0	0	0.250	0.250	40 – 4000	10.0	0.05	–	[36]
GC	Polypyrrole/ferrocyanide	7.0	0.050	–	–	450 – 9,620	58.2	3.7	$4.7 \times 10^3$	[37]
GC	MWCNT/poly-XA	7.0	0.050	0.350	0.300	25 - 325	0.19	0.36	$2.3 \times 10^6$	This work

CP: carbon paste, GC: glass carbon

**Tabela 2** - Determination of AA and UA in urine samples.

	Samples					
	Urine #1		Urine #2		Urine #3	
	UA	AA	UA	AA	UA	AA
Detected <sup>a</sup> ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	51.3	24.5	48.7	26.1	52.8	25.4
Spiked ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
After spike <sup>a</sup> ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	100.5	74.1	99.1	76.6	102.7	75.5
Recovery (%)	99.1	99.4	100.3	100.6	100.2	100.1
R.S.D. <sup>b</sup> (%)	1.8	2.3	3.1	2.8	2.9	2.4

<sup>a</sup>Number of samples assayed, 3. <sup>b</sup>Relative standard deviations.

#### 4. Conclusions

These studies demonstrate that the MWCNT/poly-Xa/GCE is a feasible alternative for the analytical determination of AA and UA in urine and tablet samples. Furthermore, the kinetic process of the catalytic reaction can be explained using cyclic voltammetry, RDE voltammetry and chronoamperometry. The oxidation peak potentials of AA and UA were successfully separated, with  $\Delta E_p = 300$  mV (vs. Ag/AgCl), which allowed a simple and simultaneous analyses of both substances.

The values obtained for the rate constant  $k_{\text{cat}}$  by the two different approaches are in good agreement. The measured  $k_{\text{cat}}$  value is among one of the highest so far reported. This work demonstrates that the present modified glass carbon electrode is a sensitive and robust sensor, useful for the rapid determination of AA, due to its stability, selectivity, low detection limit, catalytic effect and no electrode surface fouling by the

oxidation product, showing great potential for AA and/or UA determinations. It opens the possibility for other important applications and for studies in biological fluids.

## 5. Acknowledgements

The authors thank the financial support from the, FAPEAL, CAPES/PNPD, CNPq, PROCAD/NF and INCT-Bionalítica.

## 6. References

- [1] L. Agui, C. Pena-Fartal, P. Yanez-Sedeno, J. M. Pingararrom, *Talanta* 74 (2007) 412.
- [2] H. Refsum, P.M. Ueland, O. Nygard, S.E. Vollset, *Annu. Rev. Med.* 49 (1998) 31.
- [3] D.A. Cramer, *Lab. Med.* 29 (1998) 410.
- [4] O. Arrigoni, C.D. Tullio *Biochim. Biophys. Acta* 9 (2002) 11569.
- [5] E. Popa, Y. Kubota, D.A. Tryk, A. Fujishima, *Anal. Chem.* 72 (2000) 1724.
- [6] J.M. Zen, J.J. Jou, G. Ilangovan, *Analyst* 23 (1998) 1345.
- [7] B.J. Wyngaarden, N.W. Kelly, *Gout and Hyperuricemia, Grune and Stratton*, NewYork 1974.
- [8] R.T. Kachoosangi, C.E. Banks, R.G. Compton, *Electroanalysis* 18 (2006) 741.
- [9] X. Lin, Y. Li, *Electrochimica Acta* 21 (2006) 5794.
- [10] M.A. Gilmartin, J.P. Hart, B. Birch, *Analyst* 117 (1992) 1299.
- [11] C.P. Andrieux,, J.M. Saveant, *J. Electroanal. Chem.* 93 (1978) 163.
- [12] H.R. Zare,, N. Nasirizadeh,, M. Mazloun Ardakani, *J. Electroanal. Chem.* 25 (2005) 577.
- [13] M.H. Pournaghi-Azar, H. Razmi-Nerbin, *J. Electroanal. Chem.* 17 (2000) 488.
- [14] P.V. Loannou, M.G. Siskos, *Appl. Organometal. chem.* 15 (2001) 511.

- [15] A.S.N. Murthy, J. Sharma, *Talanta* 45 (1998) 951.
- [16] G. Moreno, F. Pariente, E. Lorenzo, *Anal. Chim. Acta* 29 (2000) 420.
- [17] Z. Galus, *Fundamentals of Electrochemical Analysis*, Ellis Horwood Press, New York 1976, p. 313.
- [18] P. R. Lima, P. R. B. Miranda, A. B. Oliveira, M. O. F. Goulart, L. T. Kubota, *Electroanalysis* 21 (2009) 2311.
- [19] P.R. Lima, W.J.R. Santos, R. de C.S. Luz, F.S. Damos, A.B. Oliveira, M.O.F. Goulart, L.T. Kubota, *J. Electroanal. Chem.* 612 (2008) 87.
- [20] P.R. Lima, W.J.R. Santos, A.B. Oliveira, M.O.F. Goulart, L.T. Kubota, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 479 (2008) 758.
- [21] P.R. Lima, W.J.R. Santos, A.B. Oliveira, M.O.F. Goulart, L.T. Kubota, *Biosensors and Bioelectronics* 24 (2008) 448.
- [22] P. Abiman, G.G. Wildgoose, R.G. Compton, *Electroanalysis* 19 (2007) 437.
- [23] F.D. Munteanu, N. Mano, A. Kuhn, L. Gorton, *J. Electroanal. Chem.* 564 (2004) 167.
- [24] F. A. S. Silva, C. B. Lopes, E. O. Costa, P. R. Lima, L. T. Kubota, M. O. F. Goulart, *Electrochemistry Communications* 12 (2010) 450.
- [25] W. Zhang, T. Yang, K. Jiao, *Biosensors and Bioelectronics* 31 (2012) 182.
- [26] M. Santhiago, P.R. Lima, W.de J.R. Santos, A.B. de Oliveira, L.T. Kubota, *Electrochimica Acta* 54 (2009) 6609.
- [27] A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*, Wiley, New York 2001, p. 718.
- [28] G. Moreno, F. Pariente, E. Lorenzo, *Anal. Chim. Acta* 29 (2000) 420.
- [29] Z. Galus, *Fundamentals of Electrochemical Analysis*, Ellis Horwood Press, New York 1976, p. 313.
- [30] S.S. Kumar, S.S. Narayanan, *Chem. Pharm. Bull.* 54 (2006) 963.

- [31] A. Sivanesan, P. Kannan, S.J. Abraham, *Electrochimica Acta* 52 (2007) 8118.
- [32] M. Alireza, A.T. Mohammad, *Sensors Actuators B* 123 (2007) 733.
- [33] A.L. Liu, S.B. Zhang, W. Chen, X.H. Lin, X.H. Xia, *Biosensors Bioelectronics* 23 (2008) 1488.
- [34] F. Li, C. Tang, L. Shufeng, M. Guangran, *Electrochimica Acta* 55 (2010) 838.
- [35] L. Tian, J. Bian, B. Wang, Y. Qi, *Electrochimica Acta* 55 (2010) 3083.
- [36] D. Sun, Y. Zhang, F. Wang, K. Wu, J. Chen, Y. Zhou, *Sensors and Actuators B* 141 (2009) 641.
- [37] J.-B. Raoof, R. Ojani, S. Rashid-Nadimi, *Electrochimica Acta* 49 (2004) 271.

## 5A VERY LOW POTENTIAL ELECTROCHEMICAL DETECTION OF L-CYSTEINE BASED ON A GLASSY CARBON ELECTRODE MODIFIED WITH MULTI-WALLED CARBON NANOTUBES/GOLD NANORODS

Francisco de Assis dos Santos Silva<sup>a,d</sup>, Monique Gabriella Angelo da Silva<sup>a</sup>, Phabyanno Rodrigues Lima<sup>a,b,d</sup>, Mario Roberto Meneghetti<sup>a</sup>, Lauro Tatsuo Kubota<sup>c,d</sup>,  
Marília Oliveira Fonseca Goulart<sup>a,d\*</sup>

<sup>a</sup>*Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, 57072-970  
Maceió, AL, Brazil*

<sup>b</sup>*Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Alagoas, IFAL, 57020-600  
Maceió-AL, Brazil*

<sup>c</sup>*Instituto de Química, UNICAMP, C. Postal 6154, 13084-971 Campinas, SP, Brazil*

<sup>d</sup>*Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Bioanalítica, UNICAMP, C. Postal  
6154, 13084-971 Campinas, SP, Brazil*

---

\*Corresponding author. Tel.: +55 82 3214-1393; fax: +55 19 3214-1389  
E-mail address: [mariliaofg@gmail.com](mailto:mariliaofg@gmail.com) (M. O. F. Goulart)

## Abstract

A nanohybrid platform built with multi-walled carbon nanotubes and gold nanorods, prepared via a surfactant-containing seed-mediated sequential growth process; in aqueous solution, on a glassy carbon substrate has been successfully developed to be used in the electrocatalytic oxidation of *L*-cysteine (Cys). The nanohybrid was characterized by transmission electron microscopy, Raman spectroscopy and electrochemical measurements. Cyclic voltammetry results showed that the modified electrode allowed the oxidation of Cys at a low potential (0.00 V *versus* Ag/AgCl). The kinetic constant  $k_{\text{cat}}$  for the catalytic oxidation of Cys was evaluated by chronoamperometry and provided a value of  $5.6 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . The sensor presented a linear response range from 5.0 up to 200.0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , detection limit of 8.25  $\text{nmol L}^{-1}$  and a sensitivity of 120  $\text{nA L } \mu\text{mol}^{-1}$ .

**Keywords:** Gold nanorods; MWCNT; *L*-cysteine; Electrocatalysis; Chemically Modified Electrodes.



## 1. Introduction

The design of multifunctional nanostructures has attracted the imagination and efforts of many researchers in the last few years. The combination of two (or more) types of materials, such as carbon nanotubes (CNTs) and gold nanoparticles might add new functionalities or extend the practical applications of these nano-objects. CNTs are the ideal building blocks for molecular nanoelectronics and very strong materials, already incorporated into light reinforced composites. On the other hand, noble metal nanostructures, such as gold or palladium nanoparticles (AuNPs and PdNPs), are of general interest mainly due to their remarkable high catalytic activity and their special electronic and optical properties. The technological perspectives of the hybrid structures formed by these materials in electrochemical sensing have attracted a widespread interest in the scientific community. Several groups have successfully synthesized hybrids of AuNPs on the surface of CNTs. They have mostly used covalent linkage through bifunctional molecules (Sainsbury et al., 2005; Raghuvver et al., 2006 ; Hu et al., 2005), while others have prepared hybrids taking advantage of electrostatic interaction between a polyelectrolyte layer absorbed on the nanotubes wall and charged gold nanoparticles (Kim and Sigmund, 2005). These new Au-CNT structures could be employed in optoelectronic devices as well as in biomedicine, allowing the possibility to carry and selectively deliver, into the body, different therapeutic drugs (Ou and Huang, 2006; Tello et al., 2008; Li et al., 2006), or by using them in combination with electromagnetic irradiation to provoke localized heating which could eventually destroy surrounding cancer cells (Khaled et al., 2005). In this contribution, the results of the preparation and electrochemical characterization of hybrid nanostructures composed by gold nanorods and multi-walled carbon nanotubes by using a simple non-covalent synthetic route are presented as well as its use for the quantitative analysis of cysteine,

alone and in the presence of other biologically relevant antioxidants, like thiols, uric and ascorbic acids.

## 2. Experimental

### 2.1. Chemicals and solutions

All the chemicals were of analytical grade and used as received, with no further purification. Multi-walled carbon nanotubes (MWCNT >98% carbon basis, O.D.  $\times$  L 6-13 nm  $\times$  2.5-20  $\mu$ m, lote MKBF1048V), chloroauric acid ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 99.9%, *L*-cysteine (Cys), *DL*-homocysteine, *L*-glutathione, *L*-ascorbic acid and uric acid were acquired from Sigma - Aldrich (St. Louis, USA). Sodium borohydride ( $\text{NaBH}_4$ , > 98%, Acros Organics, cetyltrimethylammonium bromide (CTAB, > 99%, Acros Organics), silver nitrate (> 99%, Reagen) and ethanol (96%, Dinamica) were also used, as received. The glassware was cleaned with aqua regia and/or rinsed with Milli-Q water prior to the experiments and all the solutions were freshly prepared prior to each experiment.

### 2.2. Gold Nanorods Syntheses

Gold nanorods were prepared via a surfactant-containing seed-mediated sequential growth process, in aqueous solution; seed nanoparticles with average size between 3.5 – 4.0 nm are prepared from Au (III) source ions from the metal precursor  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , in the presence of a strong reducing agent, such as  $\text{NaBH}_4$ . Briefly, 2.5 mL of CTAB 0.20 mol L<sup>-1</sup> were poured into 5 mL of an aqueous solution of 0.5 mmol L<sup>-1</sup>  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , which produced a dark yellow color. After that, 0.6 mL of ice-cold  $\text{NaBH}_4$  0.01 mol L<sup>-1</sup> solution was added, and the resulting solution was subsequently stirred for two minutes. In the presence of CTAB, Au (III) is reduced to Au (0), producing a brownish color, indicative of seed nanoparticles formation. The solution

was cooled to room temperature and used immediately for all experiments. It is stable for three days. The growth solution was prepared with a slight modification from previously reported procedure (Murphy et al., 2005). In a tubular glass containing 5 mL of an aqueous solution of  $1.0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ H AuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 2.5 mL of an aqueous solution of  $0.20 \text{ mol L}^{-1} \text{ CTAB}$  were added. The solution became dark yellow as metallic gold. After that, 0.150 mL of  $0.004 \text{ mol L}^{-1} \text{ AgNO}_3$  solution was added, followed by the final addition of 0.070 mL of a weak reducing agent,  $0.0788 \text{ mol L}^{-1}$  ascorbic acid, which led to a color modification from brown-yellow to colorless, suggesting that the Au(III) complexes were initially reduced to aqueous Au(I) anions. Finally, under magnetic stirring, 0.012 mL of seed nanoparticles solution was added to the freshly prepared growth solution (Murphy et al., 2005). After 10 s, this solution was kept at room atmosphere for the following studies. Spherical gold nanoparticles were synthesized as reported (Brust et al., 1994), and their size and shape were characterized by UV-Vis and TEM.

### 2.3. Construction of the sensors

GCE (3 mm in diameter) was manually polished with alumina powder ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ , 1  $\mu\text{m}$ ) and rinsed with Milli-Q water. After cleaning the electrode, a suspension was prepared by sonication, mixing 1.0 mg of MWCNT in 1 mL of DMF. Then 10  $\mu\text{L}$  of this suspension were deposited directly on the GCE surface and dried at  $80^\circ\text{C}$  to form a MWCNT layer on the GCE surface (MWCNT/GCE). After that, 10  $\mu\text{L}$  of the gold nanorods solution were directly added on the MWCNT/GCE, and dried at  $80^\circ\text{C}$ .

### 2.4. TEM, UV-Vis/near-IR, Raman and Electrochemical Characterization

Transmission Electron Microscopy - TEM measurements on a Microscope FEI 200 kV, model Tecnai 20, issue LAB6 or W, EDAX module, module Xplore 3D

tomography, support of heating control, point resolution of 0.2 nm and line resolution of 0.1 nm, with magnification of 1 million times. The samples were prepared with a drop of the gold nanorods solution on a copper grid (200 mesh), coated with CNT film at least 24 h before analysis, kept in a desiccator, to be dried.

The analyses of UV-Vis/near-IR measurements were performed on a Varian Model Cary 50 Scan UV-Vis/near-IR spectrophotometer. The setup was configured to fix the baseline of deionized water absorption band from 400 to 1000 nm, using quartz cells with path length of 1 cm. The Raman spectra were obtained in a Renishaw inVia Raman Microscope with laser of 785 nm and using a glassy carbon plate as support.

The electrochemical measurements were performed in an Echo Chemie Autolab PGSTAT-30 potentiostat (Utrecht, The Netherlands). All the measurements were run using an electrochemical cell with three electrodes, with an Ag/AgCl, Cl<sup>-</sup> 0.1 mol L<sup>-1</sup> electrode as reference, a Pt wire as auxiliary and an unmodified or modified glassy carbon, in the latter case, with MWCNT/GCE and AuNR/MWCNT/GCE as working electrodes. The actual surface area (0.091 cm<sup>2</sup>) of the AuNR/MWCNT/GCE electrode was estimated as reported before (Silva et al., 2012).

### 2.5. Real sample analysis

The standard addition technique was used for the determination of Cys in human serum samples according with references (Wu et al., 2012; Kannan and John, 2011). Briefly, the blood samples were obtained from healthy volunteers in the Nutrition Faculty, Universidade Federal de Alagoas. After collected, the samples were centrifuged for 5 min at 5000 rpm and 10 °C, then, the serum was separated and stored in a biofreezer at -80 °C until use. A sample volume of 50 µL of the serum sample was diluted to 5 ml with 0.1 mol L<sup>-1</sup> PBS (pH 7.0), to perform the analysis.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Sensor characterization

The sensor was prepared by a simple deposition process. As demonstrated previously by Compton and coworkers, the hydrophobic chain of the surfactant can essentially interact with the sidewalls of the nanotubes through hydrophobic interaction and thereby anchor the surfactant molecules onto the MWCNTs, leaving the hydrophilic head groups intervening into solution (Yang et al., 2010). Prepared gold nanorods have a bilayer of CTAB, which provides the surface of nanorods with a positive effective surface charge, preventing, thus, the aggregation of nanorods in water via electrostatic repulsion (Murphy et al., 2005). Both interactions of the surfactant with MWCNT and with the gold nanorods allow the hybrid material formation by a non-covalent interaction using the CTAB as a linking material. This electrode configuration was analysed and confirmed by transmission electron microscopy (Figs. 1A-D), Raman spectroscopy (Fig. 1E) and cyclic voltammetry (Fig. 2).

Raman spectra of MWCNT with 0  $\mu\text{L}$  (i), 5  $\mu\text{L}$  (ii) and 10  $\mu\text{L}$  (iii) of AuNR are shown in Figure 1(E). Upon the deposition of AuNR onto MWCNT, both spectra patterns and relative intensities of *G* and *D* bands undergo slightly changes. First-order Raman spectra of MWCNT show a strong band at 1580  $\text{cm}^{-1}$  (*G* mode), a Raman-allowed phonon high-frequency mode, and a disordered-induced peak appeared at 1355  $\text{cm}^{-1}$  (*D* mode) that may be originated from defects in the curved graphene sheets and tube ends (Yeh et al., 2009; Mathur et al., 2010). The comparison of the  $I_G/I_D$  ratios of the samples, which are 1.57 for MWCNT, 1.13 for MWCNT with 5.0  $\mu\text{L}$  of AuNR and 0.89 for MWCNT with 10  $\mu\text{L}$  of AuNR reveals that the increase of the denominator *D*-band,  $I_G/I_D$  ratio decreases due to the attachment of AuNR on the surface of the

MWCNT. The successful modification of the electrode was also confirmed by TEM studies. Micrographs of AuNR and MWCNT alone are shown in figures 1(A) and 1(B), respectively. Figure 1(C) represents the modified surface, where AuNRs are on the MWCNT walls [darker points, Figure 1(C)], more evident after magnification [insert, Fig. 1 (D)].

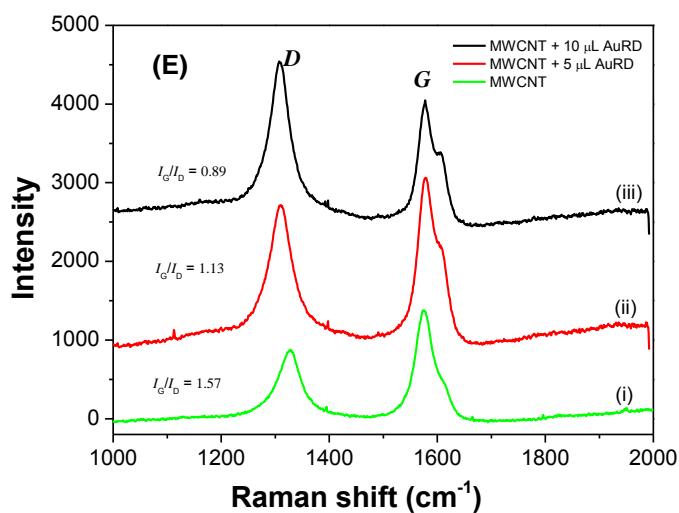
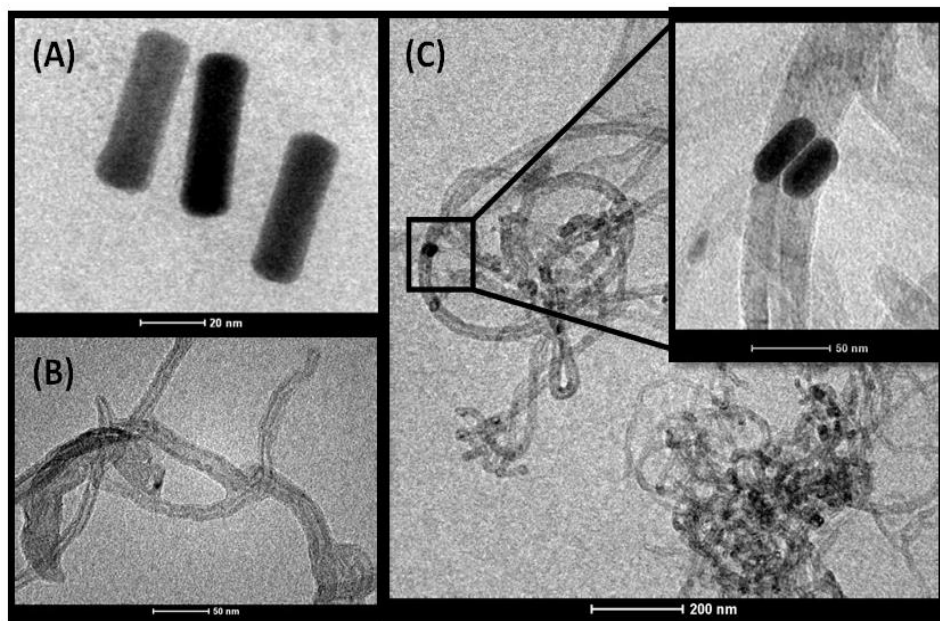


Figure 1 – TEM images for AuNR (A), MWCNT (B) and AuNR on MWCNT (C) and (D) Raman spectra (E) of MWCNT (i), MWCNT with 5  $\mu$ L (ii) and 10  $\mu$ L (iii) of AuNR.

### 3.2 Active surface area and gold amount determination.

The real area of a metal surface equals the geometrical area defined by its boundaries only if it is an atomically flat plane, which is not the case for electrodes that are microscopically rough, as in our case. As the roughness increases, more surface area is exposed within the same geometrical enclosure. The ratio between the real, electrochemically active area of an electrode and its geometrical area is therefore called the roughness factor of the electrode (Kleijn et al., 2012).

An electrochemical experiment was used to determine the amount of gold on the modified AuNR/MWCNT. For that, an oxygen adsorption measurement was chosen as a simple in-situ method to obtain an estimative for the microscopic surface area. The method comprises oxygen chemisorption onto the gold surface in an anodic potential scan. The oxide coverage is dependent on the crystallographic orientation, anodic potential limit, and anodization time, but it is generally assumed to be reproducible if the same procedure is used under the same conditions. The amount of surface oxide formed can be measured by integration of the gold oxide reduction peak in a cathodic scan (Figure 2A) (Trasatti and Petrii, 1991). Usually, calculations of the real surface area, commonly expressed as a roughness factor, are based on the assumption that a monolayer of chemisorbed oxygen with a gold:oxygen ratio of 1:1 has been formed. The minimum current that follows the gold oxidation peak in the voltammogram is usually taken as an indication that a monolayer coverage is reached (Hoogvliet et al., 2000). The exact value of the corresponding charge required for the reduction of this monolayer depends on the composition of the exposed crystalline planes. The area under the gold oxide peak in the second scan (gold oxide charge  $Q_{AuO}$ ) expressed in  $\mu\text{C cm}^{-2}$  of geometric surface area was taken as an estimation of the gold amount in the surface. A value of  $940 \mu\text{C cm}^{-2}$  has been found to the gold bare electrode and  $310 \mu\text{C}$

$\text{cm}^{-2}$  to the modified electrode. Understanding the electrochemical behavior of gold surface is essential to understanding and predicting the response of the electrodes. Electrodes of this nature generally are either treated as rough electrodes or they are treated as porous electrodes (Metz et al., 2012).

The very high surface area provided by AuNR coating leads to interesting properties that could potentially be useful for applications such as energy storage in electrochemical double-layer capacitors and as catalytic material (Metz et al., 2012).

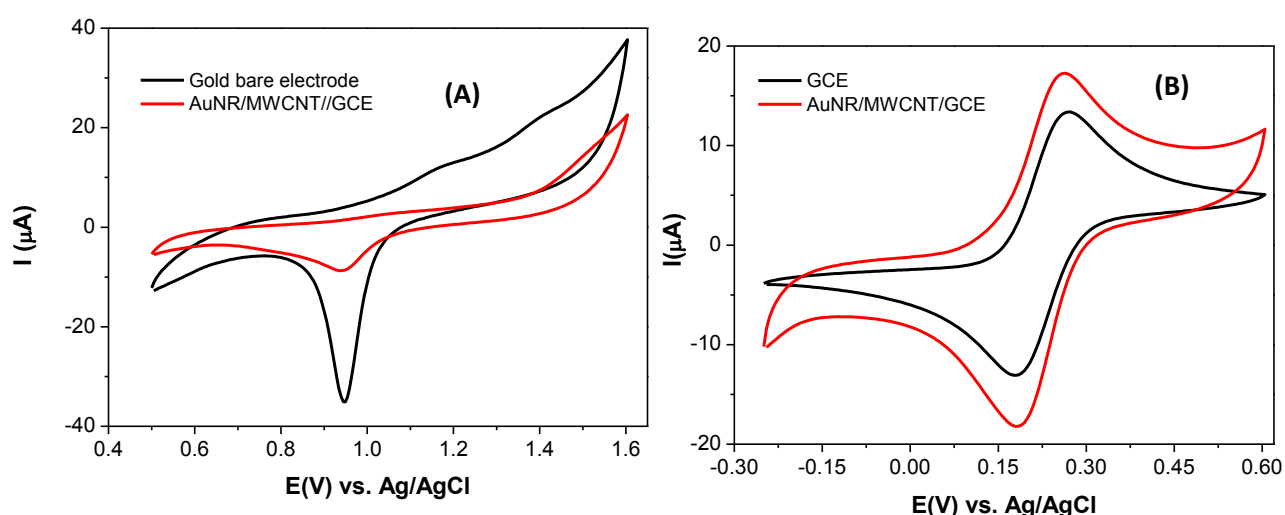


Figure 2 – (A) Cyclic voltammograms of a gold bare electrode and the AuNR/MWCNT/GCE in 0.5 mol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. (B) Cyclic voltammograms of 1.0 mmol L<sup>-1</sup> [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> in 0.1 mol L<sup>-1</sup> KCl with the bare glass electrode and with AuNR/MWCNT/GCE.

### 3.3. Electrocatalytic activity of the nanohybrid sensor

In order to investigate the effect of AuNR/MWCNT/GCE for electrocatalysis of Cys, cyclic voltammograms were performed after each step of the modification procedure. The process associated to the electrochemical oxidation of Cys is illustrated in Fig. 3 by cyclic voltammograms in a solution of 50 μmol L<sup>-1</sup> Cys in 0.1 mol L<sup>-1</sup> PBS



at pH 7.0, with different electrodes. As can be observed in Fig. 3(A), with the unmodified GCE, the oxidation of Cys occurs at very high positive potential with a small increment of current. On MWCNT/GCE modified electrode (Fig. 3B) there is a decrease of the oxidation potential of Cys due to electrocatalytic activity of CNT (Zhang et al., 2006). After the addition of the AuNR (Fig. 3D), a drastic decrease of the oxidation potential was observed (anodic peak centered at 0 V vs. Ag/AgCl) showing the electrocatalytic efficiency of AuNR/MWCNT. The modification of the glassy carbon electrode only with AuNR is not possible once there is a lack of interaction between them, resulting in a leaching process. Another important factor is the shape of the nanoparticles, once the electrocatalytic activity is not observed in the modified electrode with spherical nanoparticles (Fig. 3C). These results indicated the good catalytic ability of AuNR towards the oxidation of Cys combined with the high surface area of MWCNT. This catalytic ability can be attributed to the rod forms of AuNR. The presence of a bilayer of CTAB provides the surface of nanorods with a positive effective surface charge, which prevents the nanorods aggregation in water, via electrostatic repulsion (Alkilany et al., 2012).

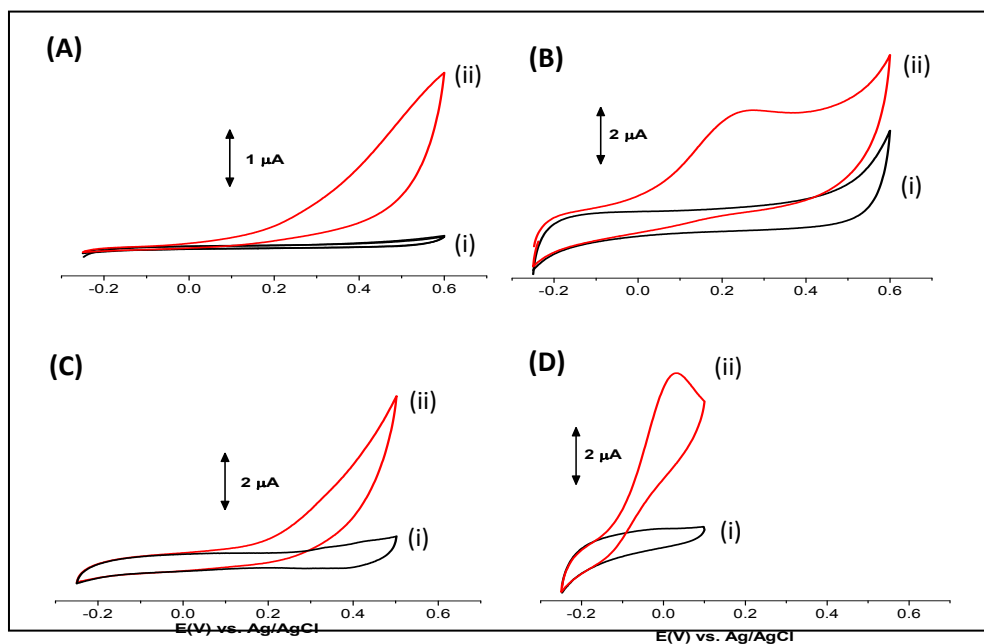


Figure 3 – Cyclic voltammograms in absence (i) and presence (ii) of  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  Cys on different electrodes (A) GCE, (B) MWCNT/GCE, (C) AuNP/MWCNT/GCE and (D) AuNR/MWCNT/GCE in  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  PBS at pH 7.0 and scan rate of  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .

### 3.4. Chronoamperometric studies

The double step chronoamperometry was applied for the investigation of the electrocatalytic process on AuNR/MWCNT/GCE. Figure 4A shows a series of well-defined chronoamperograms of AuNR/MWCNT/GCE, in absence and in presence of various concentrations of Cys. As can be observed in Figure 4A, there is no net cathodic current corresponding to the reduction of Cys, while the forward and backward potential step chronoamperograms in the absence of Cys show very symmetrical chronoamperograms with an equal charge consumed for the oxidation and reduction currents on the surface of AuNR/MWCNT/GCE.

The current increases with the addition of Cys at 0 V *vs.* Ag/AgCl and the reduction current kept unaltered at -0.200 V *vs.* Ag/AgCl. The area under each chronoamperogram was integrated (Figure 4B).

Chronoamperometry was used to estimate Cys diffusion coefficient in solution. For an electroactive compound with a diffusion coefficient  $D$ , the corresponding current of the electrochemical reaction (under diffusion control) is described by Cottrel's law (Santhiago et al., 2009).

$$I = nFAD^{1/2}C_{bulk}(\pi t)^{-1/2} \quad (1)$$

where  $D$  and  $C_{bulk}$  are the diffusion coefficient and the bulk concentration, respectively. The average value of  $D$ , obtained from the slopes of  $I$  versus  $t^{-1/2}$  plots (Figure 4C) for different concentrations of Cys, is  $2.77 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ . The catalytic rate constant ( $k_{cat}$ ) was calculated by chronoamperometry, according to the method described in (Bard and Faulkner, 2001).

$$\frac{I_{cat}}{I_L} = \pi^{1/2}(k_{cat}C_{bulk}t)^{1/2} \quad (2)$$

where  $I_{cat}$  and  $I_L$  are the currents of the AuNR/MWCNT/GCE in presence and absence of Cys, respectively,  $k_{cat}$ ,  $C_{bulk}$  and  $t$  are the catalytic rate constant, the bulk concentrations of Cys and time elapsed, respectively. Initially graphs of  $I_{cat}/I_L$  versus  $t^{1/2}$  were obtained, as can be seen in Figure 4(D). Then, the slopes of the  $I_{cat}/I_L$  versus  $t^{1/2}$  were plotted as a function of  $[\text{Cys}]^{1/2}$  (data not shown). The slope of this graph is  $420.3 \text{ s}^{-1/2} \text{ L}^{1/2} \text{ mol}^{-1/2}$ , resulting in a  $k_{cat}$  value of  $5.6 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

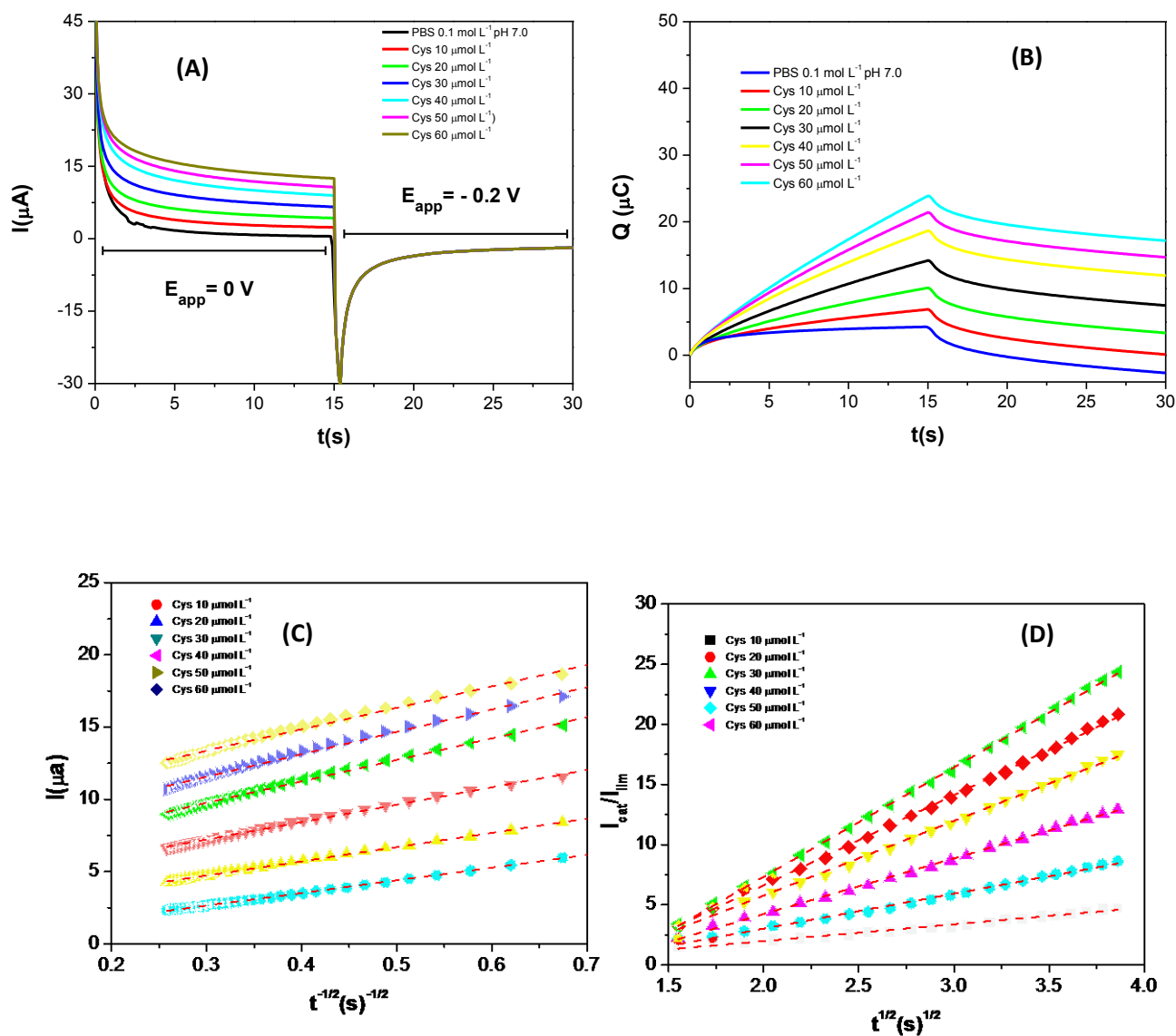


Figure 4 – (A) Chronoamperograms of AuNR/MWCNT/GCE in 0.1 mol L<sup>-1</sup> PBS at pH 7.0 in absence and in presence of various Cys concentration; (B) Integration of the chronoamperograms; (C) Plot of  $I$  vs.  $t^{-1/2}$  (D) Plot of  $I_{\text{cat}}/I_L$  vs.  $t^{1/2}$  for each Cys concentration.

### 3.5. Amperometric detection of Cys

Amperometry under stirred conditions has a much higher current sensitivity than cyclic voltammetry. Thus, the amperometric determination for Cys at different concentrations in 0.1 mol L<sup>-1</sup> phosphate buffer at pH 7.0, after optimizing the experimental parameters is shown in Figure 5A. The proposed sensor shows a linear response range from 5.0 up to 200.0 μmol L<sup>-1</sup> (Figure 5B), which can be expressed according to the following equation:

$$\Delta I(\mu\text{A}) = 0.22(\pm 0.01) + 0.12(\pm 0.01) [\text{Cys}] / \mu\text{mol L}^{-1} \quad (3)$$

with a correlation coefficient of 0.999 (for  $n = 20$ ). The modified electrode has lower oxidation potential, better sensitivity and detection limits and higher  $k_{cat}$  than those reported in the literature (Prem et al., 2012; Sattarahmady and Heli, 2011; Gea et al., 2012; Silva et al., 2012). Such good sensitivity of 220 nA L μmol<sup>-1</sup> can be attributed to the efficiency of the electron transfer between the nanohybrid – modified surface and Cys. A limit of detection (LOD) of 8.25 nmol L<sup>-1</sup> was determined using a 3σ/slope ratio and the limit of quantification (LOQ) was 67 nmol L<sup>-1</sup>, using 10σ/slope, where σ is the standard deviation of the mean value for ten amperograms of the blank, determined according to IUPAC recommendations (Tian et al., 2010).

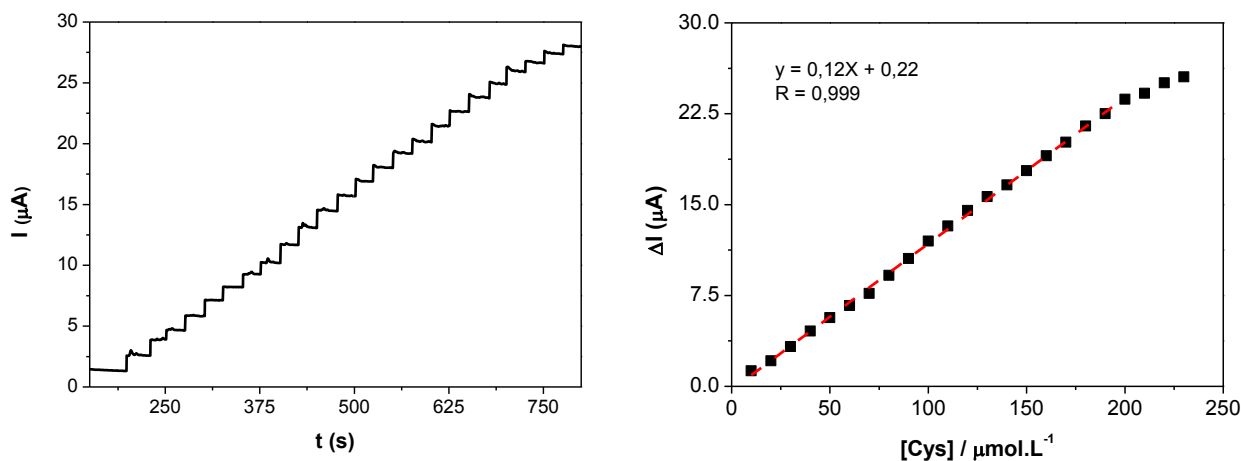


Figure 5 – (A) Amperometric response observed after successive additions of Cys stock solution in  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  PBS at pH 7.0 for AuNR/MWCNT/GCE,  $E_{\text{app}} = 0 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  and  $\omega = 100 \text{ rpm}$  (B) Analytical curve for the sensor.

The stability of the sensor was checked performing successive amperometric measurements in the presence of  $50.0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  Cys in  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  phosphate buffer solution at pH 7.0. After 50 determinations, no significant change was observed in the response of the modified electrode. When the modified electrode was stored at room temperature, no significant change in the response was observed for at least 3 months. The modified electrode presents a good repeatability for Cys determination. The relative standard deviation (R.S.D.) for 10 determinations of  $50.0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  Cys was 4.3%. Additionally, a series of 10 sensors prepared in the same manner, tested at phosphate buffer (pH 7.0) containing  $50.0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  Cys gives responses with a relative standard deviation lower than 5.0%, indicating a good repeatability in the electrode preparation.

### 3.6. Interferents study

Cys analysis is normally impaired in the presence of interfering analytes. Accordingly, the investigation has been conducted to understand the effect of

interfering analytes during Cys determination. The oxidation of Cys on AuNR/MWCNT/GCE was initiated at low anodic potential (0 V vs. Ag/AgCl), which prevents the oxidation of other electroactive thiol-containing compounds such as homocysteine, glutathione and *N*-acetylcysteine (Figure 6A). Ascorbic acid (AA), uric acid and NADH were chosen as other interfering analytes to understand their effects on Cys analysis on the present system (Fig. 6B). The results show just the AA as a interfering species once it can be also oxidized at the same potential of Cys, however this substance could be removed from the samples by adding, for instance, ascorbate oxidase (Baker, 1998). The present findings on the AuNR/MWCNT/GCE demonstrate the followings: (i) insensitivity to potential interferents, except AA (ii) short response time, less than 1 s, and (iii) justify the synergetic catalytic effect of AuNR on MWCNT.

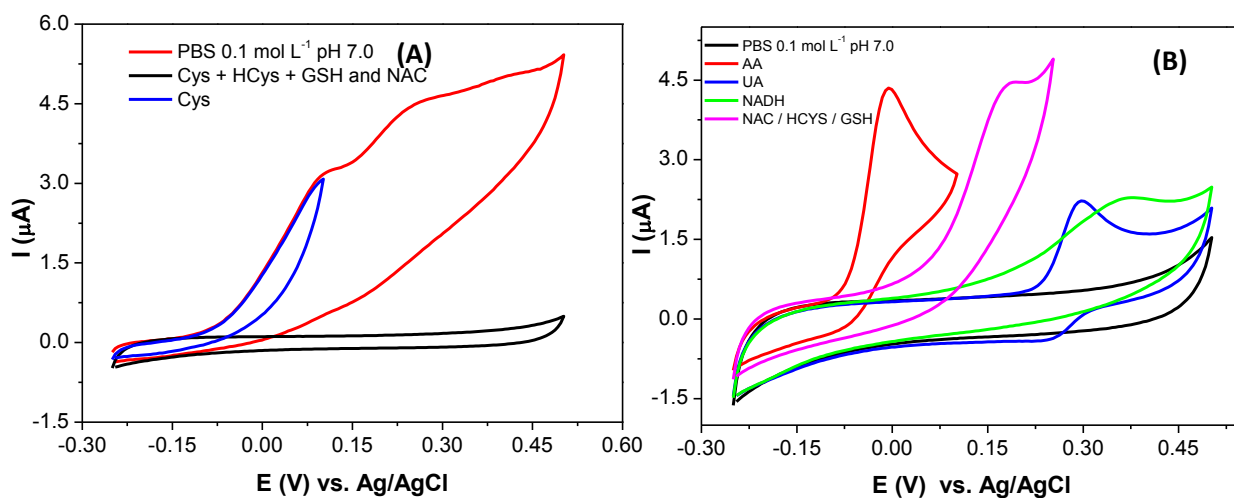


Figure 6 – (A) Cyclic voltammograms for the oxidation of Cys, glutathione, homocysteine and *N*-acetylcysteine mixture. (B) Cyclic voltammograms for the oxidation of ascorbic acid (AA), uric acid (UA), *N*-acetylcysteine (NAC) and NADH. All the experiments were performed in PBS 0.1 mol L<sup>-1</sup> pH 7.0 with 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  of the analyte and  $v = 0.005$  V s<sup>-1</sup>.

### 3.7. Real sample analysis

To examine the applicability of the present electrochemical sensor in biological samples, the determination of Cys in human serum was performed. The recovery test was also studied by spiking the serum samples with  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  of Cys into  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7.0 PBS. The results were shown in Table 1. The recoveries were from 99.7% to 100.4%, indicating that the proposed method was highly accurate. The relative standard deviation was from 2.3 to 4.2%, indicating an acceptable reproducibility.

**Tabela 1.** Determination of Cys in human blood serum samples using AuNR/MWCNT/GCE.

	Blood Serum Sample 1	Blood Serum Sample 2	Blood Serum Sample 3
<b>Original value (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	$28.2 \pm 0.1$	$30.4 \pm 0.2$	$27.8 \pm 0.1$
<b>Spike (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	50	50	50
<b>After spike (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	$78.5 \pm 0.1$	$80.2 \pm 0.1$	$77.7 \pm 0.1$
<b>Recovery (%)</b>	100.4%	99.7%	99.9%

## 4. Conclusions

In summary, an electrochemical nanohybrid sensor based on gold nanorods and multi-walled carbon nanotubes (AuNR/MWCNT/GCE) for Cys quantification was prepared. The electrochemical investigation demonstrates that the nanohybrid can provide a suitable catalytic platform for Cys, which greatly facilitated the electron-exchange between the analyte and the chemically modified electrode, increasing the sensitivity and decreasing the overpotential for its oxidation. The sensor also showed excellent antifouling and selectivity ability (except for AA) and good precision, and



could be directly applied for the selective detection of Cys in biological fluids, as demonstrated in the analyses with human serum. Using miniaturization techniques, the strategy may have the possibility to be used for in vivo monitoring of Cys, thus providing essential information for unraveling the complex physiological processes and causes of diseases.

## 5. Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support from PRONEX/FAPEAL, CAPES/PNPD, CNPq, PROCAD/NF and INCT-Bionalítica.

## 6. References

- Alkilany, A.M., Thompson, L.B., Boulos, S.P., Sisco, P.N., Murphy, C.J., 2012. *Advanced Drug Delivery Reviews* 64, 190-199.
- Baker, W. L., 1998. *Analytical Letters* 31, 1325-1335.
- Bard, A.J.; Faulkner, L.R., *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*, Wiley, New York 2001, 718.
- Gea, S., Yana, M., Lua, J., Zhanga, M., Yub, F. , Yua, J., Songc, X., Yu, S., 2012. *Biosensors and Bioelectronics* 31, 49-54.
- Hoogvliet, J. C., Dijkstra, M., Kamp, B., Bennekom W. P., 2000. *Analytical Chemistry* 72, 2016-2021.
- Hu, J. , Shi, J., Li, S., Qin, Y., Guo, Z. X., Song, Y., Zhuo, D., 2005. *Chemical Physics Letters* 401, 352-356.
- Khaled, A., Guo, S., Li, F., Guo, P., 2005. *Nano Letters* 5, 1797-1808.
- Kim, B. , Sigmund, W. M., 2004. *Langmuir* 20, 8239-82-42.

- Kleijn, S.E.F., Yanson, A.I., Koper, M.T.M., 2012. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 666, 19-24.
- Li, X., Liu, Y., Fu, L., Cao, L., Wei, D., Yu, G., Zhu, D., 2006. *Carbon* 44, 3139-3142.
- Mathur, A., Roy, S.S., McLaughlin, A., 2010. *Journal of the Royal Society Interface* 7, 1129-1133.
- Murphy, C.J., San, T.K., Gole, A.M., Orendorff, C.J., Gao, J.X., Gou, L., Hunyadi, S.E., Li, T., 2005. *Journal of Physical Chemistry B* 109, 13857-13870.
- Ou, Y. Y., Huang, M. H., 2006. *The Journal of Physical Chemistry B* 110, 2031-2036.
- Prem C. P., Ashish K. P., Dheeraj S. C., 2012. *Electrochimica Acta* 74, 23-31.
- Raghuveer, M. S., Agrawal, S., Bishop, N., Ramanath, G., 2006. *Chemistry of Materials* 18, 1390-1393.
- Sainsbury, T., Stolarczyk, J., Fitzmaurice, D., 2005. *The Journal of Physical Chemistry B* 109, 16310-16325
- Santhiago, M., Lima, P.R., Santos, W.J.R., Oliveira, A.B., Kubota, L.T., 2009. *Electrochimica Acta* 54, 6609-6616.
- Sattarahmady, N., Heli, H., 2011. *Analytical Biochemistry* 409, 74-80.
- Silva, C. C. C., Breitkreitz, M.C., Santhiago, M., Corrêa, C. C., Kubota, L.T., 2012. *Electrochimica Acta* 71, 150-158.
- Silva, F.A.S., Lopes, C. B., Lima, P.R., Kubota, L.T, Goulart, M.O.F., 2012. *Sensors & Actuators: B. Chemical* 168, 289-296.
- Tello, A., Cárdenas, G., Häberle, P., Segura, R. A., 2008. *Carbon* 46, 884-889.
- Tian, L., Bian, J., Wang, B., Qi, Y., 2010. *Electrochimica Acta* 55, 3083-3088.

- Trasatti, S.; Petrii, O. A., 1991. *Pure and Applied Chemistry journal* 63, 711-734.
- Yang, A., Chernak, D.J, Huang, J., 2010. *Journal of Physical Chemistry Letters* 1, 2867-2875.
- Yeh, J.M., Huang, K.Y., Lin, S.Y., Wun, Y.Y., Huang, C.C., Liou, S.J., 2009. *Journal of Nanotechnology* 2009, 1-7.
- Zhang, M., Su, L., Mao, L., 2006. *Carbon* 44, 276-283.
- Metz, K.M., Colavita, P. E., Tse, K.Y., Hamers, R. J., 2012. *Journal of Power Sources* 198, 393-401.
- Wu, S., Lan, X., Huang, F., Luo, Z., Ju, H., Meng, C., Duan, C., 2012. *Biosensors and Bioelectronics* 32, 293-296.
- Kannan, P., John, S.A., 2011. *Biosensors and Bioelectronics* 30, 276-281.
- Brust, M., Walker, M., Bethell, D., Schiffrin, D.J., Whyman, R.J., 1994. *Journal of Chemical Society, Chemical Communications* 7, 801-802.

## 6 A NOVEL AMPEROMETRYC SENSOR FOR DETERMINATION OF HOMOCYSTEINE ON IRON(II) – XANTHURENIC ACID COMPLEX/MWCNT MODIFIED ELECTRODES

Francisco de Assis dos Santos Silva<sup>a,c</sup>, Cleylton Bezerra Lopes<sup>a,c</sup>, Wilson Ceciliano da Silva<sup>a,c</sup>, Phabyanno Rodrigues Lima<sup>a,c</sup>, Lauro Tatsuo Kubota<sup>b,c</sup>, Marília Oliveira Fonseca Goulart<sup>a,c\*</sup>

*<sup>a</sup>Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, 57072-970 Maceió, AL, Brazil*

*<sup>b</sup>Instituto de Química, UNICAMP, C. Postal 6154, 13084-971 Campinas, SP, Brazil*

*<sup>c</sup>Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Bioanalítica, UNICAMP, C. Postal 6154, 13084-971 Campinas, SP, Brazil*

---

\*Corresponding author. Tel.: +55 82 3214-1393; fax: +55 19 3214-1389  
E-mail address: [mofg@qui.ufal.br](mailto:mofg@qui.ufal.br) (M. O. F. Goulart)

**Abstract**

A novel amperometric sensor has been successfully developed for determination of homocysteine (hCys) with iron(II) – xanthurenic acid complex (FeXa<sub>2</sub>) / multiwalled carbon nanotube (MWCNT) / glassy carbon modified electrodes. Cyclic voltammetric results show that the modified electrode possess an excellent electrocatalytic activity toward the oxidation of hCys by reducing the overpotential (+0.15 V versus Ag/AgCl) and with considerable increase sensibility. The electron transference resistance of the modified electrode was studied by electrochemical impedance spectroscopy and the kinetic constant,  $k_{kin}$ , for the electrocatalytic oxidation of hCys was evaluated by chronoamperometry.

Keywords: Xanthurenic Acid; MWCNT; Homocysteine; Electrocatalysis; Chemically Modified Electrodes.

## 1- Introduction

Homocysteine (2-amino-4-mercaptopbutyric acid; hCys) is an important amino acid containing thiol group. It is produced as an intermediate in the synthesis of cysteine from parent methionine ingested in diet. Normal levels of hCys in plasma from healthy individuals are between 5 and 16  $\mu\text{mol L}^{-1}$  [1]. Higher concentrations of hCys giving rise to hiperhomocysteinemia (with hCys up to 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) or homocystinuria (around 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) are associated to different diseases [2]. The hCys levels in plasma are better correlated with the risk of atherosclerosis than those of cholesterol [3].

As was demonstrated in various works, the determination of hCys could be performed by immunoassay [4], gas chromatography–mass spectroscopy (GC/MS) [5], HPLC (or capillary electrophoresis) with fluorescent [6], laser-induced fluorescent [7], mass spectrometric [8], and electrochemical detectors [9]. Electrochemical methods are known to possess such advantages as simplicity, high sensitivity and ease in automation. However, such methods are greatly limited for accomplishing the above purpose because of the high oxidation potential of the hCys on the conventional electrodes, as glassy carbon and gold. To resolve these limitations the modification of electrodes with catalytic materials is the most efficient way to improve its development. Several works were already reports using many different materials as catalyst, such as, carbon nanotubes, quinones, metallic particles, and metal complex [10-13]. Quinolines are knows as a good metal chelator [14] and with the propose of apply these chelators to in modified electrodes a xanthurenic acid – iron (II) complex was synthesized and applied in the electrode modification.

## 2. Experimental

### 2.1. Chemicals and solutions

All the chemicals were of analytical grade and used as received, with no further purification. Multi-walled carbon nanotubes (MWCNT), *D,L*-Homocysteine, iron (II) sulfate hexahydrate, *N,N*-dimethylformamide and 4,8-dihydroxyquinoline-2-carboxylic acid (Xanthurenic acid ~96%, Xa) were acquired from Sigma - Aldrich, St. Louis, USA. All the solutions were freshly prepared prior to each experiment.

### 2.2. Syntheses of xanthurenic acid – iron (II) complex and characterization

The complex was synthesized according with the adapted procedure described in the literature to quinoline compounds [14], briefly 1.0 mmol of xanthurenic acid (205.2 mg) and 0.5 mmol of iron (II) sulfate hexahydrate (130.1 mg) were added to 25 mL of 1-butanol, the solution was kept under constant stirring at the room temperature for 3 h. After, the mixture was filtered, washed with ethanol and acetone to be finally dried in vacuum to obtaining a dark green powder.

Absorbance spectra were obtained using the UV-Vis spectrophotometer (MultiSpec-1501 - SHIMADZU). Infrared spectra of the compounds were recorded between 4000 and 500  $\text{cm}^{-1}$  on a SHIMADZU Fourier Transformer Spectrometer model IRPrestige-21 which were calibrated using polystyrene bands. The resolution of IR spectrometers is 0.2  $\text{cm}^{-1}$  and the number of scan was 20. The samples were prepared as a KBr disk.

Liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS) experiments were performed on an SHIMADZU LC-MS ion trap mass spectrometer equipped with Time-of-flight (TOF) interface and LCMSsolution data analysis software. The sample was introduced into the LC-MS with a syringe. The ion trap mass spectrometer was operated

in positive ion mode scanning from  $m/z$  100 to  $m/z$  2200 at a scan resolution of 13000 amu/s.

### 2.3. Construction of the sensors and electrochemical measurements

GCE (3 mm in diameter) was manually polished with alumina powder ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ , 1  $\mu\text{m}$ ) and rinsed with Milli-Q water. After cleaning the electrode, a dispersion was prepared by sonication, mixing 1.0 mg of MWCNT and 1.0 mL of DMF. 10.0  $\mu\text{L}$  of this dispersion was then deposited directly upon the GCE surface and dried at  $80^\circ\text{C}$  to form a MWCNT on the GCE surface (GCE/MWCNT).

At the GCE/MWCNT was add 10  $\mu\text{L}$  of a solution of  $\text{FeXa}_2$  5 mg/mL and dried at  $80^\circ\text{C}$ , washed with Milli-Q water and cycled (10 scans) in the potential range of -0.5 to +5.0 V vs. Ag/AgCl (KCl, sat.), at  $50 \text{ mV s}^{-1}$  in 0.1 mol  $\text{L}^{-1}$  PBS (pH 7.0) to stabilize the system. Prior to all the electrochemical experiments, the PBS was bubbled with nitrogen for 10 min to remove the dissolved oxygen.

The voltammetric measurements were taken with an Echo Chemie Autolab PGSTAT-30 potentiostat (Utrecht, The Netherlands). All the measurements were taken using an electrochemical cell with three electrodes, with an Ag/AgCl (saturated KCl) electrode as reference, a Pt wire as auxiliary, and an unmodified or modified glassy carbon, in the latter case, with MWCNT and  $\text{FeXa}_2$  ( $\text{FeXa}_2/\text{MWCNT}/\text{GCE}$ ) as working electrodes. The actual surface area ( $0.12 \text{ cm}^2$ ) of the  $\text{FeXa}_2/\text{MWCNT}/\text{GCE}$  modified electrode was estimated as reported before [11].



### 3. Results and discussion

#### 3.1. Iron (II) – xanthurenic acid complex synthesis and characterization

The xanthurenic acid titration with  $\text{Fe}^{2+}$  ions was followed by UV-Vis (figure 1A). Xanthurenic acid has two absorbance bands assignment to the  $\pi \rightarrow \pi^*$  and  $n \rightarrow \pi^*$  transitions at 256 and 340 nm respectively [15]. When the  $\text{Fe}^{2+}$  ions is added there are a hypochromic effect and a red shift in the  $n \rightarrow \pi^*$  (361 and 416 nm) and two new bands associated to the complex formation (320 and 625 nm). The new complex band at 625 nm can be assigned to its electronic transition [16]. In the insert we have the absorbance at 625 nm plotted versus the number the mols of  $\text{Fe}^{2+}$  ions, from which was possible to determine the stoichiometric ratio. The ratio of 1:2 (Fe:XA) was found. This ratio is in concordance with the elementary analyses and with the mass spectrometry data.  $m/z$  (MS-IT-TOF) : 463.98 (100%). Calculated for  $\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{FeN}_2\text{O}_8$ : C, 51.75%; H, 2.61%; N, 6.04%, Found: C, 51.90%; H, 2.75%; N, 5.99%.

IR analysis was then used to confirm that product had been formed by comparing the  $\text{FeXA}_2$  complex with an IR of the free Xanthurenic acid. There is a distinct peak in the IR of the free Xanthurenic acid seen at 3288 wave numbers which is the N – H stretch of the protonated pyridine (Figure 2A), however this peak is not observed in the  $\text{FeXA}_2$  complex since the iron is coordinated to the pyridine (Figure 2B).

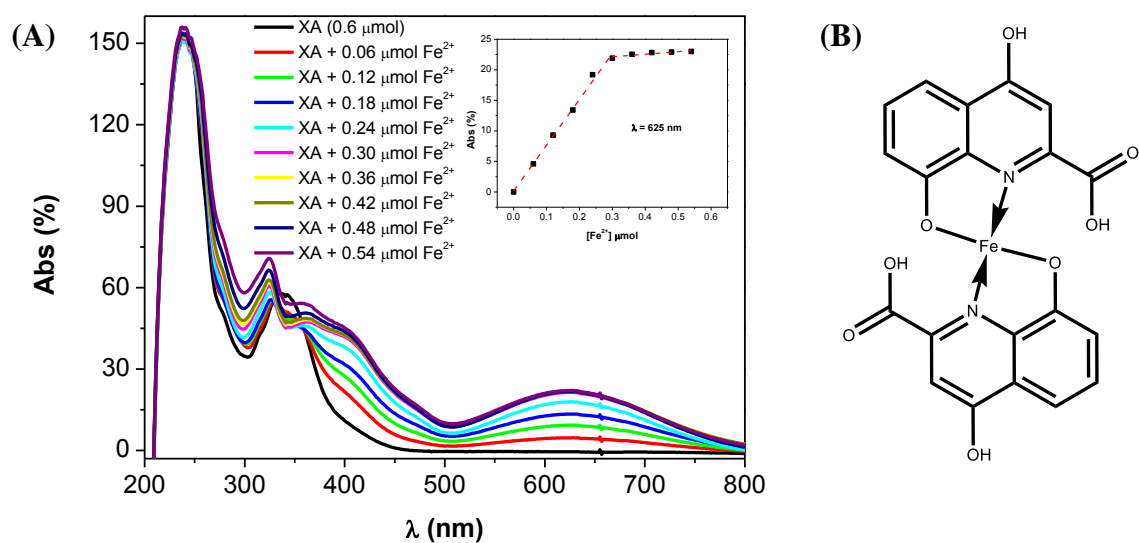


Figure 1 – (A) UV-Vis spectra to the xanthurenic acid titration with  $\text{Fe}^{2+}$  ions and (B) the proposed structure of the complex.

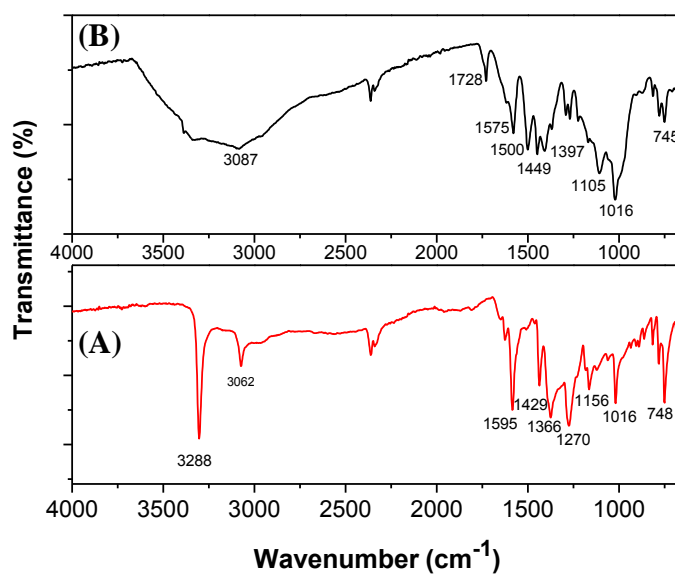


Figure 2 – IR spectra of free xanthurenic acid (A) and complexed with  $\text{Fe}^{2+}$  (B) in KBr.

### 3.2. IES- Electrochemical Impedance Spectroscopy study

EIS has been commonly used to characterize the interface properties of the modified electrodes. Figure 3 shows the typical results of AC impedance spectra of the bare GCE (curve a), MWCNT/GCE (curve b), FeXa<sub>2</sub>/MWCNT/GCE (curve c). The EIS experiments were performed in a solution of 0.1M KCl containing 1.0 mM Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-</sup> and 1.0 mM Fe(CN)<sub>6</sub><sup>4-</sup> with the frequency ranging from 10<sup>5</sup> to 10<sup>-2</sup> Hz. As can be seen, significant differences in the charge-transfer resistances ( $R_{ct}$ ) were observed upon the stepwise formation of the modified electrode. The  $R_{ct}$  of a bare GCE was estimated to be 11.52k $\Omega$ . The deposition of MWCNT film on the surface of GCE induced a  $R_{ct}$  of 7.64 k $\Omega$ , implying that the MWCNT film could largely improve the electron transfer of the electrochemical probe toward electrode surface. When the FeXa<sub>2</sub>/MWCNT material was assembled onto the GCE showed a new decrease of  $R_{ct}$  compared with that of the MWCNT film modified electrode. The  $R_{ct}$  was calculated as 5.53 k $\Omega$ . It was considered that FeXa<sub>2</sub> complex layer coating on MWCNT could enhance the rate of electron transfer due to the possible synergic role of the FeXa<sub>2</sub> complexes layer and the porous structure of the nanotubes.

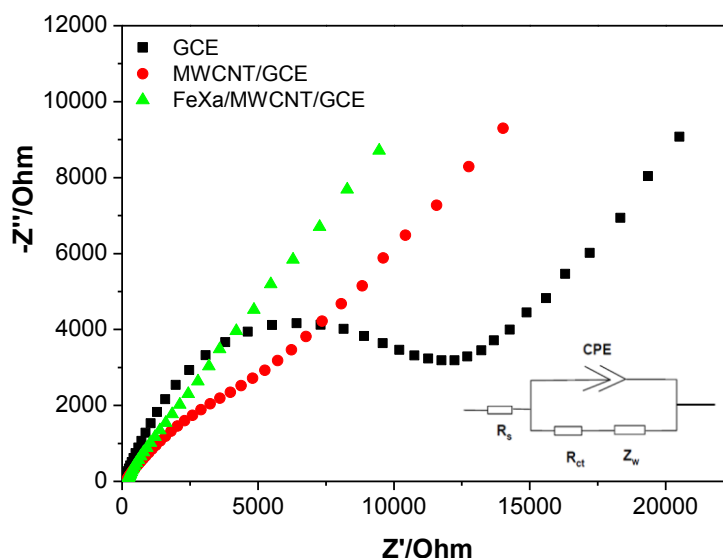


FIGURE 3 – Impedance spectral responses of the indicated electrodes obtained at + 0.2 V vs. Ag/AgCl in KCl 0.1 mol L<sup>-1</sup> with [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>-3</sup>/ [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>-4</sup>. Insert is the correspondent circuit used (CPE = constant phase element, R<sub>s</sub> = electrolyte resistance, R<sub>ct</sub> = charge-transfer resistance and Z<sub>w</sub> = Warburg impedance).

### 3.3. Electrocatalytic oxidation hCys.

The electrocatalytic activity of the FeXa<sub>2</sub>/MWCNT/GCE was evaluated toward the oxidation of hCys. The Figure 4A shows the cyclic voltammogram (a) that represents FeXa<sub>2</sub>/MWCNT/GCE in PBS 0.1 mol L<sup>-1</sup> at pH 7.0. When a solution of hCys is added, the oxidation current starts to increase at  $E = -0.05$  V vs. Ag/AgCl (voltammogram (b). this effect is more evident after more two additions of hCys (c) and (d).

Figures 4B and 4C display control experiments: firstly unmodified GCE where the oxidation potential peak of hCys is at  $E = + 0.6$  V vs. Ag/AgC which is considered a very high overpotential, After the modification of the GCE just with carbon nanotubes,

Figure 4C, (MWCNT/GCE) the overpotential is light reduced but there are a significant increase of current, this effect can be attributed to the increase of the electrode area. The efficiency of the modified electrode can be attributed to a synergistic effect between the carbon nanotubes and the xanthurenic acid – iron complex on the electrode surface due the fast electron transfer rate between hCys and the complex and the area increasing by the carbon nanotubes. This features result in reduce of the overpotential by a mediation process and the increasing of the hCys oxidation current as the proposed mechanism in the figure 5.

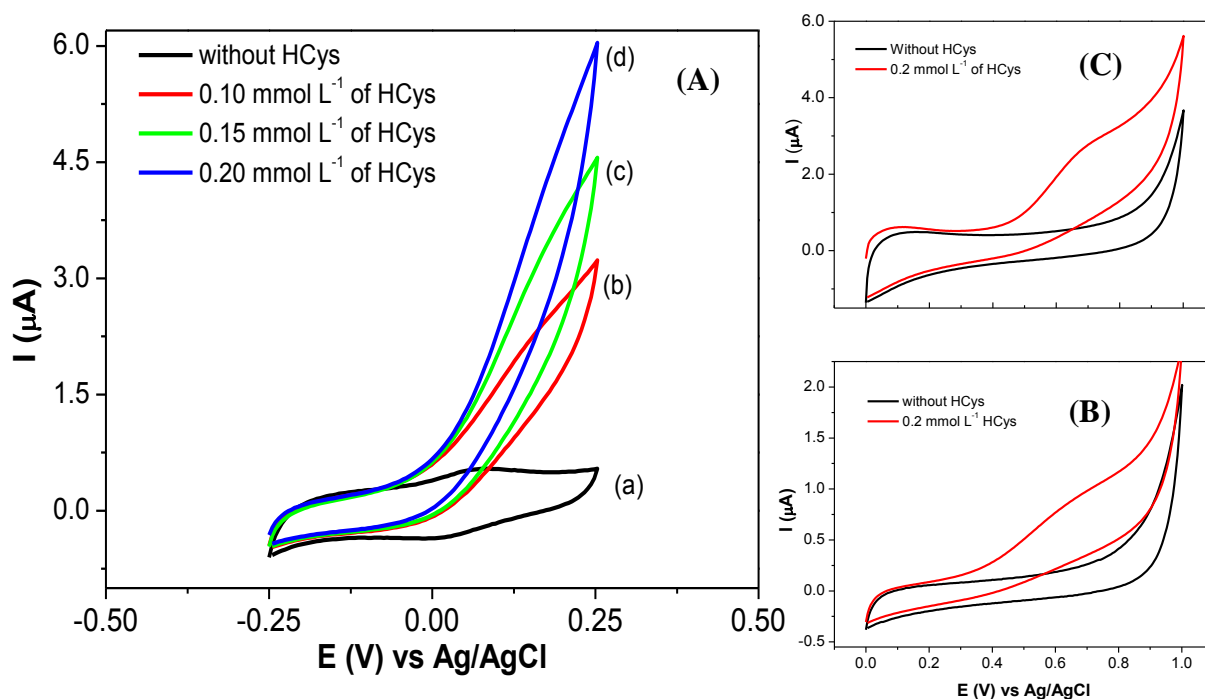


FIGURE 4 – Cyclic voltammograms of the FeXa<sub>2</sub>/MWCNT/ GCE (A), GCE (B) and MWCNT/GCE (C), in PBS 0.1 mol L<sup>-1</sup> pH 7.0 and scan rate of 5 mV s<sup>-1</sup> in absence (a), and in presence of hCys 0.10 mmol L<sup>-1</sup> (b), 0.15 mmol L<sup>-1</sup> (c) and 0.20 mmol L<sup>-1</sup> (d).

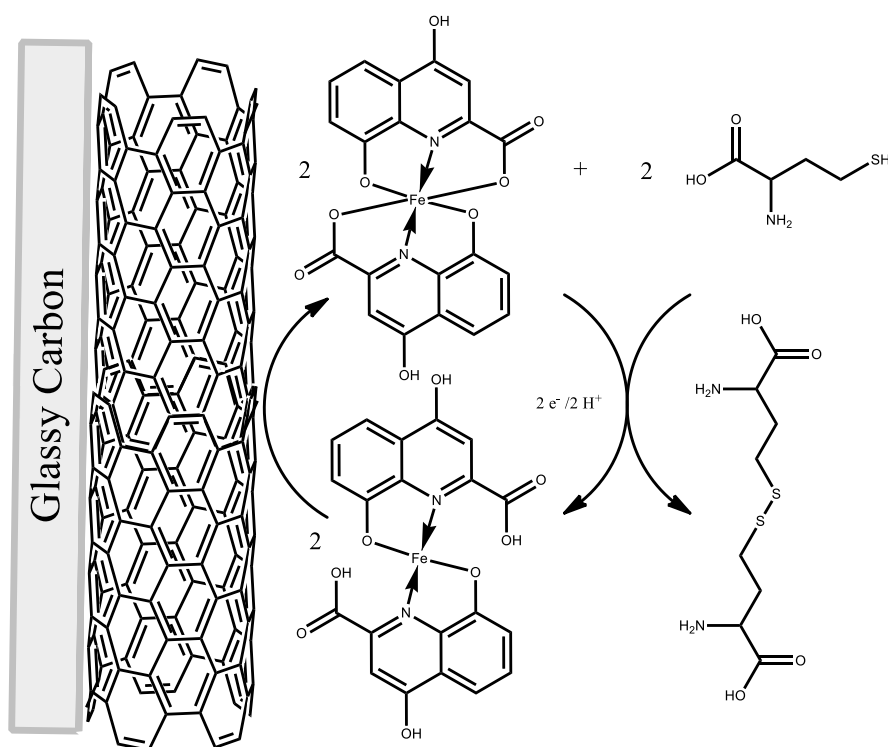


Figure 5 – Proposed mechanism to the hCys oxidation.

### 3.4. Chronoamperometric studies for hCys oxidation

Double-potential step chronoamperometry was employed to investigate electrochemical processes. Figure 6A shows a series of well-defined chronoamperograms for the GCE/MWCNT/FeXa<sub>2</sub>-modified electrode in the absence and presence of different concentrations of hCys at +0.150 V (first step) and - 0.150 V (second step) vs. Ag/AgCl and the chronoamperograms integration (figure 6B), where it is possible to observe the oxidation charge increase at the first potential . Furthermore, starting from the deductions described by Cottrel's law (Eq. (1)) [17] for an electroactive material with diffusion coefficient (*D*) and from chronoamperometric data, it was possible to determined the diffusion coefficient of hCys in solution.

$$I = nFAD^{1/2}C_0(\pi t)^{-1/2} \quad \text{Eq. (1)}$$

Where *n* is the number of electrons involved in the reaction, *F* is the Faraday constant (96485 C mol<sup>-1</sup>), *A* is the experimentally determined electrode area, *C*<sub>0</sub> is the bulk concentration of the hCys (mol cm<sup>-3</sup>), and *t* is time (s). The average value of *D* obtained

from the slopes of  $I$  vs.  $t^{-1/2}$  plots (Figure 6C) at different concentrations of hCys was  $3.67 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ . Also, the evaluation of the catalytic rate constant,  $k_{\text{kin}}$ , for the chemical reaction between hCys and redox material was determined by chronoamperometry experiments according to the method described in the literature [17] and using equation 2, where  $I_{\text{cat}}$  and  $I_L$  are the current of the FeXa<sub>2</sub>/MWCNT/GCE in presence and absence of hCys, respectively,  $k_{\text{kin}}$ ,  $C_{\text{bulk}}$  and  $t$  are the catalytic rate constant, the bulk concentrations of hCys and time elapsed, respectively. The average value of  $k_{\text{kin}}$  was found to be  $2.83 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

$$\frac{I_{\text{cat}}}{I_L} = \pi^{1/2} (k_{\text{cat}} C_{\text{bulk}} t)^{1/2} \quad \text{Eq. (2)}$$

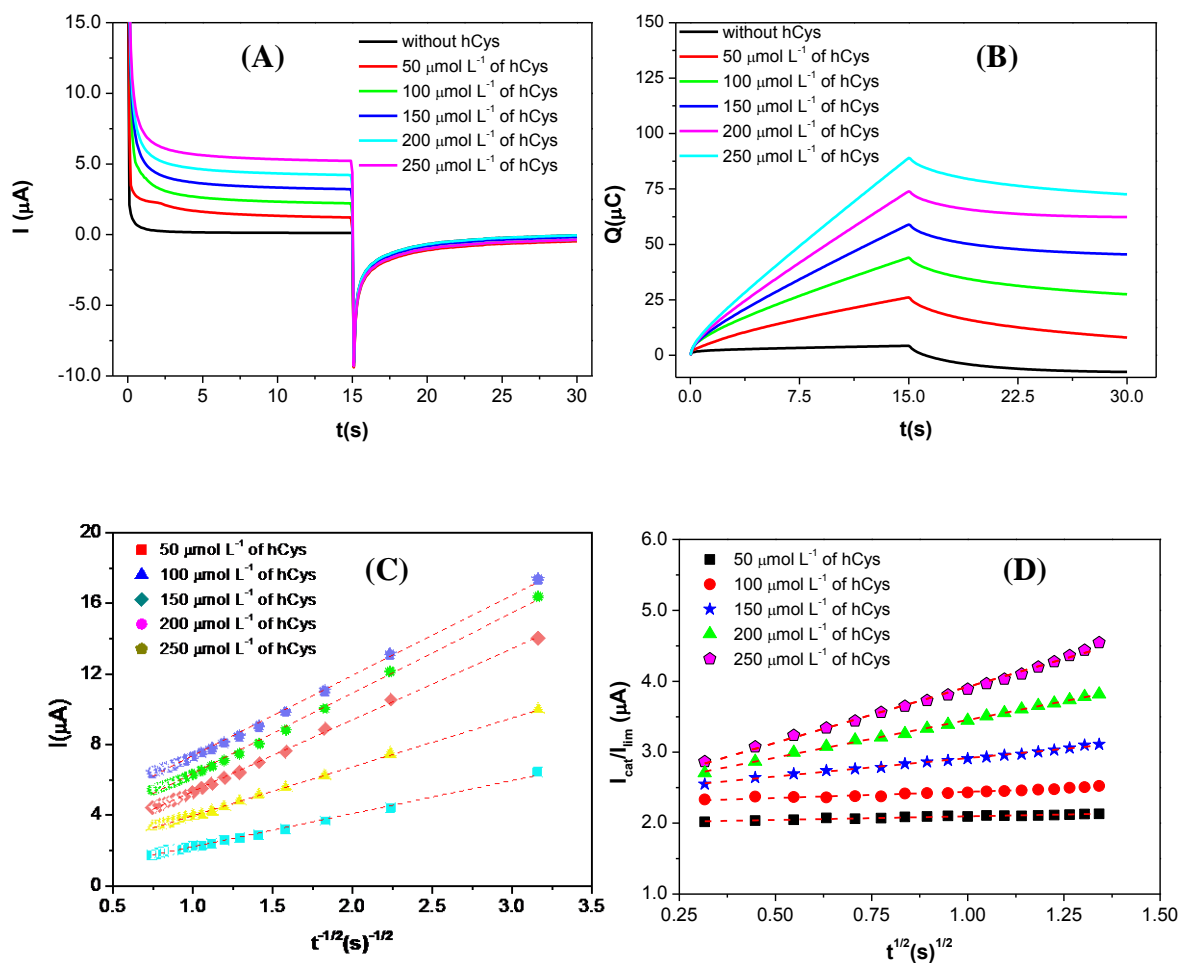


FIGURE 6 - (A) Chronoamperograms of the FeXa<sub>2</sub>/MWCNT/GCE in PBS 0.1 mol L<sup>-1</sup> pH 7.0 in the presence of various concentrations of hCys; (B) Integration of the chronoamperograms; (C) plot of  $I$  versus  $t^{-1/2}$ ; (D) Plot of  $I_{\text{cat}}/I_{\text{L}}$  versus  $t^{1/2}$ .

### 3.5. Amperometric determination of hCys

Amperometric measurements at a constant applied potential (+0.150 V vs. Ag/AgCl), taken with different concentrations of hCys in 0.1 mol L<sup>-1</sup> PBS at pH 7.0, clearly demonstrate that FeXa<sub>2</sub>/MWCNT/GCE works well as an hCys amperometric sensor (Figure 7A). The sensor response time was very short, reaching 100% (steady-



state current) of its maximum response in 0.1 s, which also demonstrates the high stability of the signal as a function of time. Furthermore, the proposed sensor showed a linear response ranging from 22 to 550  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (Fig. 7B), with greater sensitivity and low detection potential than most of the sensors reported previously [18-20]. This high sensitivity of  $7.7 \mu\text{A mmol L}^{-1}$  can be attributed to the efficiency of the reaction between the modified electrode and the hCys. The LOD and LOQ of  $0.26 \mu\text{mol L}^{-1}$  and  $0.89 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectively, were determined as recommended by the IUPAC [21].

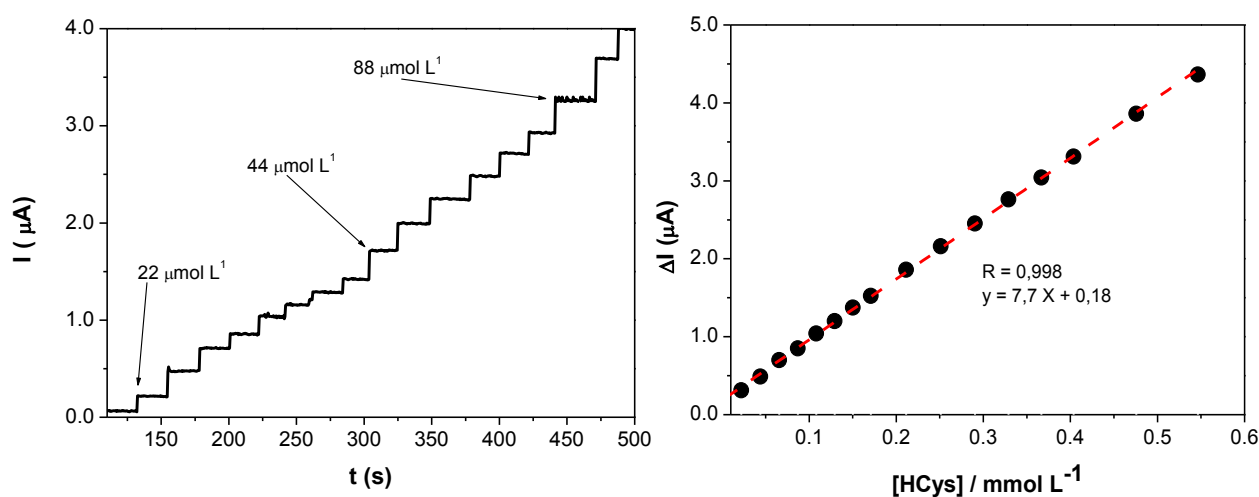


FIGURE 7 – Amperometric measurements for the determination of hCys at  $E_{\text{app}} = +0.150 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  obtained in  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  phosphate buffer solution at pH 7.0 (A) and the respective analytical curves (B).

### 3.6 Stability of modified electrode

The stability of the modified electrode was checked by performing successive amperometric determinations of hCys in a constant applied potential of  $+0.150 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  and in the presence of  $0.1 \text{ mmol L}^{-1}$  hCys. After 50 hCys determinations, no

significant change was observed in the voltammetric response (<5%), indicating that the FeXa<sub>2</sub>/MWCNT/GC modified electrode is very stable.

#### 4. Conclusions

This work demonstrated that xanthurenic acid – iron (II) complex can be synthesized and applied in the modification of GCE with MWCNT on the surface, making it a feasible alternative for the determination of hCys at low potentials, in neutral medium. In comparison to previously published values for others modified electrodes, it can be concluded that this sensor has better quantification and detection limits at low potential. The FeXa<sub>2</sub>/MWCNT/GCE allows for sensitive, robust, stable and remarkably fast amperometric measurements of hCys.

#### 5. Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support from CNPq, INCT Bioanalítica, PRONEX/FAPEAL, CAPES and RENORBIO (Brazil). We also thank Prof. Dr. Severino Alves Junior (DQF-UFPE, Recife-PE, Brazil) for the helping with the FeXa<sub>2</sub> complex syntheses, characterization and fruitful discussions.

#### 6. References

- [1] L. Agui, C. Pena-Fartal, P. Yanez-Sedeno, J. M. Pingarrom, *Talanta* 74 (2007) 412.
- [2] H. Refsum, P.M. Ueland, O. Nygard, S.E. Vollset, *Annu. Rev. Med.* 49 (1998) 31.
- [3] D.A. Cramer, *Lab. Med.* 29 (1998) 410.
- [4] Shipchandler et al., Rapid fully automated measurement of plasma homocysteine with the Abbott IMx analyzer. *Clinical chemistry*, 7 (1995) 991-994.

- [5] M. Rafii, R Elango, J. D. House, G. Courtney-Martin, P. Darling, L. Fisher, Paul B. encharz, *J. of Chromatography B*, 28 (2009), 3282–3291.
- [6] S.A. Pasas, N.A. Lacher, M.I. Davies, S.M. Lunte, *Electrophoresis* 23 (2002) 759.
- [7] T. K. Kim, D. N. Lee, H. J. Kim, *Tetrahedron Letters* 49 (2008) 4879–4881
- [8] Magera MJ, Lacey JM, Casetta B, Rinaldo P. *Clin Chem*, 45 (1999) 1517-1522
- [9] G. Hignett, S. Threlfell, A. J. Wain, N.S. Lawrence, S. J. Wilkins, J. Davis, R .G. Compton, M. F. Cardosi, *Analyst* 126 (2001) 353-357.
- [10] F. A. S. Silva, C. B. Lopes, E. O. Costa, P. R. Lima, L. T. Kubota, M. O. F. Goulart, *Electrochemistry Communications* 12 (2010) 450.
- [11] F. A. S. Silva, C. B. Lopes, P. R. Lima, L. T. Kubota, M. O. F. Goulart, *Sensors and Actuators B: Chemical* 168 (2012) 289-296.
- [12] W. Zhang, T. Yang, K. Jiao, *Biosensors and Bioelectronics* 31 (2012) 182.
- [13] M. Santhiago, P.R. Lima, W.de J.R. Santos, A.B. de Oliveira, L.T. Kubota, *Electrochimica Acta* 54 (2009) 6609.
- [14] I. G. Santos, J. Sanmartín, A. M. García-Deibe, M. Fondo, E. Gómez, *Inorganica Chimica Acta* 363 (2010) 193–198.
- [15] R. M. Issa, A. M. Khedr, H. Rizk, *Journal of the Chinese Chemical Society* 55 (2008) 875-884.
- [16] S. A. Shaker, Y. Farina, A. A. Salleh, *European Journal of Scientific Research*, 33 (2009), 702-709.

- [17] A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*, Wiley, New York 2001, p. 718.
- [18] V.W.S. Hung, K. Kerman, *Electrochemistry Communications* 13 (2011) 328–330.
- [19] N. S. Lawrence, R. P. Deo, J. Wang, *Talanta* 63 (2004) 443–449
- [20] C.T.S. Ching et al., *Sensors and Actuators B* 152 (2011) 94–98
- [21] L. Tian, J. Bian, B. Wang, Y. Qi, *Electrochimica Acta* 55 (2010) 3083.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os eletrodos quimicamente modificados desenvolvidos neste trabalho possibilitaram um grande ganho para eletroanálise, tendo em vista que foi possível realizar a detecção de importantes biomarcadores do estresse oxidativo, tais como ácido ascórbico, ácido úrico, cisteína e homocisteína em potenciais de oxidação mais negativos que quando comparados com os eletrodos não modificados. Com esta redução temos um aumento de seletividade, pois deslocamos a oxidação destas substancia para potenciais com menor efeito de interferentes.

No processo de modificação foram utilizadas diferentes metodologias como uso de filmes poliméricos, complexos e nanopartículas metálicas. Os materiais utilizados se mostraram eficientes na mediação do processo de transferência de elétrons entre os biomarcadores de interesse e os eletrodos. Isto fica evidente pela avaliação da constante catalítica, a qual foi determinada por métodos cronoamperométricos e eletrodo de disco rotatório e apresentaram valores de elevada magnitude.

Quanto à aplicação pratica destes eletrodos, o sensor desenvolvido para a quantificação simultânea de ácido ascórbico e ácido úrico foi aplicado em amostras de vitamina C comercial e urina e o sensor para cisteína foi aplicado em amostras de soro de sangue humano, sendo realizadas com sucesso.

Dentro do que foi apresentado nos artigos, fica claro que estes eletrodos podem ser aplicados para a quantificação de antioxidantes de forma muito promissora e diversos trabalhos estão em andamento utilizando os eletrodos desenvolvidos para quantificação de outras substâncias de interesse biológico.

## 8 ANEXOS



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

## Sensors and Actuators B: Chemical

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/snb](http://www.elsevier.com/locate/snb)

## Poly-xanthurenic acid modified electrodes: An amperometric sensor for the simultaneous determination of ascorbic and uric acids

Francisco de Assis dos Santos Silva<sup>a,d</sup>, Cleylton Bezerra Lopes<sup>a,b,d</sup>, Lauro Tatsuo Kubota<sup>c,d</sup>, Phabyanno Rodrigues Lima<sup>a,b,d,\*</sup>, Marília Oliveira Fonseca Goulart<sup>a,d,\*</sup><sup>a</sup> Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, 57072-970 Maceió, AL, Brazil<sup>b</sup> Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Alagoas, IFAL, 57020-600 Maceió, AL, Brazil<sup>c</sup> Instituto de Química, UNICAMP, C. Postal 6154, 13084-971 Campinas, SP, Brazil<sup>d</sup> Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Bioanalítica, UNICAMP, C. Postal 6154, 13084-971 Campinas, SP, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 28 February 2012

Received in revised form 6 April 2012

Accepted 8 April 2012

Available online 15 April 2012

## Keywords:

Xanthurenic acid

MWCNT

Ascorbic acid

Uric acid

Electrocatalysis

Chemically modified electrodes

## ABSTRACT

The poly-xanthurenic acid (poly-Xa)/multi-walled carbon nanotube (MWCNT)/glassy carbon modified electrode (poly-Xa/MWCNT/GCE) was successfully applied for the simultaneous determination of ascorbic (AA) and uric (UA) acids. Cyclic voltammetric results show that the modified electrode displays an excellent electrocatalytic activity toward the oxidation of AA at a low potential (0.05 V versus Ag/AgCl) and anodic peak resolution ( $\Delta E_{pa}$ ), close to 300 mV versus Ag/AgCl, in solutions containing AA and UA. Values in the order of  $10^6 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  were obtained for the kinetic constant  $k_{cat}$  for the catalytic oxidation of AA, upon evaluation by cyclic voltammetry, chronoamperometry and RDE. Furthermore, the sensor provided limits of detection of 0.19  $\mu\text{mol L}^{-1}$  and 0.31  $\mu\text{mol L}^{-1}$  for AA and UA, respectively. The sensor was applied for the simultaneous determination of AA and UA in urine samples and the average recoveries for these samples were 99.9 ( $\pm 2.5$ )% and 99.9 ( $\pm 2.6$ )%, respectively.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

## Biosensors and Bioelectronics

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bios](http://www.elsevier.com/locate/bios)

## A very low potential electrochemical detection of L-cysteine based on a glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes/gold nanorods

Francisco de Assis dos Santos Silva<sup>a,d</sup>, Monique Gabriella Angelo da Silva<sup>a</sup>, Phabyanno Rodrigues Lima<sup>a,b,d</sup>, Mario Roberto Meneghetti<sup>a</sup>, Lauro Tatsuo Kubota<sup>c,d</sup>, Marília Oliveira Fonseca Goulart<sup>a,d,\*</sup><sup>a</sup> Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, 57072-900 Maceió, AL, Brazil<sup>b</sup> Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Alagoas, IFAL, 57020-600 Maceió, AL, Brazil<sup>c</sup> Instituto de Química, UNICAMP, C. Postal 6154, 13084-971 Campinas, SP, Brazil<sup>d</sup> Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Bioanalítica, UNICAMP, C. Postal 6154, 13084-971 Campinas, SP, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 13 May 2013

Received in revised form

15 June 2013

Accepted 17 June 2013

Available online 24 June 2013

## Keywords:

Gold nanorods

MWCNT

L-cysteine

Electrocatalysis

Chemically modified electrodes

## ABSTRACT

A nanohybrid platform built with multi-walled carbon nanotubes and gold nanorods, prepared via a cationic surfactant-containing seed-mediated sequential growth process, in aqueous solution, on a glassy carbon substrate has been successfully developed to be used in the electrocatalytic oxidation of L-cysteine (Cys). The nanohybrid was characterized by transmission electron microscopy, Raman spectroscopy and electrochemical measurements. Cyclic voltammetry results had shown that the modified electrode allows the oxidation of Cys at a very low anodic potential (0.00 V vs. Ag/AgCl). The kinetic constant  $k_{cat}$  for the catalytic oxidation of Cys was evaluated by chronoamperometry and provided a value of  $5.6 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . The sensor presents a linear response range from 5.0 up to 200.0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , detection limit of 8.25  $\text{nmol L}^{-1}$  and a sensitivity of 120  $\text{nA L } \mu\text{mol}^{-1}$ .

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

## Francisco de Assis dos Santos Silva

---

Possui graduação em Química pela Universidade Federal de Alagoas (2007), intercâmbio realizado em Gonzaga University - Estados Unidos (2007) e mestrado em Química Orgânica pela Universidade Federal de Alagoas (2009). Atualmente é doutorando em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas. Tem experiência na área de Química Orgânica, com ênfase em Síntese Orgânica e Eletro-orgânica.

<http://lattes.cnpq.br/8842303844359230>

---

### Dados pessoais

**Nome** Francisco de Assis dos Santos Silva

**Nome em citações bibliográficas** SILVA, Francisco A. S.

**Filiação** Geraldo Lima da Silva e Josefa Domingos dos santos silva

**Nascimento** 05/12/1985 - Canhotinho/PE - Brasil

**Endereço residencial** Res. Jardim Royal, 225 Quadra I1  
Cidade Universitária - Maceió  
57074-422, AL - Brasil

### Endereço eletrônico

E-mail principal: [fass@iqb.ufal.br](mailto:fass@iqb.ufal.br)

E-mail alternativo : [fradeassis@hotmail.com](mailto:fradeassis@hotmail.com)

---

### Formação acadêmica/titulação

**2009** Doutorado em Química e Biotecnologia.  
Universidade Federal de Alagoas, UFAL, Maceio, Brasil  
Título: Desenvolvimento de sensores químicos e biossensores fundamentados em nanotubos de carbono  
Orientador: Marília Oliveira Fonseca Goulart  
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

**2008 - 2009** Mestrado em Química e Biotecnologia.  
Universidade Federal de Alagoas, UFAL, Maceio, Brasil  
Título: Ácido Xanturênico: Um novo mediador para a eletro-oxidação de NADH, Ano de obtenção: 2009  
Orientador: Marília Oliveira Fonseca Goulart  
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

**2007 - 2007** Graduação Sanduiche  
Gonzaga University, Spokane – WA, Estados Unidos  
Orientador : Hugh Lefcort  
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

**2004 - 2007** Graduação em Química.  
Universidade Federal de Alagoas, UFAL, Maceio, Brasil  
Título: Métodos para Síntese de Carbamatos  
Orientador: Prof. Dr. Dennis de Oliveira Inbroisi

**2000 - 2003** Ensino Médio (2º grau)  
Escola Estadual Drª Eunice de Lemos Campos, EELC, Brasil

---

---

## Formação complementar

<b>2009 - 2009</b>	Curso de curta duração em Molecular shape and similarity analysis: theory. Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, Sao Carlos, Brasil
<b>2009 - 2009</b>	Curso de curta duração em Química verde: fundamentos e aplicações. Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, Sao Carlos, Brasil
<b>2009 - 2009</b>	Curso de curta duração em Tópicos em química: eletrodos de diamante. Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, Sao Carlos, Brasil
<b>2009 - 2009</b>	Curso de curta duração em 4ª Escola de Eletroquímica. Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
<b>2008 - 2008</b>	Curso de curta duração em Resonancia de spin eletrônicos y técnicas de spin. Universidade Federal de Alagoas, UFAL, Maceio, Brasil
<b>2006 - 2006</b>	Curso de curta duração em Planejamento racional de fármacos. Universidade Federal de Alagoas, UFAL, Maceio, Brasil
<b>2006 - 2006</b>	Curso de curta duração em Estrutura de proteínas - Uma abordagem Interativa. Universidade Federal de Alagoas, UFAL, Maceio, Brasil
<b>2005 - 2005</b>	Curso de curta duração em Pedag. de Projetos, Avaliação e R. Inter-pessoais. L. Z. Consultoria e Assessoria Educacional, LZCAE, Brasil

---

## Atuação profissional

### 1. Faculdade São Vicente - FASVIPA

---

#### Vínculo institucional

**2011 - 2012** Vínculo: Celetista, Enquadramento funcional: Professor Universitário, Carga horária: 10, Regime: Parcial

### 2. Universidade Federal de Alagoas - UFAL

---

#### Vínculo institucional

**2012 - Atual** Vínculo: Servidor público, Enquadramento funcional: Professor Substituto, Carga horária: 20, Regime: Parcial

**2009 - Atual** Vínculo: Pós-Graduando, Enquadramento funcional: Doutorando, Carga horária: 40, Regime: Integral

**2007- 2007** Vínculo: Monitor de Química Inorgânica, Enquadramento funcional: Bolsista, Carga horária: 12

**2006 - 2006** Vínculo: Monitor de Química Orgânica, Enquadramento funcional: Bolsista, Carga horária: 12

**2005 - 2005** Vínculo: Monitor de Química Geral e Experimental, Enquadramento funcional: Bolsista, Carga horária: 12



### 3. Escola Estadual Dr<sup>a</sup> Eunice de Lemos Campos - EELC

---

#### Vínculo institucional

**2004 - 2006** Vínculo: Professor Bolsista, Enquadramento funcional: Professor de Química e Matemática , Carga horária: 20, Regime: Parcial

### 4. Serviço de Apoio às Micro e Pequenas Empresas de Alagoas - SEBRAE/AL

---

#### Vínculo institucional

**2002 - 2003** Vínculo: Agente Administrativo, Enquadramento funcional: Estagiário, Carga horária: 20, Regime: Parcial

### Áreas de atuação

1. Química Orgânica
2. Síntese Orgânica
3. Eletroanalítica
4. Química Analítica
5. Eletroquímica
6. Eletrosíntese Orgânica

### Idiomas

**Inglês** Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem

**Espanhol** Compreende Razoavelmente , Fala Pouco , Escreve Pouco , Lê Razoavelmente

### Produção

#### Produção bibliográfica

##### Artigos completos publicados em periódicos

1. **SILVA, Francisco** A. S., da Silva, Monique G. A., Lima, Meneghetti, Mario R., Lima, Phabyanno R., Kubota, Lauro T., Goulart, Marília O. F.  
A very low potential electrochemical detection of L-cysteine based on a glassy carbon electrode modified with carbon nanotubes/gold nanorods . Biosensors and Bioelectronics. , v.50, p.202 - 209, 2013.
2. COSTA, E. O., MOLINA M. T., ABREU, F. C., **SILVA, FASS**, COSTA, C. O., PINHO JUNIOR, W., VALENTIM, I. B., AGUILERAA-VENEGAS, B., PEREZ-CRUZ, F., NORAMBUENA, E., OLEA-AZAR C., GOULART, M. O. F.  
Electrochemical and Spectroscopic Investigation of Bioactive Naphthoquinones. International Journal of Electrochemical Science (Online). , v.7, p.6524 - 6538, 2012.
3. COSTA, C. O., COSTA, E. O., FERREIRA, F., Lima, L. S., Silva, L. V., **SILVA, FASS**, ABREU, F. C., FIGUEIREDO, I., PINHO JUNIOR, W., BENTO, E., PESSOA, T. L. G., OLEA-AZAR C., NORAMBUENA, E., GOULART, M. O. F.

Oncocalyxone A: Electrochemical, Spectroscopic Investigation and Studies of Its Interaction with DNA, Nucleobases and N-acetylcysteine. *Journal of the Brazilian Chemical Society (Impresso)*. , v.23, p.1174 - 1185, 2012.

4. **Silva, Francisco A. S.**, Lopes, Cleylton Bezerra, Kubota, Lauro Tatsuo, Lima, Phabyanno Rodrigues, Goulart, Marília Oliveira Fonseca  
Poly-xanthurenic acid modified electrodes: An amperometric sensor for the simultaneous determination of ascorbic and uric acids. *Sensors and Actuators. B, Chemical*. , v.168, p.289 - 296, 2012.
5. **SILVA, Francisco A. S.**, Lopes, Cleylton Bezerra, de Oliveira Costa, Erivaldo, Lima, Phabyanno Rodrigues, Kubota, Lauro Tatsuo, Goulart, Marília Oliveira Fonseca  
Poly-xanthurenic acid as an efficient mediator for the electrocatalytic oxidation of NADH. *Electrochemistry Communications*. , v.12, p.450 - 454, 2010.

### Capítulos de livros publicados

#### 1. de Assis dos Santos Silva, Francisco

A realidade acadêmica dos estudantes de origem popular no âmbito dos direitos In: *Coleção Grandes Temas: Condições de permanência de estudantes de origem popular no espaço acadêmico*. 1 ed. Rio de Janeiro : EdUFRJ, 2010, v.1, p. 49-54.

#### 2. SILVA, Francisco A. S.

Vida, educação e química. Um longa caminhada! In: *Caminhadas de universitários de origem popular* ed. Rio de Janeiro : EdUFRJ, 2009, v.1, p. 47-49.

### Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. SILVA, Francisco A. S., Lopes, Cleylton B., MIRANDA, P. R. L., COSTA, E. O., KUBOTA, L. T., LIMA, P. R., GOULART, M. O. F.

A new chemical sensor for NADH based on multi-walled carbon nanotubes and xanthurenic acid In: *International Conference on Advanced Materials*, 2009, Rio de Janeiro.

**Anais ICAM 2009**. , 2009. v.I.

2. Lopes, Cleylton B., SILVA, Francisco A. S., LIMA, P. R., KUBOTA, L. T., GOULART, M. O. F., ABREU, F. C.

New nanostructured platforms based on niclosamide immobilized on multi-wall carbon-nanotubes for electrocatalytic NADH oxidation In: *International Conference on Advanced Materials*, 2009, Rio de Janeiro.

**Anais ICAM 2009**. , 2009. v.I.

3. SILVA, Francisco A. S., GOULART, M. O. F., Lopes, Cleylton B., LIMA, P. R., MIRANDA, P. R. L., KUBOTA, L. T., COSTA, E. O.

Xanthurenic Acid: a New Mediator for the Electroanalysis of NADH In: *60th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry*, 2009, Pequim.

**ISE 2009**. , 2009.

4. ARAÚJO, Clêônia R. M., IMBROISI, D. O., Lopes, Cleylton B., SILVA, Francisco A. S., SANTANA, Carmem S. T., SILVA, Wilson C.

Avanços sintéticos na obtenção de aminocarbamato, possível anticolinesterásico, a partir do líquido da castanha de caju (LCC) In: *31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, 2008, Águas do Lindóia.

**Anais da 31ª reunião da SBQ**. , 2008. v.1.

5. SANTANA, Carmem S. T., Lopes, Cleylton B., IMBROISI, D. O., ARAÚJO, Clêônia R. M., SILVA, Francisco A. S., SILVA, Wilson C.

SÍNTESE REGIO E ESTEREOSSSELETIVA DO (3E,13Z)-OCTADECADIENOL E SEU ISÔMERO GEOMÉTRICO (3Z,13Z) In: 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas do Lindóia-SP.

**Anais da 31ª Reunião da SBQ.** , 2008. v.1.

6. SILVA, Francisco A. S., IMBROISI, D. O., Lopes, Cleylton B., ARAÚJO, Clêônia R. M., SANTANA, Carmem S. T., SILVA, Wilson C.

Proposta de Síntese Regio e Estereosseletiva do Feromônio Sexual e Isômeros Geométricos da Mariposa *Castnia licus* (Lepidoptera: Castniidae). In: 59ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 2007, Belém.

**Anais da SBPC 2007.** São Paulo: , 2007.

7. SILVA, Francisco A. S., Santos, José R.

Projeto Pré-Vestibular Comunitário - UFAL In: Seminário Nacional do Programa Conexões de Saberes, 2006, Rio de Janeiro.

**II Seminário Nacional do Programa Conexões de Saberes.** , 2006. v.1.

#### **Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)**

1. SILVA, Wilson C., LIMA, P. R., **de Assis dos Santos Silva, Francisco**, Lopes, Cleylton B., COSTA, E. O., KUBOTA, L. T., GOULART, M. O. F.

Ácido Ferúlico: um novo mediador redox para oxidação eletrocatalítica de NADH In: XVIII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2011, Bento Gonçalves - RS.

**Anais do 18º Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica - XVIII SIBEE.** , 2011. v.1. p.1150 - 1153

2. **de Assis dos Santos Silva, Francisco**, SILVA, M. A., MENEGHETTI, M. R., LIMA, P. R., KUBOTA, L. T., GOULART, M. O. F.

Efeito sinérgico de nanobastões de ouro depositados em nanotubos de carbono para determinação de L-cisteína In: 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis - SC.

**Anais da 34ª Reunião Anual da SBQ.** , 2011. v.1.

3. Lopes, Cleylton B., **de Assis dos Santos Silva, Francisco**, Lima, Phabyanno Rodrigues, KUBOTA, L. T., GOULART, M. O. F.

Eletrodo modificado com nanotubos de carbono e filme de cobalto para detecção de peróxido de hidrogênio In: XVIII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2011, Bento Gonçalves - RS.

**Anais do 18º Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica - XVIII SIBEE.** , 2011. v.1. p.1111 - 1113

4. **de Assis dos Santos Silva, Francisco**, PINHO JUNIOR, W., Silva, L. V., COSTA, C. O., PESSOA, T. L. G., GOULART, M. O. F.

Estudo Eletroquímico e espectroscópico da reação entre oncolixona e N-acetilcisteína In: XVIII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2011, Bento Gonçalves - RS.

**Anais do 18º Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica - XVIII SIBEE.** Lajeado: Ed. da Univantes, 2011. v.1. p.115 - 117

5. SILVA, Francisco A. S., COSTA, E. O., LIMA, P. R., Lopes, Cleylton B., GOULART, M. O. F., MIRANDA, P. R. L.

ESTUDO CINÉTICO DA ELETRO-OXIDAÇÃO DE NADH EM ELETRODO DE CARBONO VÍTREO MODIFICADO COM NANOTUBOS DE CARBONO E ÁCIDO XANTURÊNICO In: Congresso Acadêmico 2009 - UFAL, 2009, Maceió.

**Anais do Congresso Acadêmico da UFAL 2009.** Maceió: Edufal, 2009. v.1.

6. Lopes, Cleylton B., GOULART, M. O. F., SILVA, Francisco A. S., LIMA, P. R., MIRANDA, P. R. L.

UM NOVO SENSOR PARA NADH A BASE DE NICLOSAMIDA E NANOTUBOS DE

CARBONO In: Congresso Acadêmico da UFAL 2009, 2009, Maceió.  
**Anais do Congresso Acadêmico da UFAL 2009.** Maceió: Edufal, 2009. v.1.

### **Apresentação de trabalho e palestra**

**1. SILVA, Francisco A. S.**

**Ácido Xanturênico: um novo mediador em eletrodos quimicamente modificados**, 2010.  
(Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)

**2. de Assis dos Santos Silva, Francisco**, Lopes, Cleylton B., LIMA, P. R., KUBOTA, L. T., GOULART, M. O. F.

**Electropolymerization of xanthurenic acid on multi-walled carbon nanotubes and its application to homocysteine determination**, 2010. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

**3. SILVA, Francisco A. S.**, Lopes, Cleylton B., IMBROISI, D. O., SANTANA, Carmem S. T., ARAÚJO, Clêônia R. M., SILVA, Wilson C.

**Proposta de Síntese Regio Estereosseletiva do Feromônio Sexual e isômeros geométricos da Mariposa *Castnia licus***, 2007. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

**4. SILVA, Francisco A. S.**, Santos, José R.

**Programa de Incentivo a Experimentação em Ciências - Show de Química**, 2006.  
(Comunicação, Apresentação de Trabalho)

**5. SILVA, Francisco A. S.**, Santos, José R.

**Projeto Pré-Vestibular Comunitário**, 2006. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

**6. SILVA, Francisco A. S.**

**Quimikit dos Plásticos - Programa de incentivo a experimentação em ciências**, 2005.  
(Congresso, Apresentação de Trabalho)

### **Produção técnica**

#### **Demais produções técnicas**

**1. SILVA, Francisco A. S.**

**Química e meio ambiente; da reciclagem a química verde**, 2011. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

**2. SILVA, Francisco A. S.**

**Temas estruturadores em sala de aula: o desafio da contextualização no ensino de química**, 2011. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

**3. SILVA, Francisco A. S.**

**Pre-vestibular conexões de saberes**, 2007. (Desenvolvimento de material didático ou instrucional)

### **Entrevistas, mesas redondas, programas e comentários na mídia**

**1. SILVA, Francisco A. S.**

**Proex lança 2ª coleção do Conexões de Saberes**, 2011

**2. SILVA, Francisco A. S.**, Lopes, Cleylton B.

Alunos do programa **Conexões de Saberes** aprovados em mestrado, 2008

3. **SILVA, Francisco A. S.**

**Ufal promove intercâmbio com universidades Americanas**, 2007

## Orientações e Supervisões

### Orientações e supervisões concluídas

### Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1. Clíney Henrique Menezes Santos. **Tratamento de Resíduos químicos laboratoriais**. 2013. Curso (Química) - Faculdade São Vicente
2. João José de Oliveira Couto. **A Importância da Universidade no Desenvolvimento da Química**. 2012. Curso (Química) - Faculdade São Vicente
3. Cremilda Marianne de Brito Biriba. **Biomateriais e suas aplicações na medicina**. 2012. Curso (Química) - Faculdade São Vicente
4. Wilma Lima dos Anjos Silva. **A cannabis sativa e seus efeitos químicos nocivos a saúde**. 2012. Curso (Química) - Faculdade São Vicente
5. Marcyo Roberto Lisboa Ribeiro. **A Produtos naturais do gênero Annona L., 1753 (Annonaceae)**. 2012. Curso (Química) - Faculdade São Vicente

## Eventos

### Eventos

#### Participação em eventos

1. Apresentação Oral no **XVIII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica**, 2011. (Simpósio)  
Estudo Eletroquímico e espectroscópico da reação entre onocalixona e N-acetilcisteína.
2. Apresentação Oral no **IX Encontro da SBPMat**, 2010. (Encontro)  
Electropolymerization of xanthurenic acid on multi-walled carbon nanotubes and its application to homocysteine determination.
3. Apresentação de Poster / Painel no(a) **International Conference on Advanced Materials**, 2009. (Congresso)  
A new chemical sensor for NADH based on multi-walled carbon nanotubes and xanthurenic acid.
4. **XXIX Escola de Verão em Química**, 2009. (Oficina)
5. **Workshop da Pós-Graduação em Química**, 2007. (Outra)
6. **XXVI ENEQUI - Encontro Nacional dos Estudantes de Química**, 2007. (Encontro)
7. **I Encontro Alagoano de Ensino de Ciências e matemática**, 2007. (Encontro).

8. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Seminário Local do programa Conexões de Saberes - UFAL**, 2006. (Seminário)  
Projeto Pré-Vestibular Comunitário.
9. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Seminário Nacional do Programa Conexões de Saberes**, 2006. (Seminário)  
Projeto Pré-Vestibular Comunitário.
10. **Seminário Local do Programa Conexões de Saberes - UFS**, 2006. (Seminário)
11. **Reforma universitária**, 2004. (Seminário)

#### **Organização de evento**

1. **SILVA, Francisco A. S.**  
**Workshop da Pós-Graduação em Química**, 2007. (Outro, Organização de evento)
2. **SILVA, Francisco A. S.**  
**Expoquímica**, 2006. (Exposição, Organização de evento)
3. SILVA, Francisco A. S., Freitas, Mikael L., Oliveira, Maria B. F., Lopes, Cleylton B.  
**Jornada de Mini-cursos**, 2006. (Outro, Organização de evento)
4. SILVA, Francisco A. S., Oliveira, Maria B. F., Lopes, Cleylton B., Freitas, Mikael L.  
**3a. Semana de Química**, 2006. (Outro, Organização de evento)

#### **Bancas**

##### **Bancas**

##### **Participação em banca de trabalhos de conclusão**

##### **Graduação**

1. **SILVA, Francisco A. S.**, LIMA, G.E.S., COSTA, A.L.S.  
Participação em banca de Cristiane de Jesus. **Automedicação**, 2012  
(Química) Faculdade São Vicente