



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CARLOS ALBERTO ROSSI SALAMANCA NETO

**DESENVOLVIMENTO DE (BIOS)SENSORES A PARTIR DE
BIOMATERIAIS DE *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05:
APLICAÇÃO EM MATRIZES FARMACÊUTICA, BIOLÓGICA E
ALIMENTÍCIA**

Londrina
2022

CARLOS ALBERTO ROSSI SALAMANCA NETO

**DESENVOLVIMENTO DE (BIOS)SENSORES A PARTIR DE
BIOMATERIAIS DE *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05:
APLICAÇÃO EM MATRIZES FARMACÊUTICA, BIOLÓGICA E
ALIMENTÍCIA**

Tese de Doutorado apresentada à Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial exigido pelo Programa de Pós-Graduação em Química – curso de Doutorado em Química – Associação Ampla UEL/UEPG/Unicentro, para a obtenção do título de Doutor em Química, área de concentração Química Analítica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Elen Julciléia Romão Sartori Braz

Londrina
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Salamanca Neto, Carlos Alberto Rossi.

DESENVOLVIMENTO DE (BIOS)SENSORES A PARTIR DE BIOMATERIAIS DE *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 : APLICAÇÃO EM MATRIZES FARMACÊUTICA, BIOLÓGICA E ALIMENTÍCIA / Carlos Alberto Rossi Salamanca Neto. - Londrina, 2022.
123 f.

Orientador: Elen Julciléia Romão Sartori Braz.

Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2022.
Inclui bibliografia.

1. Carboximetil-botriosferana. Botriosferana - Tese. 2. Lacase. Controle de qualidade - Tese. 3. Desloratadina. Quimiometria - Tese. 4. Ácidos clorogênicos - Tese. I. Sartori Braz, Elen Julciléia Romão. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU 54

CARLOS ALBERTO ROSSI SALAMANCA NETO

**DESENVOLVIMENTO DE (BIOS)SENSORES A PARTIR DE
BIOMATERIAIS DE *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05:
APLICAÇÃO EM MATRIZES FARMACÊUTICA, BIOLÓGICA E
ALIMENTÍCIA**

Tese de Doutorado apresentada à Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial exigido pelo Programa de Pós-Graduação em Química – curso de Doutorado em Química – Associação Ampla UEL/UEPG/Unicentro, para a obtenção do título de Doutor em Química, área de concentração Química Analítica.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra Elen Julciléia Romão Sartori Braz
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Andressa Galli Salante
Universidade Estadual do Centro Oeste -
UNICENTRO

Prof. Dr. Edivaldo Egea Garcia
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Profa. Dra. Ieda Spacino Scarmínio
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Marcos Fernando de Souza Teixeira
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Londrina, 15 de março de 2022.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à Deus pela vida e pelas oportunidades que tem me oferecido e por tudo de bom que tem me proporcionado. Sem Ele, nada sou!

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Elen Romão Sartori, não só pela constante orientação durante os 8 anos que passei pelo LAES, mas sobretudo pela sua amizade, carinho e tempo dedicado. E também aos conselhos e apoio para que eu continue sempre crescendo na vida pessoal, profissional e acadêmica.

Aos Professores Dr^a Aneli Melo Barbosa e Dr Robert Dekker pelos ensinamentos, parceria e por fornecerem os biomateriais usados para a construção dos (bios)sensores.

A meus pais Júlio César e Arlete, que não mediram esforços para que eu conseguisse alcançar meus objetivos, pelas conversas, conselhos, companheirismo, e pelo apoio constante. Obrigado pelo amor incondicional, amo muito vocês!

À Prof^a Dr^a Ieda Spacino Scarmínio, minha primeira mãe científica durante a graduação, e ao Dr Gustavo Galo pela parceria nos projetos e pelos ensinamentos e trocas de conhecimentos.

Aos companheiros de laboratório que já passaram e que ainda permanecem no LAES, pelo apoio, conversas e discussões que me ajudaram a interpretar os resultados desse trabalho e, sobretudo, pela amizade.

À Prof^a Dr^a Karolina Schwarzová Pecková pela orientação durante o meu estágio de doutorado na Charles University e aos colegas do UNESCO – Laboratory of Environmental Electrochemistry pela receptividade e trocas de experiências que fizeram a minha estadia em Praga ainda mais valorosa.

Ao Ms André Olean Oliveira e ao Prof Dr Marcos Teixeira pela parceria, acolhimento no grupo e pela ajuda nas análises de espectroscopia de impedância eletroquímica, que enriqueceram ainda mais o meu trabalho.

À Ms Marcela Breves e à Prof^a Dr^a Maria Luiza Zeraik pelo fornecimento das amostras de café utilizadas nessa tese.

Aos funcionários da secretaria de Pós-Graduação do CCE, em

especial à Regina, por todas as vezes em que precisei, estavam lá me ajudando prontamente em tudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pelo auxílio financeiro durante este Doutorado.

À Universidade de Coimbra pela oportunidade de realizar um estágio de doutorado no exterior por meio do programa de bolsas Be-a-Doc.

E, a todas as pessoas que direta ou indiretamente me ajudaram na realização deste trabalho, o meu muitíssimo obrigado!

“O que eu faço é uma gota no meio de um oceano. Mas sem ela, o oceano será menor.”

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

ROSSI SALAMANCA NETO, Carlos Alberto. **Desenvolvimento de (bios)sensores a partir de biomateriais de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05**: Aplicação em matrizes farmacêutica, biológica e alimentícia. 2022. 121 f. Tese (Doutorado em Química) – Associação UEL/UEPG/Unicentro – Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

Botriosferana e lacase são biomoléculas produzidas pelo fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. Esses biomateriais foram empregados na modificação de eletrodos para a construção de (bio)sensores voltamétricos. O polissacarídeo derivatizado carboximetil-botriosferana foi usado para melhorar a dispersão de nanotubos de carbono de paredes múltiplas em água. Essa dispersão foi aplicada na modificação de um eletrodo de carbono vítreo para construir um sensor voltamétrico sensível para a determinação de desloratadina, um anti-histamínico tricíclico. Já a associação de botriosferana e lacase foi empregada na construção de um biossensor para a determinação de ácidos clorogênicos em amostras de café coado. A composição do biossensor foi otimizada e apenas uma pequena quantidade de lacase em relação a botriosferana proporcionou uma maior resposta do biossensor, indicando uma maior atividade de lacase quando mantida em condições próximas a do seu habitat natural. Ambos, sensor e biossensor foram caracterizados usando espectroscopia de impedância eletroquímica, e os parâmetros experimentais foram avaliados. Os eletrodos quimicamente modificados (sensor e biossensor) foram empregados em análises compreendendo matrizes farmacêutica, biológica e alimentícia. O sensor foi aplicado em análises para o controle de qualidade de formulações farmacêuticas contendo desloratadina, e foi capaz de determinar esse fármaco em soro de rato, enquanto o biossensor de lacase apresentou exatidão satisfatória para a análise de ácidos clorogênicos em cafés coados, e com auxílio de ferramentas quimiométricas foi capaz de diferenciar cafés especiais de tradicionais.

Palavras-chave: carboximetil-botriosferana. botriosferana. lacase. controle de qualidade. desloratadina. quimiometria. ácidos clorogênicos.

ABSTRACT

ROSSI SALAMANCA NETO, Carlos Alberto. **Development of (bio)sensors based on biomaterials from *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05**: Analysis of pharmaceutical, biological, and alimentary matrices. 2022. 121 p. Tese (Doutorado em Química) – Associação UEL/UEPG/Unicentro – Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

Botryosphaeran and laccase are biomolecules produced by the ascomycete fungus *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. These biomaterials were used in the modification of electrodes for the construction of voltammetric (bio)sensors. The derivatized polysaccharide carboxymethyl-botryosphaeran improved the dispersion of multi-walled carbon nanotubes in water. This feature was applied to modify a glassy carbon electrode for the sensitive determination of desloratadine, a tricyclic antihistamine. The association of botryosphaeran and laccase was used in the construction of a biosensor for chlorogenic acid determination in brewed coffee beverages. The biosensor composition was optimized and only a small amount of laccase in relation to botryosphaeran resulted in a greater biosensor response, indicating a higher laccase activity when it is kept in conditions close to its natural habitat. Both sensor and biosensor were characterized using electrochemical impedance spectroscopy, and the experimental parameters were evaluated. The chemically modified electrodes (sensor and biosensor) were employed in pharmaceutical, biological, and alimentary matrices. The sensor was applied in the quality control analysis of pharmaceutical formulations containing desloratadine and was able to determine this drug in rat serum; the laccase biosensor presented satisfactory accuracy for analysis of chlorogenic acid content in brewed coffees, and with the aid of chemometrics was able to discriminate specialty coffees from traditional ones.

Key words: carboxymethyl-botryosphaeran. botryosphaeran. laccase. quality control analysis. desloratadine. chemometrics. chlorogenic acids.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

- Figura 1** Variação do potencial em relação ao tempo na VOQ, onde estão marcados os instantes nos quais ocorre a medida da corrente22
- Figura 2** – Estrutura tridimensional do (A) grafite e (B) óxido de grafite.....28
- Figura 3** – Estrutura tridimensional esquemática dos (A) nanotubos de carbono de parede única e (B) nanotubos de carbono de paredes múltiplas31
- Figura 4** – Reação de oxidação catalisada pela lacase de orto-/para-fenóis para orto-/para-quinonas e redução eletroquímica de oxigênio molecular para água.....35
- Figura 5** – Representação gráfica de diferentes tipos de imobilização enzimática37
- Figura 6** – Estrutura química da carboximetil-botriosferana40

CAPÍTULO 1

- Figura 1** – Estrutura química da desloratadina.....43
- Figura 2** – Representação esquemática da célula eletroquímica contendo três eletrodos, eletrodo auxiliar, de referência e de trabalho, além do orifício para adição das alíquotas.....47
- Figura 3** – Fotografia de uma placa de Petri contendo (A) 5 mL de uma suspensão de NTCPM em água (1 mg mL⁻¹), (B) 5 mL de uma suspensão de NTCPM (1 mg mL⁻¹) em uma mistura de água com botriosferana liofilizada sem derivatização química (1 mg mL⁻¹), e (C) 5 mL da dispersão de NTCPM (1 mg mL⁻¹) estabilizados com 1 mg mL⁻¹ de botriosferana derivatizada quimicamente por carboximetilação. As fotos foram tiradas após sonicação das soluções por 30 min52
- Figura 4** – Imagens obtidas por MEV dos seguintes ECV modificados: (A) ECV/CMB, (B) ECV/NTCPM, e (C) ECV/NTCPM-CMB.....54
- Figura 5** – Voltamogramas cíclicos em várias velocidades de varredura para o par redox [Fe(CN)₆]³⁻/⁴⁻, obtidos usando os seguintes eletrodos (A) ECV, (B) ECV/CMB, (C) ECV/NTCPM e (D)

	ECV/NTCPM-CMB.....	56
Figura 6	– Relação entre corrente de pico e raiz quadrada das velocidades de varredura obtidos a partir dos voltamogramas cíclicos para o par redox $[Fe(CN)_6]^{3-}/4-$ usando os seguintes eletrodos (A) ECV, (B) ECV/CMB, (C) ECV/NTCPM e (D) ECV/NTCPM-CMB...	57
Figura 7	– Diagrama de Nyquist para os espectros de impedância eletroquímica dos ECV, ECV/CMB, ECV/NTCPM e ECV/NTCPM-CMB em solução de $[Fe(CN)_6]^{3-}/4-$ 10 mmol L ⁻¹ e KCl 0,5 mol L ⁻¹ no intervalo de frequência de 100 KHz a 0,1 Hz e potencial aplicado de 0,27 V vs Ag/AgCl. Inserido: Amplificação da região de alta frequência do espectro para os ECV/NTCPM e ECV/NTCPM-CMB.....	58
Figura 8	– Voltamogramas cíclicos (50 mV s ⁻¹) de DESL na concentração de 99,0 μmol L ⁻¹ em solução tampão fosfato (pH 8,0) empregando o ECV (—), ECV/CMB (—), ECV/NTCPM (—) e o ECV/NTCPM-CMB (—).....	61
Figura 9	– Voltamogramas cíclicos da DESL na concentração de 99,0 μmol L ⁻¹ em solução tampão fosfato (pH 8,0), obtidos em diferentes velocidades (5 – 200 mV s ⁻¹), usando o ECV/NTCPM-CMB.....	63
Figura 10	– Voltamogramas cíclicos (50 mV s ⁻¹) de DESL na concentração de 99,0 μmol L ⁻¹ usando o ECV/NTCPM-CMB em solução tampão fosfato com o pH ajustado de 6,0 a 10,0. Inserido: relação linear entre o potencial de oxidação e o valor de pH.....	65
Figura 11	– Voltamogramas de varredura linear para diversas concentrações de DESL em solução tampão fosfato (pH 8,0), empregando velocidades de varredura de (A) 10, (B) 25, (C) 50 e (D) 75 mV s ⁻¹	67
Figura 12	– Curvas analíticas obtidas em diferentes velocidades de varredura para a DESL em solução tampão fosfato (pH 8,0) usando o ECV/NTCPM-CMB e VVL.....	68
Figura 13	– Voltamogramas de varredura linear para DESL na concentração de 4,98 μmol L ⁻¹ em solução tampão fosfato (pH 8,0) e os possíveis agentes interferentes na concentração de 49,5 μmol L ⁻¹ . Inserido: Amplificação da região da oxidação da DESL.....	71

Figura 14 – Voltamogramas de varredura linear (25 mV s^{-1}) para a amostra de soro de rato, amostra de soro de rato dopada com DESL e mais quatro adições da solução de trabalho de DESL, em solução tampão fosfato (pH 8,0) empregando o ECV/NTCPM-CMB. Inserido: Curva de adição de padrão para a análise de DESL em soro de rato dopado.....74

CAPÍTULO 2

Figura 1 – Estrutura química do ácido 5-cafeoilquínico, composto majoritário do grupo dos ácidos clorogênicos81

Figura 2 – Fotografia do tubo de Teflon® com cavidade gráfica para o acômodo da pasta de óxido de grafite para ser utilizado como eletrodo de trabalho (biossensor).....86

Figura 3 – (A) Planejamento estatístico de mistura compreendendo componentes puros (\circ), misturas binárias (\bullet) e misturas ternárias (\diamond - proporções diferentes e \blacklozenge - proporções iguais) para a construção do biossensor. As condições experimentais estão indicadas numericamente. (B) Gráfico de superfície de resposta obtidos para diversas composições de PtNPs, BOT e lacase na construção do biossensor. As cores indicam a corrente obtida para a redução de 5-ACQ pelo biossensor91

Figura 4 – Diagramas de Nyquist do (verde) eletrodo de pasta de óxido de grafite e suas modificações com (azul) PtNPs, (vermelho) PtNPs e BOT e (preto) PTNPs, BOT e lacase, em solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ no intervalo de frequência de 100 KHz e 0.1 Hz. Eaplicado = $0,322 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ 93

Figura 5 – Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando o biossensor de lacase para diferentes concentrações de 5-ACG ($0,56 - 7,3 \mu\text{mol L}^{-1}$) em solução tampão fosfato (pH 4,0). Inserido: a respectiva curva analítica com ajuste linear (linha vermelha) e intervalos de confiança em 95% de nível de confiança (linhas verdes)98

Figura 6 – (A) Gráfico de correlação entre os resultados obtidos por CLAE

e obtidos pelo biossensor voltamétrico de lacase para a determinação de ácidos clorogênicos. A linha vermelha indica o ajuste linear com coeficiente de correlação de Pearson de 97,5 %. (B) Gráfico de Bland-Altman para a concordância entre os resultados obtidos pelo método cromatográfico e o método voltamétrico usando o biossensor de lacase. A linha preta indica a média e as linhas tracejadas indicam os limites de concordância a 95% de confiança102

Figura 7 – Impressão digital por VOQ de cafés coados analisados pelo biossensor de lacase104

Figura 8 – Escores das duas primeiras componentes principais da impressão digital por VOQ de bebidas de cafés coados tradicionais mostrando o padrão de discriminação105

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO GERAL

- Tabela 1** – Limites aproximados de potenciais catódico e anódico de eletrodos de trabalho comumente empregados em análises voltamétricas em soluções aquosas.....24
- Tabela 2** – Procedimentos selecionados que foram recentemente publicados para a preparação de suspensão/dispersão de NTCPM para modificação de eletrodos por gotejamento e evaporação de solvente32

CAPÍTULO 1

- Tabela 1** – Valores de área eletroativa, estimados por meio da equação de Randles-Sevcik, resistência de transferência eletrônica e constante heterogênea da velocidade de transferência de elétrons obtidos pela EIE para o ECV e suas respectivas modificações59
- Tabela 2** – Parâmetros analíticos e estatísticos das curvas analíticas de DESL obtidas com o ECV/NTCPM-CMB em diferentes velocidades de varredura usando VVL.....69
- Tabela 3** – Repetibilidade e precisão intermediária para DESL empregando o ECV/NTCPM-CMB.....70
- Tabela 4** – Efeito de diferentes proporções de agentes interferentes na resposta relativa de DESL no ECV/NTCPM-CMB em solução tampão fosfato (pH 8,0).....72
- Tabela 5** – Resultados obtidos para a análise de DESL em comprimidos e xarope comercialmente disponíveis por VVL em solução tampão fosfato (pH 8,0) empregando o ECV/NTCPM-CMB em comparação com os resultados obtidos pelo método espectrofotométrico validado73
- Tabela 6** – Características e parâmetros analíticos de métodos voltamétricos para a determinação de DESL, em ordem cronológica.....76

CAPÍTULO 2

- Tabela 1** – Planejamento estatístico de mistura para a construção do biossensor baseado na modificação do eletrodo de pasta de óxido de grafite com os componentes PtNPs, BOT e lacase87
- Tabela 2** – Matriz experimental de planejamento fatorial 24 e os respectivos resultados para otimização de pH e parâmetros operacionais da VOQ para determinação de 5-ACG pelo biossensor95
- Tabela 3** – Matriz experimental de planejamento de composto central e os respectivos resultados para otimização de parâmetros operacionais da VOQ para determinação de 5-ACG pelo biossensor.....96
- Tabela 4** – Resultados obtidos na determinação de ácidos clorogênicos (em termos de 5-ACG) em bebidas de cafés especiais e tradicionais pelo método voltamétrico empregando o biossensor de lacase e pelo método cromatográfico100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-ACG	Ácido – 5-Cafeoilquínico
A	Amplitude de Potencial
ACP	Análise de Componentes Principais
BOT	Botriosferana
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMB	Carboximetil-Botriosferana
CP	Componente Principal
DESL	Desloratadina
DPR	Desvio Padrão Relativo
E	Potencial
ECV	Eletrodo de Carbono Vítreo
ECV/CMB	Eletrodo de Carbono Vítreo Modificado com Carboximetil-Botriosferana
ECV/NTCPM	Eletrodo de Carbono Vítreo Modificado com Nanotubos de Carbono de Paredes Múltiplas
ECV/NTCPM-CMB	Eletrodo de Carbono Vítreo Modificado com Nanotubos de Carbono de Paredes Múltiplas e Carboximetil-Botriosferana
EDDB	Eletrodo de Diamante Dopado com Boro
EHGGP	Eletrodo de Mercúrio de Gota Pendente
EIE	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica
$E_{(P/2)}$	Potencial de Meio Pico
E_P	Potencial de Pico
F	Frequência de Onda Quadrada
I	Corrente
IP	Corrente de Pico
KAP	Constante Heterogênea de Velocidade Aparente
LCE	Extrato Bruto de Lacase
LD	Limite de Detecção
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NPSPT	Nanopartículas de Platina
NTC	Nanotubos de Carbono
NTCPM	Nanotubos de Carbono de Paredes Múltiplas

RTC	Resistência de Transferência de Carga
VOQ	Voltametria de Onda Quadrada
VPD	Voltametria de Pulso Diferencial
VVL	Voltametria de Varredura Linear
N	Número de Elétrons
V	Velocidade de Varredura
A	Coefficiente de Transferência de Carga
ΔE	Incremento de Potencial

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO.....	19
2	INTRODUÇÃO GERAL.....	20
2.1	VOLTAMETRIA	20
2.2	ELETRODOS DE TRABALHO	23
2.3	ELETRODOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS.....	25
2.4	MATERIAIS A BASE DE CARBONO USADOS NA MODIFICAÇÃO DE ELETRODOS ..27	
2.4.1	Grafite e Óxido de Grafite.....	29
2.4.2	Nanotubos de Carbono.....	30
2.5	BOTRYOSPHERIA RHODINA	34
2.5.1	Lacases	34
2.5.2	β -D-glucana	38
2.5.2.1	Grafite e óxido de grafite	40
	CAPÍTULO 1	42
1	INTRODUÇÃO	43
2	MATERIAIS E MÉTODOS	46
2.1	REAGENTES E SOLUÇÕES.....	46
2.2	INSTRUMENTAÇÃO.....	47
2.3	PRODUÇÃO DA CARBOXIMETIL-BOTRIOSFERANA.....	48
2.4	PREPARO DO ELETRODO MODIFICADO.....	49
2.5	PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS	49
2.6	PREPARO DAS AMOSTRAS DE MEDICAMENTOS E ANÁLISE	50
2.7	PREPARO DA AMOSTRA DE SORO DE SANGUE DE RATO E ANÁLISE	51
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
3.1	DISPERSÃO DE NTC _{PM} EM SOLUÇÃO AQUOSA DE CMB E CONSTRUÇÃO DE ELETRODOS DE TRABALHO	51
3.2	CARACTERIZAÇÃO DOS ELETRODOS MODIFICADOS	53
3.2.1	Morfológica	53

3.2.2	Voltamétrica com Estimativa de Área Eletroativa	55
3.2.3	Espectroscópica	58
3.3	DESEMPENHO ELETROQUÍMICO DOS ELETRODOS OBTIDOS PARA O SENSORIAMENTO DE DESL	60
3.4	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO VOLTAMÉTRICO PARA A DETERMINAÇÃO DE DESL	64
3.4.1	Efeito do pH.....	64
3.4.2	Curva Analítica	66
3.4.3	Precisão.....	69
3.4.4	Seletividade	70
3.4.5	Exatidão.....	72
3.5	COMPARAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO COM MÉTODOS VOLTAMÉTRICOS PREVIAMENTE PUBLICADOS PARA A DETERMINAÇÃO DE DESL	74
4	CONCLUSÃO.....	78
	CAPÍTULO 2	79
1	INTRODUÇÃO	80
2	MATERIAIS E MÉTODOS	83
2.1	REAGENTES E SOLUÇÕES.....	83
2.2	INSTRUMENTAÇÃO.....	83
2.3	PREPARO DA PASTA DE ÓXIDO DE GRAFITE	84
2.4	PRODUÇÃO DE LACASE E BOT PELO FUNGO BOTRYOSPHERIA RHODINA MAMB-05.....	84
2.5	SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PLATINA	85
2.6	CONSTRUÇÃO DO BIOSENSOR.....	85
2.7	PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS E ESTATÍSTICA.....	87
2.8	AMOSTRAS DE CAFÉ E PREPARO DA BEBIDA	89
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	89
3.1	PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO DE MISTURA PARA A CONSTRUÇÃO DO BIOSENSOR	90

3.2	CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DO BIOSENSOR	92
3.3	PLANEJAMENTO FATORIAL PARA A OTIMIZAÇÃO DA RESPOSTA PARA ÁCIDOS CLOROGÊNICOS	94
3.4	CURVA ANALÍTICA PARA O 5-ACG USANDO O BIOSENSOR DE LACASE E AVALIAÇÃO DE ESTABILIDADE DE ARMAZENAMENTO E VIDA ÚTIL	97
3.5	ANÁLISE DE BEBIDAS DE CAFÉS TRADICIONAIS E ESPECIAIS	99
3.6	DISCRIMINAÇÃO DE CAFÉS ESPECIAIS E TRADICIONAIS PELA IMPRESSÃO VOLTAMÉTRICA (VOQ) E ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS.....	103
4	CONCLUSÃO.....	106
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	107
	REFERÊNCIAS.....	108

1 APRESENTAÇÃO

Esta tese de doutorado é composta, inicialmente, por uma Introdução Geral que apresenta os materiais nanoestruturados e biomateriais produzidos pelo fungo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 utilizados para o desenvolvimento de duas plataformas eletroquímicas, uma sensorial e outra biossensorial, e aplicação na determinação de analitos de interesse farmacêutico, biológico e ambiental.

Na sequência, o Capítulo 1 apresenta o desenvolvimento e aplicação de um sensor voltamétrico obtido a partir de uma dispersão de nanotubos de carbono de paredes múltiplas em solução aquosa de carboximetil-botriosferana, um polissacarídeo derivatizado quimicamente da botriosferana (biopolímero produzido pelo fungo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05). O sensor foi caracterizado e aplicado na determinação do teor de desloratadina em comprimidos e solução oral. O sensor também foi aplicado na determinação de desloratadina em amostra de soro de rato. Os resultados deste estudo foram publicados na revista *Talanta*, e um pedido de patente foi depositado em relação ao processo de obtenção do sensor.

Por fim, o Capítulo 2 apresenta o desenvolvimento de um biossensor voltamétrico baseado na modificação de um eletrodo de pasta de óxido de grafite com uma mistura de nanopartículas de platina, botriosferana e enzima lacase, como agente de bioreconhecimento, também produzida pelo fungo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. Ferramentas quimiométricas foram empregadas nas etapas de desenvolvimento do biossensor e aplicação do dispositivo na determinação de ácidos clorogênicos em cafés coados. O biossensor, juntamente com análise de componentes principais, foi capaz de discriminar cafés tradicionais e especiais pela impressão digital voltamétrica. Os resultados deste estudo estão publicados na revista *Food Chemistry*.

2 INTRODUÇÃO GERAL

Nos últimos anos, o número de publicações envolvendo o desenvolvimento de métodos analíticos alternativos para o controle de qualidade de produtos farmacêuticos e alimentares tem aumentado exponencialmente (USLU; OZKAN, 2011; BALUCHOVÁ et al., 2019; PÉREZ-RÀFOLS et al., 2019; BOUNEGRU; APETREI, 2020). Isso é resultado de uma corrente centrada principalmente em questões ambientais e econômicas, fruto da necessidade de se obter resultados confiáveis utilizando menores quantidades de produtos químicos, gerando menos resíduos a serem descartados no meio ambiente (ANASTAS, 1999).

O controle de qualidade de medicamentos se faz necessário e importante para atender à legislação, bem como garantir segurança e eficácia no tratamento do paciente. Métodos analíticos também são amplamente úteis e empregados na área clínica para monitoramento da saúde do paciente, principalmente nas análises de substâncias químicas em fluidos biológicos. Em adição, o controle de qualidade de alimentos garante as características nutricionais e sanitárias necessárias para cumprir especificações preconizadas pela legislação e, conseqüentemente, atender às expectativas dos consumidores.

O desenvolvimento de métodos analíticos que buscam atender aos requisitos supracitados é cada vez mais recorrente, pois favorecem a operacionalização e implantação em substituição aos métodos já comumente utilizados (DE LA ROCA et al., 2007). No geral, o emprego dos métodos eletroanalíticos, favorece o desenvolvimento de procedimentos analíticos simples, rápidos, precisos, sensíveis, de relativo baixo custo, com o uso mínimo de reagentes ambientalmente tóxicos. Dentre eles, as técnicas voltamétricas possibilitam análises de amostras que sejam coloridas ou que apresentem partículas sólidas em suspensão, sem a necessidade de etapas adicionais no preparo ou tratamento das mesmas.

2.1 VOLTAMETRIA

O uso de técnicas voltamétricas possibilita a obtenção de uma grande variedade de informações que podem descrever e caracterizar determinados

sistemas. A voltametria cíclica (VC), por exemplo, é uma ferramenta muito utilizada para obtenção de dados qualitativos das reações eletroquímicas. Na maioria das vezes, é o primeiro experimento a ser realizado quando se quer investigar o comportamento voltamétrico dos analitos sobre os eletrodos (ARISTOV; HABEKOST, 2015).

Na VC, o potencial aplicado à célula eletroquímica varia linearmente na forma de onda triangular. A varredura de potencial é iniciada a partir de um potencial inicial (E_i), o qual é aumentado até alcançar um potencial definido como potencial de retorno (E_r), no qual há a inversão do sentido de varredura, onde ocorre uma nova varredura de potencial, no sentido inverso, até um potencial final (E_f), que pode ou não ser o mesmo do potencial inicial. Este processo corresponde a um ciclo de varredura.

A partir dos voltamogramas cíclicos, pode-se identificar características das reações eletroquímicas como reversibilidade, quasi-reversibilidade ou irreversibilidade que estão relacionadas com a velocidade de reação e sua constante k (GREEF et al., 1985; GOSSER, 1993; WANG, 2000; BARD; FAULKNER, 2001). Com o emprego da VC é possível conhecer e estimar algumas características dos componentes envolvidos na análise, tais como a área eletroativa dos eletrodos e mecanismo de transporte de massa das espécies em solução (GOSSER, 1993; CHRISTENSEN; HAMNETT, 1994).

Além disso, no estudo da velocidade de varredura, um deslocamento do potencial de oxidação para valores mais positivos ou o deslocamento do potencial de redução para valores mais negativos, conforme a velocidade de varredura aumenta, é característico de reações irreversíveis, enquanto que para as reações reversíveis, o potencial permanece constante com a variação da velocidade de varredura (NICHOLSON; SHAIN, 1964; BRETT; BRETT, 1993; GOSSER, 1993; CHRISTENSEN; HAMNETT, 1994).

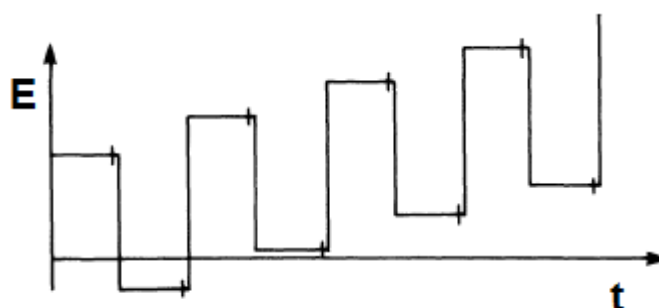
Apesar da VC ser a técnica mais empregada para análises exploratórias de sistemas eletroquímicos, outras técnicas voltamétricas são empregadas para análises quantitativas. A voltametria de varredura linear (VVL) é similar à VC, mas ao invés da aplicação do potencial ser cíclico, em ambas as direções, na VVL a varredura de potencial é variada em apenas uma única direção, variando de um E_i até um E_f . A VVL foi usada para determinar heparina em injeções baseada na interação do princípio ativo com o corante vermelho neutro usando um

eletrodo de mercúrio (SUN et al., 2007). Um eletrodo de grafite foi usado para a determinação de hipoclorito em agentes branqueadores usando VVL com um limite de detecção (LD) de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ (PATHIRATNE; SKANDARAJA; JAYASENA, 2008).

As técnicas voltamétricas de pulso, como voltametria de onda quadrada (VOQ) e voltametria de pulso diferencial (VPD) possuem uma maior sensibilidade, bem como também possibilitam a obtenção de menores limites de detecção e quantificação do que a VC, devido à minimização da interferência da corrente capacitiva na medida da corrente faradaica. A corrente capacitiva decorre da simples polarização dos eletrodos na célula eletroquímica, enquanto a faradaica é a corrente originada pelo fluxo de elétrons envolvidos na reação eletródica. No momento de aplicação do pulso de potencial, há um aumento no valor de ambas as correntes, sendo que há uma maior contribuição da corrente capacitiva na corrente total medida. Esta corrente possui uma taxa de decaimento com o tempo maior que a corrente faradaica e, dessa forma, a medida de corrente pode ser realizada após um intervalo de tempo, no qual a contribuição da corrente capacitiva pode ser negligenciada, e então somente a corrente faradaica é medida (BRETT; BRETT, 1993; SCHOLZ, 2010).

A VOQ é muito empregada para análise quantitativa. Nela os pulsos de potencial de mesma amplitude são aplicados numa frequência (f) sobre uma escada de potencial de incremento de potencial (ΔE) definido como esquematizado na Figura 1.

Figura 1 – Variação do potencial em relação ao tempo na VOQ, onde estão marcados os instantes nos quais ocorre a medida da corrente.



Fonte: Adaptado de Brett e Brett (1993)

Na VOQ a corrente é medida no final de cada pulso de potencial, tanto no sentido direto, quanto no sentido reverso, sendo que essas correntes são subtraídas e plotadas contra o potencial aplicado para dar origem ao voltamograma. A VOQ é uma técnica muito rápida podendo atingir 1000 mV s^{-1} e, devido à contribuição das correntes de oxidação e de redução, esta técnica é aplicada principalmente na determinação de espécies que apresentam reações eletroquímicas reversíveis tais como dopamina (RAJ; TOKUDA; OHSAKA, 2001; TIAN et al., 2012), penicilina V (ŠVORC et al., 2012) e triptamina (COSTA et al., 2016).

Nas técnicas voltamétricas, a variação de corrente elétrica devida ao comportamento redox dos compostos químicos, é medida entre dois eletrodos: o eletrodo auxiliar e o eletrodo de trabalho, no qual o composto químico é reduzido ou oxidado. A escolha do eletrodo de trabalho é extremamente importante, e deve-se levar em conta a faixa de potencial de trabalho que o eletrodo apresenta, o potencial de oxidação e/ou redução e a interação do eletrodo com o composto que se pretende analisar.

2.2 ELETRODOS DE TRABALHO

Para sistemas aquosos, a faixa de potencial de trabalho é delimitada pelas reações de decomposição da água, ou seja, o limite catódico é o potencial no qual ocorre evolução de hidrogênio (H_2) e o limite anódico é o potencial no qual ocorre evolução de oxigênio (O_2). Também pode ser delimitada por reações de decomposição e/ou oxidação/redução do material do eletrodo. Essa faixa de potencial é específica de cada eletrodo e é dependente do tipo do material empregado na construção do eletrodo e do eletrólito suporte no qual o eletrodo está imerso. A Tabela 1 mostra os principais eletrodos empregados nas análises voltamétricas e seus respectivos limites de potenciais catódico e anódico nos respectivos eletrólitos suporte aquosos.

Tabela 1 – Limites aproximados de potenciais catódico e anódico de eletrodos de trabalho comumente empregados em análises voltamétricas em soluções aquosas

Material do eletrodo	Eletrólito suporte	Potencial limite catódico (V)	Potencial limite anódico (V)	Faixa de potencial de trabalho
Platina	KCl 0,1 mol L ⁻¹	-0,5	+1,1	1,6
Mercúrio	KCl 0,1 mol L ⁻¹	-1,9	+0,2	2,1
Grafite	H ₂ SO ₄ 0,5 mol L ⁻¹	-0,7	+1,5	2,2
Carbono vítreo	KCl 0,1 mol L ⁻¹	-1,0	+1,4	2,4
DDB*	H ₂ SO ₄ 0,5 mol L ⁻¹	-1,1	+2,4	3,5

*DDB: diamante dopado com boro.

Fonte: (BRETT; BRETT, 1993; BARD; FAULKNER, 2001; KRAFT, 2007)

Com base nos dados da Tabela 1, pode se perceber que o eletrodo de mercúrio é indicado para compostos que apresentam reação de redução, visto que possui uma ampla faixa catódica de potencial. Por outro lado, os eletrodos de platina e a base de carbono (grafite, carbono vítreo e DDB, por exemplo) apresentam uma faixa de potencial na região anódica, com destaque ao eletrodo de DDB, que possui a maior amplitude da faixa de potenciais de trabalho em solução aquosa, de 3,5 V, porém é de difícil obtenção e relativamente mais caro. Esses ainda são muito empregados para o desenvolvimento de métodos voltamétricos para a determinação de diferentes compostos em diferentes tipos de amostras (HAMMAM, 2004; ALMEIDA et al., 2012; SALAMANCA-NETO et al., 2016, 2018; LENIART et al., 2018).

Por outro lado, eletrodos de pasta de carbono, preparados com grafite são altamente versáteis, de preparo e manuseio fáceis e baixo custo. Para a confecção desses eletrodos, o grafite pode ser misturado com um aglomerante podendo ser molecular (polímeros, parafina ou óleo mineral) ou iônico (líquidos iônicos) e a pasta formada é alocada em um suporte contendo um contato elétrico. A superfície de um eletrodo de pasta é facilmente fisicamente renovada usando papel macio ou até mesmo uma espátula, e assim garante uma superfície nova para cada medida. Um eletrodo de pasta de grafite foi empregado na determinação de ácido ascórbico em extratos de gengibre (TESFAYE; ASAYE, 2021). O eletrodo construído com a pasta, de composição 80% (m/m) de grafite e 20% de óleo mineral, apresentou um LD de 2,02

$\mu\text{mol L}^{-1}$ e foi satisfatoriamente empregado em análises de amostras reais com recuperação próxima de 100%. O polímero biodegradável policaprolactona também foi usado como aglomerante para o preparo de um eletrodo de pasta de grafite (DA SILVA et al., 2020). Esse eletrodo foi empregado satisfatoriamente na determinação simultânea dos anti-hipertensivos besilato de anlodipino e hidroclorotiazida em amostras de urina sintética.

Um dos eletrodos de carbono mais empregados em eletroanalítica é o eletrodo de carbono vítreo (ECV). Esse eletrodo é formado principalmente por carbono hibridizado em sp^2 não grafitico com alguns traços de carbono sp^3 e discretos fragmentos de fulereno, o qual é quimicamente resistente e apresenta uma corrente de fundo relativamente baixa (YI et al., 2017). Recentemente, Salamanca-Neto *et al.* empregaram um ECV não modificado para a determinação indireta de enxofre elementar em cosméticos (SALAMANCA-NETO et al., 2018). A determinação foi realizada com base na reação entre o enxofre elementar e a trifenilfosfina em meio metanólico contendo uma mistura de ácido acético e acetato de sódio. O método desenvolvido obteve um LD de $2,59 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o enxofre elementar e foi aplicado com sucesso em creme antiacne e sabonetes dermatológicos (SALAMANCA-NETO et al., 2018).

O ECV também foi empregado na determinação do fungicida oxicarboxina (LENIART et al., 2018). Com os parâmetros da VOQ otimizados, o método proposto apresentou um LD de $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e foi aplicado em amostras de água de rio. Ainda, Leniart e colaboradores (2018) propuseram o desenvolvimento de um método para a determinação da oxicarboxina baseado em um ECV modificado com nanotubos de carbono (NTC). A adição de NTC na superfície do ECV foi responsável pela diminuição do LD para $1,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ e pelo aumento no intervalo de concentração de oxicarboxina. A modificação de eletrodos é uma estratégia muito empregada em eletroanalítica que promove um aumento do sinal analítico e, conseqüentemente, uma diminuição do LD ou, também, é empregada para aumentar a seletividade de determinado sistema.

2.3 ELETRODOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS

Segundo a IUPAC, um eletrodo quimicamente modificado é um eletrodo composto de material condutor ou semicondutor revestido com um filme de

um modificador selecionado, podendo ser monomolecular, multimolecular, iônico ou polimérico que, por meio de reações faradaicas (de transferência de carga) ou por meio de diferenças de potencial interfaciais (sem transferência de carga), exibe propriedades químicas, eletroquímicas e/ou óticas do filme modificador (DURST et al., 1997).

Eletrodos quimicamente modificados compreendem uma abordagem aos sistemas de eletrodos onde se busca a mudança de propriedades físico-químicas da superfície do eletrodo base com a intenção de alterar o coeficiente de transferência heterogênea de elétrons e/ou promover fenômenos eletrostáticos nas superfícies dos eletrodos e fenômenos de transporte de elétrons, íons ou moléculas nos polímeros (BARD, 1983; DURST et al., 1997; SVÍTKOVÁ et al., 2016; BEITOLLAHI et al., 2018).

Em análises voltamétricas, o principal motivo para se modificar um eletrodo é promover eletrocatalise, ou seja, aumentar o sinal analítico e/ou deslocar o potencial redox do analito a fim de que ele oxide ou reduza dentro da faixa de potencial de trabalho do eletrodo específico (BARD, 1983; DURST et al., 1997; BEITOLLAHI et al., 2018).

Os eletrodos geralmente são quimicamente modificados por uma das quatro abordagens (DURST et al., 1997): 1 - Quimiossorção: em que as forças envolvidas são as forças de valência do mesmo tipo daquelas que atuam na formação de compostos químicos. O filme é fortemente adsorvido e, idealmente, de forma irreversível na superfície do eletrodo. Essa abordagem geralmente gera cobertura em monocamada. 2 - Ligação covalente: agentes de ligação cruzada, como, por exemplo, organossilanos ou cloreto cianúrico, são usados para fixar covalentemente de uma a várias camadas monomoleculares do agente modificador na superfície do eletrodo. 3 - Revestimentos de filme polimérico: filmes de polímero condutores e não condutores de elétrons são mantidos na superfície do eletrodo por alguma combinação de quimiossorção e baixa solubilidade na solução de contato ou por ancoragem física em um eletrodo poroso. O filme de polímero pode ser orgânico, organometálico ou inorgânico; já pode conter o modificador químico desejado ou esse produto químico pode ser adicionado ao polímero em uma segunda etapa de funcionalização; e pode conter o equivalente a alguns milhares de camadas monomoleculares do modificador químico. 4 - Compósito: o modificador químico é simplesmente misturado com um material de matriz de eletrodos, como no caso de um mediador de transferência eletrônica combinado com partículas de carbono (mais um agente aglutinante) de um

eletrodo de pasta de carbono.

A modificação por filme polimérico ainda pode ser subdividida em categorias de acordo com o tipo de metodologia empregada (DURST et al., 1997).

O revestimento por imersão (*dip-coating*) consiste em imergir o material do eletrodo em uma solução do polímero por um período suficiente para que a formação espontânea de filme ocorra por adsorção. A quantidade de filme neste procedimento pode ser aumentada retirando o eletrodo da solução e permitindo que o filme da solução de polímero seque no eletrodo.

O gotejamento (*droplet-evaporation* ou *drop-casting*) consiste na aplicação de uma gota de uma solução do polímero na superfície do eletrodo sendo o solvente, evaporado. Uma grande vantagem dessa abordagem é que a cobertura de polímero é imediatamente conhecida a partir da concentração da solução de polímero original e do volume da gota que foi adicionada.

O revestimento por rotação (*spin coating*) consiste na aplicação de uma gota de uma solução diluída do polímero na superfície de um eletrodo rotativo. A solução em excesso é removida da superfície e o filme fino de polímero restante é deixado secar. Múltiplas camadas são aplicadas da mesma maneira até que a espessura desejada seja obtida. Esse procedimento normalmente produz filmes finos sem orifícios.

A deposição eletroquímica (*electrochemical deposition*) depende da variação da solubilidade do polímero com o estado de oxidação, de modo que a formação de filme ocorra, geralmente irreversivelmente, quando um polímero é oxidado ou reduzido ao seu estado menos solúvel.

2.4 MATERIAIS A BASE DE CARBONO USADOS NA MODIFICAÇÃO DE ELETRODOS

Materiais a base de carbono são amplamente empregados na modificação química de eletrodos devido a suas propriedades físico-químicas apropriadas como por exemplo alta estabilidade estrutural, alta condutividade elétrica, elevada área superficial com a possibilidade de funcionalização, acarretando numa melhora das propriedades eletroquímicas dos eletrodos base. Alguns exemplos desses materiais englobam grafite, NTC, grafeno e *carbon black* (CHEN et al., 2011; TALARICO et al., 2015; ARDUINI et al., 2020).

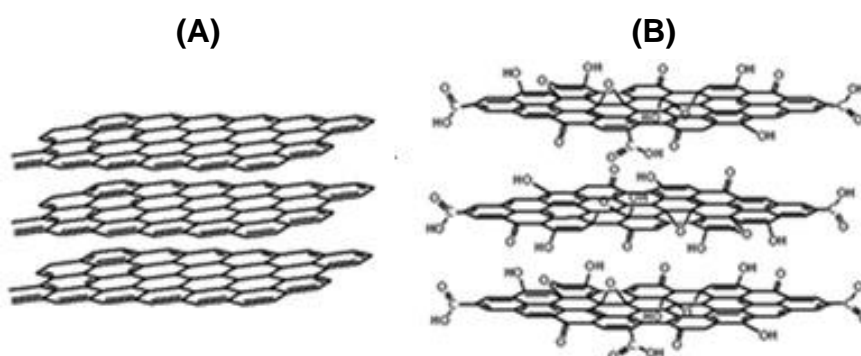
2.4.1 Grafite e óxido de grafite

Grafite é uma forma alotrópica do elemento carbono que apresenta elevada condutividade elétrica. A estrutura do grafite é composta por carbonos sp^2 em arranjo hexagonal (folhas de grafeno), dispostos em milhares de camadas (Figura 2A).

Em Eletroanalítica, o grafite é usado principalmente como material condutor no preparo de eletrodos do tipo pasta (compósitos) (MENDES; CLARO-NETO; CAVALHEIRO, 2002), os quais são fabricados por meio da mistura de um material condutor e um material aglutinante em diversas proporções a depender da finalidade e das condições de análise (MENDES; CLARO-NETO; CAVALHEIRO, 2002; VALEZI; EISELE; SARTORI, 2017; DA SILVA et al., 2020).

Modificações químicas no grafite também são empregadas com o intuito de incrementar as propriedades eletroquímicas desse material nos eletrodos. Já conhecida a mais de 150 anos, a reação de oxidação do grafite por meio de agentes fortemente oxidantes produz óxido de grafite (TRIPATHI et al., 2017). O óxido de grafite possui grupos funcionais oxigenados ligados à sua estrutura tais como carboxila, hidroxila e grupos epóxi (Figura 2B), o que faz com que as folhas fiquem mais separadas (comparados com a separação das folhas do grafite) na sua estrutura tridimensional, e ainda favorece a hidrofiliabilidade e facilidade de funcionalização e adsorção de nanopartículas e moléculas na sua superfície (SONG et al., 2011; RAY, 2015; WONG; SILVA; FATIBELLO-FILHO, 2017).

Figura 2 – Estrutura tridimensional do **(A)** grafite e **(B)** óxido de grafite.



Fonte: Adaptado de Tripathi et al. (2017).

A introdução de terminações oxigenadas na superfície do grafite foi responsável por uma melhora significativa na performance eletroquímica do eletrodo

produzido. Houve um aumento do sinal analítico e da cinética de transferência de carga para a oxirredução de hexacianoferrato de potássio (II/III) avaliada por VC e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) (WONG; SILVA; FATIBELLO-FILHO, 2017). Em outro caso, um ECV modificado com óxido de grafite foi responsável por uma maior detectabilidade de paracetamol usando VPD, comparado com o ECV não modificado e modificado com grafite (SONG et al., 2011).

Wong et al. (2017) ainda observaram que o eletrodo de pasta de óxido de grafite tinha sua área superficial aumentada quando dopado com nanopartículas de ouro. Isso acarretou um aumento do sinal analítico do sensor em 34% para o hexacianoferrato de potássio (II/III) e favoreceu a separação dos picos de oxidação dos compostos epinefrina e ácido úrico, sendo possível uma análise simultânea dessas moléculas em fluidos biológicos.

Nos últimos anos, nanopartículas metálicas atraíram muita atenção em função da sua atividade química relativamente alta devido a suas propriedades físico-químicas serem distintas daquelas apresentadas pelo mesmo metal em maiores dimensões. Isso se deve principalmente pela alta razão área superficial/volume que promove uma maior concentração de sítios não-coordenados (BAG; JANA; KASULA, 2018).

A adição de nanopartículas metálicas afeta a cinética e termodinâmica dos processos de transferência de carga e reações redox que ocorrem na superfície dos eletrodos modificados (BRAININA et al., 2018). A modificação de eletrodos com nanopartículas metálicas e outros nanomateriais aumenta a detectabilidade e melhora o grau de sensibilidade e seletividade das medições eletroquímicas (SALAMANCA-NETO et al., 2015; WONG; SILVA; FATIBELLO-FILHO, 2017; SCREMIN et al., 2018; MATTOS et al., 2021).

Os NTC são materiais de carbono nanoestruturados que apresentam uma alta razão entre a área superficial e volume e são muito empregados para a modificação de sensores eletroquímicos promovendo menores valores de LD, relativa alta sensibilidade e rápida resposta (MAZLOUM-ARDAKANI; SHEIKH-MOHSENI, 2011).

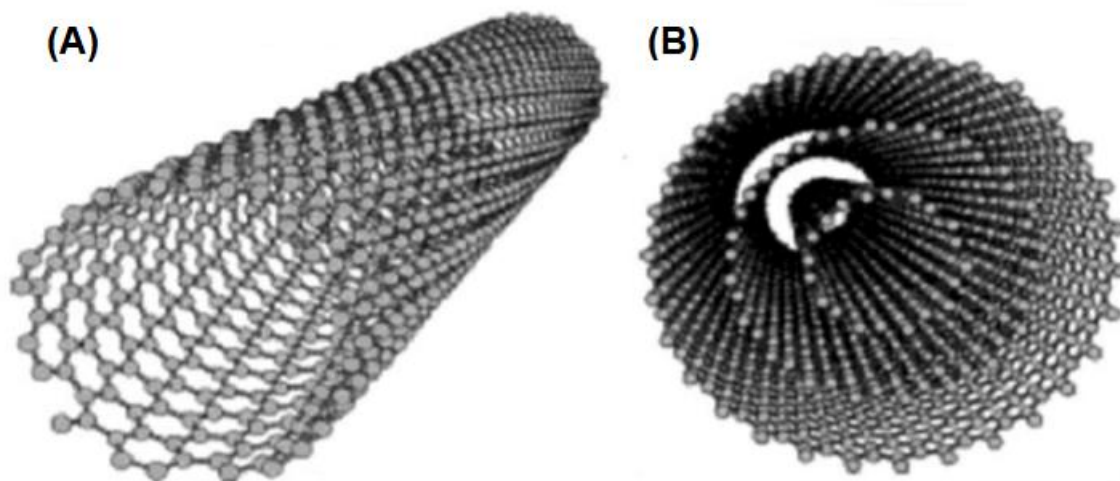
2.4.2 Nanotubos de Carbono

Os NTC são nanoestruturas de carbono sp^2 hexagonais dispostos em

forma cilíndrica podendo assumir diferentes tamanhos. São classificados em NTC de parede única (Figura 3A), os quais configuram-se em um cilindro único, e NTC de paredes múltiplas (NTC_{PM} – Figura 3B) nos quais os vários cilindros são dispostos concentricamente. Os primeiros relatos de NTC datam de 1991 (IIJIMA, 1991; MAZLOUM-ARDAKANI; SHEIKH-MOHSENI, 2011), quando foram detectados microtubos de carbono grafítico produzidos por meio do método de descarga de arco elétrico. Atualmente, os principais métodos de preparo de NTC são descarga de arco elétrico, ablação a laser e deposição de vapor químico, sendo esse último, o mais empregado (DUMITRESCU; UNWIN; MACPHERSON, 2009; MAZLOUM-ARDAKANI; SHEIKH-MOHSENI, 2011).

Os NTC possuem paredes laterais altamente hidrofóbicas devido à configuração sp^2 dos átomos de carbono. Esse nanomaterial carbonáceo oferece melhoras significativas sobre muitos materiais existentes, devido à sua grande área de superfície, facilidade para imobilizar biomoléculas, estabilidade térmica e química, excelente condutividade e grande atividade eletrocatalítica (FERREIRA; RANGEL, 2009). Essas propriedades únicas dos NTC, os tornam extremamente atraentes para a fabricação de sensores/biossensores eletroquímicos, pois favorecem a transferência de elétrons aumentando assim, a detectabilidade e sensibilidade analítica, diminuindo o potencial e aumentando a corrente gerada na oxidação/redução dos analitos analisados (RIVAS et al., 2007; BAGHBAMIDI et al., 2012; DUARTE; KUBOTA; TARLEY, 2012; SARTORI; FATIBELLO-FILHO, 2012; VALEZI et al., 2014; SALAMANCA-NETO et al., 2015; SCREMIN et al., 2018).

Figura 3 – Estrutura tridimensional esquemática dos **(A)** nanotubos de carbono de parede única e **(B)** nanotubos de carbono de paredes múltiplas.



Fonte: Adaptado de Malhotra, Srivastava e Augustine (2015).

Estudos demonstraram que os NTCs, além de melhorarem o desempenho de eletrodos já amplamente utilizados, podem aumentar a reatividade eletroquímica de biomoléculas e promover as reações de transferência de elétron em moléculas, antes, não reativas (GOODING, 2005; PÉREZ-LÓPEZ; MERKOÇI, 2012; SILVA et al., 2017).

2.4.2.1 Preparo de eletrodos modificados com nanotubos de carbono de paredes múltiplas

As características únicas dos NTC_{PM} fizeram com que muitos pesquisadores os utilizassem como agente modificador de superfícies de eletrodos. O procedimento de preparação e uso dos NTC_{PM} como agente modificador de eletrodo é baseado em sua suspensão/dispersão em um solvente específico e posterior gotejamento na superfície do eletrodo para a evaporação do solvente. Esta etapa foi descrita em muitos trabalhos e alguns exemplos de tratamento e dispersão de NTC_{PM} em solventes estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Procedimentos selecionados que foram recentemente publicados para a preparação de suspensão/dispersão de NTC_{PM} para modificação de eletrodos por gotejamento e evaporação de solvente

Tipo de NTC _{PM}	Solvente	Analito	Referência
Funcionalizado com grupos carboxílicos (> 8%)	Etanol	H ₂ O ₂	(SARAVANAN et al., 2018)
Tratado com HNO ₃ + H ₂ SO ₄ (1:3; v:v)	Água	Catecol	(RAO et al., 2018)
Tratado com HNO ₃ (35%)	DMF	Levodopa	(MIRZANASIRI et al., 2018)
Tratado com HNO ₃ (4,0 mol L ⁻¹)	DMF	Clopiralide	(ÖZCAN; GÜRBÜZ, 2018)
Primitivo	Metanol	Nifedipino e dehidrodronifedipino	(MOKHTARI; NEMATOLLAHI; SALEHZADEH, 2018)
Primitivo	Solução aquosa de β-Ciclodextrina*	Diclorofeno	(SIPA et al., 2018)
Tratado com HNO ₃ (65%)	Etanol	Bisfenol A	(THAMILSELVAN; RAJAGOPAL; SURYANARAYANAN, 2019)
Primitivo	1,3-dioxolano	Vermelho allura e azul brilhante FCF	(SIERRA-ROSALES et al., 2019)
Primitivo	DMF	Ácido ascórbico e dopamina	(MOUNESH et al., 2019)
Tratado com HNO ₃ + H ₂ SO ₄ (1:3; v:v)	DMF	Boro	(LIV; NAKIBOĞLU, 2020)
Tratado com HNO ₃ + H ₂ SO ₄ (1:3; v:v)	Água	Triptofano	(WU et al., 2020)

* 20 mg mL⁻¹; DMF: Dimetilformamida

Como pode ser observado, o uso de ácidos fortemente oxidantes é muito empregado como uma etapa de tratamento dos NTC_{PM}. Esse tratamento além de eliminar resquícios dos catalisadores empregados na síntese dos NTC_{PM}, é responsável por aumentar os defeitos das paredes dos nanotubos, responsáveis pela melhora das propriedades elétricas do nanomaterial (HERBST; FERNANDES MACÊDO; ROCCO, 2004). Além disso, o tratamento ácido dos NTC_{PM} promove a inserção de grupamentos oxigenados, tais como hidroxila e carboxila (MIRZANASIRI et al., 2018; ÖZCAN; GÜRBÜZ, 2018; RAO et al., 2018; SARAVANAN et al., 2018), aumentando sua hidrofiliçidade, facilitando assim sua dispersão em solventes polares como a água (RAO et al., 2018; WU et al., 2020).

Por outro lado, quando os NTC_{PM} não são previamente tratados, sua dispersão em água é muito difícil devido a aglomeração por meio de forças de van der Waals entre os nanotubos (HERBST; FERNANDES MACÊDO; ROCCO, 2004; LEAL et al., 2015). A dispersão de NTC_{PM} primitivos já foi relatada em solventes orgânicos tais como metanol (MOKHTARI; NEMATOLLAHI; SALEHZADEH, 2018), dimetilformamida (MOUNESH et al., 2019) e 1,3-dioxolano (SIERRA-ROSALES et al., 2019), e em soluções aquosas de moléculas ou biopolímeros anfifílicos como no caso do açúcar β -ciclodextrina, um oligossacarídeo cíclico contendo 7 resíduos de glicose ligados por ligação do tipo α -(1 \rightarrow 4) formando estruturas semelhantes a gaiolas, com interior hidrofóbico e lado externo hidrofílico (SIPA et al., 2018; ZHOU; FANG; RAMASAMY, 2019).

O uso de moléculas anfifílicas para a dispersão dos NTC_{PM} não funcionalizados em água envolve o mecanismo de envelopamento ou adsorção aleatória, no qual a parte hidrofóbica interage com as paredes dos nanotubos e a parte hidrofílica interage com as moléculas de água (FATEMI; FOROUTAN, 2016; ZHOU; FANG; RAMASAMY, 2019). Nesse processo, o diâmetro médio dos NTC_{PM} aumenta, como no caso relatado por Kumar et al. (2012), onde o diâmetro médio das nanoestruturas de carbono aumentou de 15 para 85 nm, aproximadamente, após a interação dos NTC_{PM} com quitosana.

Sabe-se também que os NTC_{PM} interagem bem com biopolímeros derivatizados quimicamente por carboximetilação, como no caso da carboximetilcelulose (DADFAR; KAVOOSI, 2015; MANDAL et al., 2016) e carboximetil-quitosana (ZENG et al., 2016; EL-GHANY, 2017). O uso de materiais de origem renovável ganha destaque para o emprego como dispersantes de materiais nanoestruturados de

carbono (SINAR; KNOFF, 2014; MANDAL et al., 2016; ZENG et al., 2016; EL-GHANY, 2017). Nesse sentido, os materiais de fontes biotecnológicas ganham destaque devido à facilidade de obtenção, controle específico de produção e sustentabilidade.

2.5 *BOTRYOSPHAERIA RHODINA*

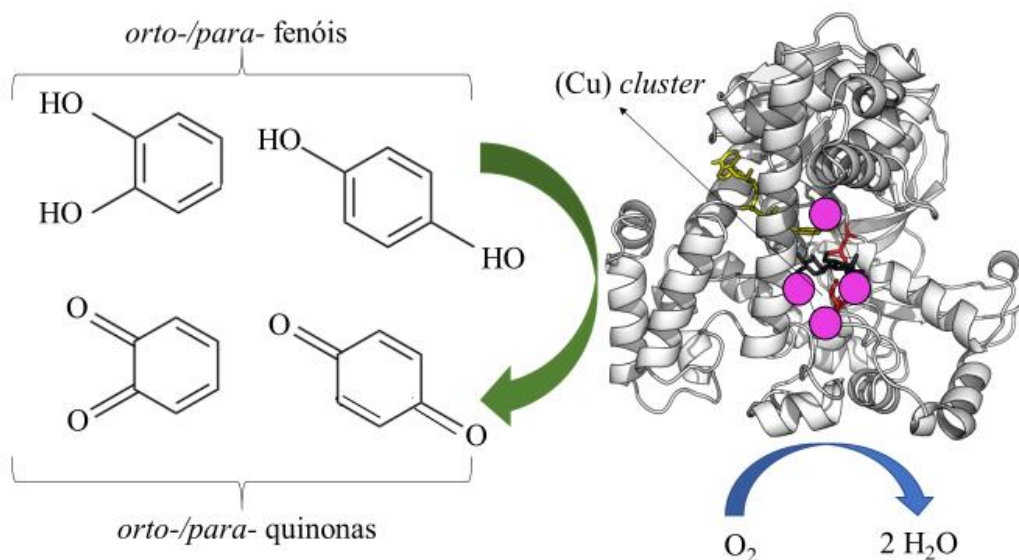
Em 1996, Barbosa, Dekker e Hardy exploraram 40 fungos ligninolíticos isolados de diversos microambientes do oeste australiano. Dentre eles, constatou-se que o fungo ascomiceto do gênero *Botryosphaeria sp.* produziu a enzima lacase constitutivamente sob fermentação submersa (BARBOSA; DEKKER; HARDY, 1996). Atualmente, sabe-se que esta espécie de fungo ascomiceto é produtora da enzima lacase constitutivamente e também de exopolissacarídeo do tipo β -D-glucana (VASCONCELOS et al., 2000; DEKKER et al., 2001; STELUTI et al., 2004; DEKKER et al., 2019).

O bioproduto majoritário produzido pelo fungo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 depende do meio de cultivo que esse fungo está submetido: quando cultivado em meio nutriente basal com álcool veratrílico produz majoritariamente a enzima lacase (VASCONCELOS et al., 2000; DEKKER et al., 2001); e quando cultivado em glucose, a viscosidade do meio de cultura aumenta devido a produção majoritária do exopolissacarídeo botriosferana, um biopolímero do tipo β -D-glucana (BARBOSA et al., 2003; DEKKER et al., 2019).

2.5.1 Lacases

Lacases (EC 1.10.3.2) pertencem à classe de enzimas polifenol multicobre oxidase. Sua estrutura é baseada em uma cadeia de glicoproteínas e um *cluster* de cobre no sítio ativo, que atua como cofator na biocatálise do processo de oxidação de orto- e para-(poli)fenóis na forma reduzida às quinonas correspondentes, reduzindo simultaneamente o oxigênio molecular (aceptor final de elétrons) à água, conforme exemplificado no esquema abaixo (Figura 4) (MOGHARABI; FARAMARZI, 2014).

Figura 4 – Reação de oxidação catalisada pela lacase de orto-/para-fenóis para orto-/para-quinonas e redução eletroquímica de oxigênio molecular para água.



Fonte: O próprio autor.

Essas enzimas são obtidas de diversas fontes biológicas, incluindo bactérias, plantas, insetos e fungos, como *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. As lacases fúngicas ganharam muita importância no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos, principalmente devido ao seu maior potencial de oxidação em comparação com as lacases de outras fontes e sua capacidade de catalisar processos de transferência de elétrons sem cofatores adicionais ou mediadores químicos (CANNATELLI; RAGAUSKAS, 2017; MORAES et al., 2019a).

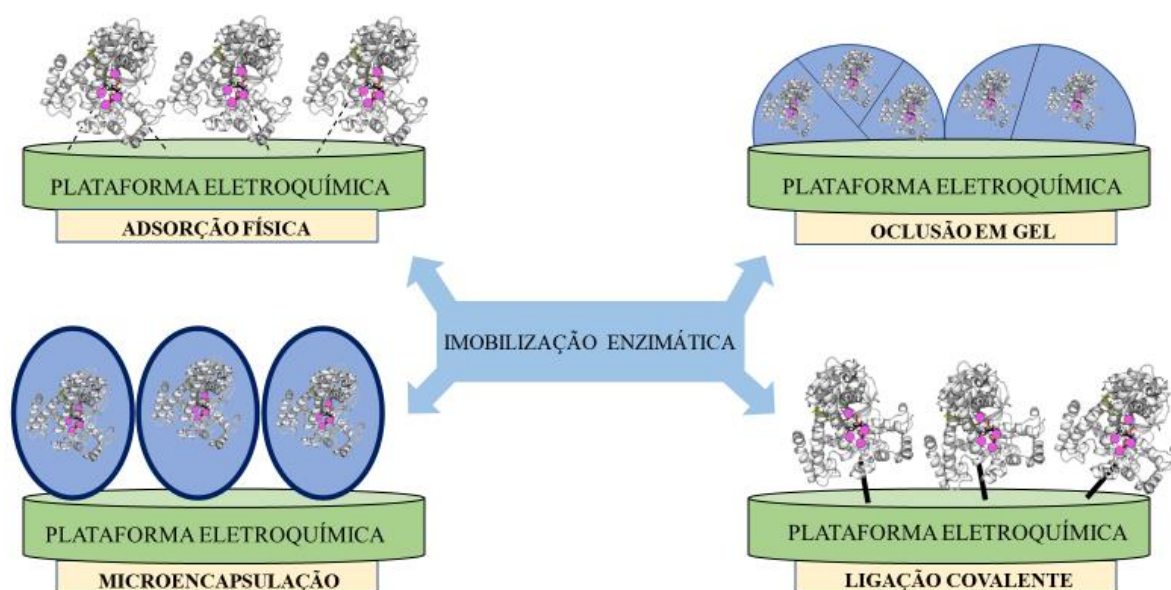
Quando imobilizada, a enzima mantém sua estabilidade, devido à estabilização da sua estrutura proteica por se apresentar menos acessível a agentes desnaturantes e ataque microbiano, além de poderem ser reutilizadas em diversas medidas. Ao se imobilizar a enzima na superfície de um sensor eletroquímico garante-se sensibilidade e seletividade às medidas eletroquímicas. O dispositivo assim obtido é chamado de biossensor e a reação que ocorre baseia-se na interação do analito com a enzima (elemento de reconhecimento biológico) sendo o sinal resultante dessa interação convertido em um sinal elétrico por meio um transdutor.

Nos biossensores à base de lacase, a serem abordados nesta tese, o elemento de reconhecimento biológico é baseado no uso do extrato bruto enzimático,

obtido por fermentação submersa do fungo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. A aplicação de extratos brutos de lacase na arquitetura de dispositivos bioeletrônicos pode resultar em problemas de seletividade. No entanto, este procedimento reduz o custo de preparação do biossensor em larga escala, além de ser mais simples e garantir maior vida útil da atividade biocatalítica quando comparado à enzima purificada (MORAES et al., 2019a), uma vez que a enzima está em seu ambiente natural.

A lacase de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05, usada como extrato bruto enzimático, tem sido aplicada na biodetecção eletroquímica de vários compostos (poli)fenólicos, com estruturas orgânicas simples e complexas, incluindo epinefrina (MORAES et al., 2019a), rutina (MATTOS et al., 2021), quercetina (GOMES et al., 2020), dopamina (COELHO et al., 2019) e também para determinação indireta de espirolactona (COELHO et al., 2019) com base em um mecanismo de inibição enzimática. Nesses biossensores, a enzima lacase foi imobilizada na superfície de eletrodos à base de carbono (transdutores) por diferentes mecanismos de imobilização enzimática. O tipo de imobilização da enzima em um suporte eletroquímico afeta diretamente o desempenho analítico do biossensor. Cada método de imobilização tem vantagens e desvantagens; assim, cada tipo de procedimento deve ser estudado levando em consideração o tempo de vida e estabilidade do elemento de bioreconhecimento (enzima), exatidão, precisão, reprodutibilidade, sensibilidade, limites de detecção e quantificação do dispositivo proposto (SASSOLAS; BLUM; LECA-BOUVIER, 2012). Os tipos mais conhecidos de imobilização enzimática incluem oclusão em gel, adsorção física, microencapsulação e ligação covalente, conforme ilustrado na Figura 5.

Figura 5 – Representação gráfica de diferentes tipos de imobilização enzimática.



Fonte: O próprio autor.

A imobilização por oclusão em gel baseia-se no confinamento da enzima nos interstícios de um gel, permitindo a difusão de substratos e produtos para dentro e fora da matriz polimérica, retendo a enzima de interesse. Diversos materiais têm sido utilizados para oclusão enzimática, como álcool polivinílico, géis de poliacrilamida, grupos aniônicos e catiônicos, entre outros. Uma desvantagem do método de oclusão está relacionada à possível perda de atividade enzimática devido à lixiviação, que é dependente do tamanho dos poros do gel (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2013).

A adsorção física é o método mais simples de imobilização de enzimas. As vantagens são baixo custo e facilidade de imobilização baseada em forças/interações físicas fracas entre a enzima e a matriz (superfície do eletrodo). Essas interações incluem forças de van der Waals e ligações de hidrogênio. Em comparação com outros métodos de imobilização de enzimas, as desvantagens da adsorção física incluem baixa estabilidade da enzima imobilizada sob condições severas de temperatura, pH e força iônica, o que pode levar a uma rápida remoção do biomaterial da superfície do eletrodo. No entanto, este método tem sido amplamente aplicado no desenvolvimento de biossensores, pois continua sendo o

procedimento mais rápido e aplicável para a imobilização de biocatalisadores (BRADY; JORDAAN, 2009).

A microencapsulação baseia-se no aprisionamento da enzima dentro de uma membrana depositada na superfície do eletrodo. Esse material retém a enzima e sua porosidade permite a difusão do substrato e dos produtos formados na reação, que são monitorados na interface eletrodo/solução. Exemplos de membranas incluem Nylon, quitosana, acetato de celulose e policarbonatos. Uma desvantagem notável deste método está relacionada ao impedimento da transferência de massa do substrato e dos produtos de reação causados pela membrana (ROCHEFORT; KOUISNI; GENDRON, 2008).

A ligação covalente da enzima é o método mais estável e eficiente na imobilização da enzima em um material de suporte. Este procedimento ocorre através de ligações químicas entre grupos funcionais da enzima (a parte não essencial para a atividade catalítica) e grupos reativos do material de suporte que podem incluir hidroxilas, carbonilas, aminas, grupos fenólicos, imidazol e tióis. Os materiais de suporte mais amplamente aplicados incluem polímeros insolúveis como quitosana, celulose e dextrano. Exemplos de agentes de ligação covalente usados na construção de biossensores de enzimas eletroquímicas incluem: 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS), epícloridrina, glioxal, aminotióis e glutaraldeído (CASERO et al., 2013).

A imobilização enzimática em condições próximas às de seu ambiente natural garante à enzima maior estabilidade e atividade, propriedades importantes quando se considera seu uso em biossensores. Por isso, o emprego do biopolímero do tipo β -D-glucana também produzido pelo fungo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 foi considerado para uso em biossensores contendo extrato bruto enzimático de lacase. Uma característica atraente deste sistema é que a botriosferana constitui um biofilme sobre o qual a lacase pode ligar/atrair, proporcionando um ambiente bioquímico natural para a imobilização da enzima.

2.5.2 β -D-glucana

O cultivo do fungo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 em meio de glucose por fermentação submersa resulta em aumento da viscosidade do fluido de cultura devido a produção de um biopolímero exocelular do tipo β -D-glucana. Esse

exopolissacarídeo foi caracterizado como um polímero constituído apenas por resíduos de D-glicose unidas por ligações do tipo (1→3) e (1→6), e denominado botriosferana (BOT) (BARBOSA et al., 2003). A BOT consiste em uma cadeia principal compreendendo resíduos de D-glicose ligados em β -(1→3) contendo ramificações compreendendo unidades de glicose e gentiobiose via ligações β -(1→6) em aproximadamente 22% da cadeia principal (BARBOSA et al., 2003; CROGNALÉ et al., 2007; DEKKER et al., 2019).

A BOT é amplamente empregada na área da saúde e cosméticos pois apresenta atividades antioxidantes, hipoglicemiantes, hipocolesterolêmicas e hipotrigliceridêmicas. Também apresentou uma capacidade de redução da proliferação de células de câncer de mama. Atualmente a BOT é comercialmente apresentada em produtos cosméticos formulados para promover o rejuvenescimento epitelial e tratamento de doenças de pele (DEKKER et al., 2019).

Exopolissacarídeos como a BOT, têm sido amplamente explorados no desenvolvimento de novos dispositivos eletroquímicos. A quitosana e a carboximetilcelulose são alguns biopolímeros mais aplicados para esta finalidade, configurando algumas características marcantes, incluindo biocompatibilidade, biodegradabilidade, capacidade de formar filmes finos aderentes em plataformas eletroquímicas suporte, renováveis, abundantes na natureza, e geralmente não são tóxicos (FU et al., 2015; HERNÁNDEZ-IBÁÑEZ et al., 2016). Os exopolissacarídeos apresentam vantagens sobre outros polissacarídeos naturais, pois são produzidos por fermentação por espécies microbianas, podendo ser obtidos a partir dos fermentados por precipitação com álcool com consequentes altos rendimentos, resultando em menores custos de produção.

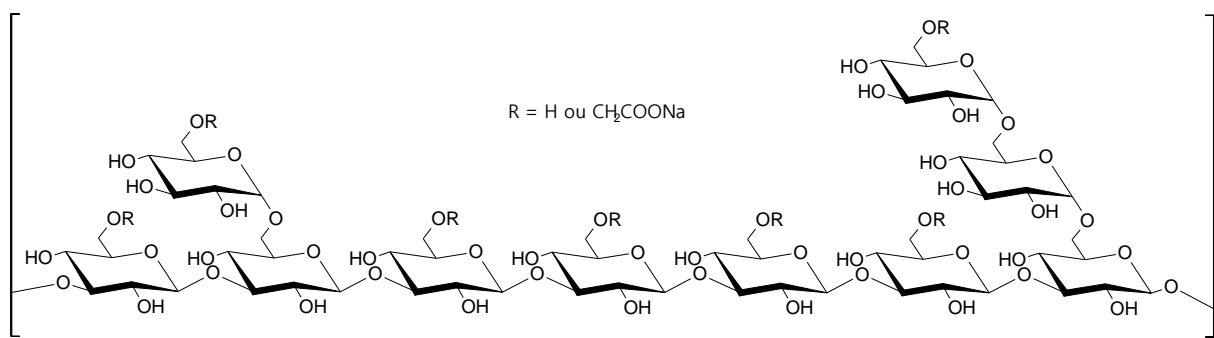
A BOT já foi introduzida no desenvolvimento de (bio)sensores voltamétricos pelo grupo de pesquisa coordenado pela Prof^a Dr^a Elen Romão Sartori. Desde então já foram publicados vários estudos reportando o uso de BOT para a construção de sensores e biossensores. Scremin et al. (2021), estabilizaram *carbon black* em um filme de BOT na superfície de um ECV. O sensor foi caracterizado eletroquímica e espectroscopicamente e o filme de *carbon black* e BOT não sofreu modificações significativas e, conseqüentemente, foi empregado com sucesso na determinação do relaxante muscular ciclobenzaprina em formulações farmacêuticas. Em uma outra abordagem, BOT foi empregada na imobilização da enzima lacase também produzida pelo fungo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 (COELHO et al.,

2019). A mistura de extrato bruto enzimático e do exopolissacarídeo BOT foi depositada sobre um ECV modificado com NTC_{PM} obtendo um biossensor. O dispositivo analítico foi aplicado com sucesso na determinação de dopamina em injeções farmacêuticas e amostras biológicas sintéticas, e apresentou boa seletividade mesmo na presença de ácido úrico e ácido ascórbico, atestando a seletividade do biossensor de lacase para compostos fenólicos. A imobilização de lacase usando a BOT, como um agente estabilizador garantiu ao biossensor longa durabilidade com manutenção de atividade enzimática (COELHO et al., 2019).

2.5.2.1 Carboximetil-botriosferana

A carboximetil-botriosferada (CMB) é uma molécula produzida a partir da derivatização química por carboximetilação da BOT (DEKKER et al., 2019). A reação de carboximetilação ocorre em meio de isopropanol e água contendo hidróxido de sódio para permitir a solubilização da BOT (KAGIMURA et al., 2015). Com a adição de ácido cloroacético, a CMB é obtida em poucas horas. Os grupos carboximéticos são incorporados na estrutura da BOT pelo carbono 6, em substituição aos hidrogênios. A Figura 6 apresenta a estrutura química da CMB. O grau de substituição da CMB está relacionado diretamente com a quantidade de grupos carboximéticos que substituem os hidrogênios das hidroxilas do carbono 6.

Figura 6 – Estrutura química da carboximetil-botriosferana



Fonte: O próprio autor.

O primeiro uso da CMB em Eletroanalítica foi a sua deposição sobre um ECV modificado com *carbon black*. O eletrodo modificado foi usado na determinação simultânea de paracetamol e dopamina (EISELE et al., 2019). Foi observado uma melhora nas propriedades do eletrodo modificado para a determinação dos compostos

fenólicos devido às interações dos grupos carboximéticos da botriosferana derivatizada e além disso, a estabilidade do sensor foi mantida por longos períodos.

Em vista disso, este trabalho tem como objetivo geral o desenvolvimento de bio(sensores), utilizando como sensores base o ECV e pasta de óxido de grafite e como agentes modificadores, biomateriais de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. Tanto o sensor quanto o biossensor foram avaliados em relação ao seu comportamento eletroquímico e sua aplicabilidade em amostras farmacêutica, biológica e alimentícia. Destaca-se os seguintes objetivos específicos:

Explorar a dispersão de NTC_{PM} primitivos em água usando CMB como estabilizador e empregar essa dispersão para modificar um ECV.

Empregar planejamento de estatístico de misturas para a construção do biossensor compreendendo uma mistura de extrato bruto de lacase, BOT e nanopartículas de platina (PtNPs) depositados sobre um eletrodo de pasta de óxido de grafite.

Caracterizar o sensor e biossensor quanto à morfologia, resposta voltamétrica e EIE empregando solução de ferrocianeto de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$) e ferricianeto de potássio $K_4[Fe(CN)_6]$.

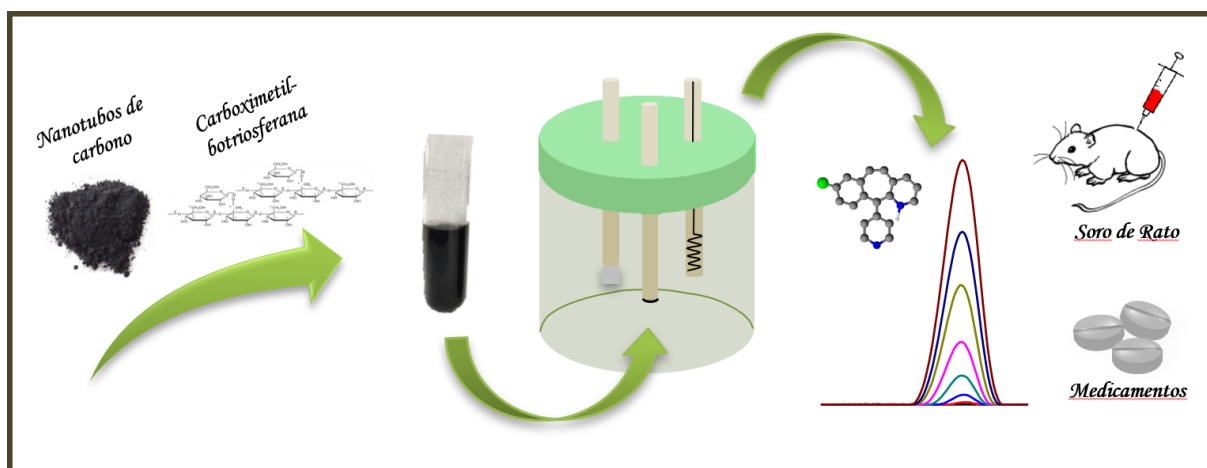
Desenvolver um método voltamétrico para a determinação de DESL empregando o sensor; avaliar os parâmetros analíticos de desempenho do método proposto, tais como: precisão, sensibilidade, seletividade, exatidão, limites de detecção e quantificação, linearidade, além de comparar criteriosamente os resultados obtidos pelo método desenvolvido com aqueles descritos na literatura.

Empregar planejamento fatorial para otimizar os parâmetros experimentais para a determinação de ácidos clorogênicos empregando o biossensor; avaliar linearidade da resposta analítica do biossensor e durabilidade do dispositivo desenvolvido.

Aplicar o sensor na determinação de desloratadina em amostras farmacêuticas e biológicas, comparando os resultados frente a um método espectrofotométrico previamente validado.

Aplicar o biossensor na análise de amostras de café coado tanto tradicionais quanto especiais usando o método voltamétrico e um método cromatográfico, comparando com os resultados obtidos e, por fim, aplicar ferramentas quimiométricas para classificação dos cafés.

CAPÍTULO 1

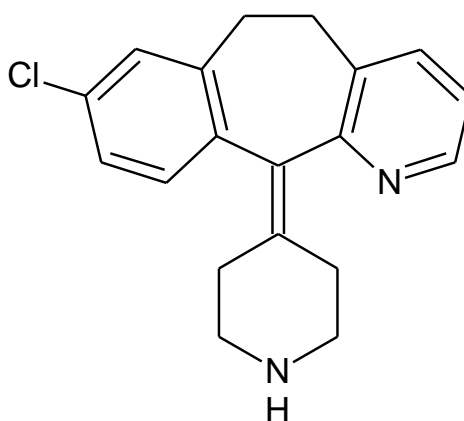


Dispersão aquosa de nanotubos de carbono estabilizada com carboximetil-botriosferana: Uma nova arquitetura para o sensoriamento de desloratadina

1 INTRODUÇÃO

A DESL (8-cloro-6,11-diidro-11-(4-piperidiniledeno)-5H-benzo[5,6]ciclohepta[1,2-b]piridina – Figura 1) é um fármaco anti-histamínico de terceira geração. Possui ação seletiva como antagonista dos receptores de histamina do tipo H1 nas células e, por isso, é usada no tratamento de sintomas alérgicos sem causar sedação e/ou sonolência (HARDMAN; LIMBIRD; GILMAN, 1996).

Figura 1 – Estrutura química da desloratadina



Fonte: Hardman, Limbird e Gilman (1996)

No Brasil a DESL é comercializada na forma de comprimidos de 2,5 e 5 mg, e na forma de xarope na concentração de 0,5 mg mL⁻¹, com taxa de excreção de 41% através da urina (RAMANATHAN et al., 2007). Esse fármaco pode ser administrado a pacientes de todas as idades, com exceção de crianças que não atingiram 6 meses de idade e de mulheres durante a amamentação, pois a DESL pode ser excretada para a glândula mamária e, conseqüentemente, no leite materno (BIFARMA; ANVISA, 2008).

Em vista de sua importância no tratamento clínico de sintomas alérgicos por pacientes pediátricos e adultos, torna-se importante o desenvolvimento de um método analítico simples, confiável e econômico que atenda a exigência das agências reguladoras e o compromisso com o controle de qualidade.

Os métodos analíticos empregados para o controle de qualidade realizado pelas indústrias farmacêuticas são aqueles preconizados pelas farmacopeias (United States Pharmacopoeia, 2007; Brazilian Pharmacopoeia, 2010; British Pharmacopoeia Commission, 2013). Em sua grande maioria, esses métodos se

baseiam nas técnicas cromatográficas ou espectrofotométricas.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) se baseia na separação de compostos em solução em uma coluna cromatográfica, devido a diversos tipos de interação entre os compostos e as fases móvel e estacionária. A detecção pós separação se dá por meio de um detector, podendo assumir diferentes técnicas de detecção, onde os compostos podem ser identificados pelo seu tempo de retenção na coluna cromatográfica relacionando com o sinal químico mensurado pelo detector (SKOOG et al., 2007). A CLAE, apesar de ser a técnica mais utilizada nas indústrias, possui um alto custo de instrumentação e análise pois requer o uso de solventes que apresentam alto grau de pureza e, além disso, o tempo de análise é relativamente alto.

Já a técnica espectrofotométrica de absorção molecular na região do ultravioleta-visível (espectrofotometria UV-Vis) se baseia na interação dos compostos em solução com radiação ultravioleta e/ou visível. A espectrofotometria UV-Vis é uma técnica relativamente mais simples e rápida que a CLAE, no entanto está sujeita a maiores interferentes e possui menor sensibilidade e, na maioria das vezes, emprega grandes quantidades de solvente orgânico de relativa toxicidade (PASCHOAL et al., 2003). Por sua simplicidade relativa, a farmacopeia dos Estados Unidos (United States Pharmacopoeia, 2007) descreve o uso de espectrofotometria derivativa de absorção molecular na região do visível (espectrofotometria derivada) derivada como o método oficial para a determinação da DESL. No entanto, apesar da espectrofotometria derivada amenizar possíveis interferentes (PASCHOAL et al., 2003), o tratamento matemático dos dados acaba por adicionar uma nova etapa ao método, tornando a análise mais complicada e demorada, não sendo adequado para análises de rotina.

O desenvolvimento de métodos mais simples e menos onerosos ao meio ambiente, em substituição aos métodos convencionalmente empregados é uma tendência global (ANASTAS, 1999), sendo que vários pesquisadores têm se empenhado para desenvolver métodos voltamétricos de análise cada vez mais simples e mais ambientalmente favoráveis, utilizando diferentes eletrodos (ŠVORC et al., 2014; BRYCHT et al., 2016; COELHO et al., 2019; FALONE et al., 2019; MORAES et al., 2019a, 2019b; NASCIMENTO et al., 2019; SALAMANCA-NETO et al., 2019; SILVA; WONG; FATIBELLO-FILHO, 2020).

A voltametria se destaca pela sua simplicidade, rapidez de análise, baixo custo relativo aliado a relativas altas sensibilidade e detectabilidade (BRETT;

BRETT, 1993; BARD; FAULKNER, 2001). Anterior a esse trabalho, poucos métodos voltamétricos foram relatados para a determinação de DESL. Aleksic *et al.* (ALEKSIĆ *et al.*, 2010) propuseram o uso de eletrodo de mercúrio de gota pendente (EHgGP) em conjunto com a VOQ para a determinação de DESL e obtiveram um LD de $0,463 \mu\text{mol L}^{-1}$. O método exige cuidados especiais e um analista experiente devido ao emprego do eletrodo de mercúrio. Para superar a toxicidade do eletrodo, Vidya *et al.* (VIDYA *et al.*, 2014) empregaram um ECV e VOQ para determinar DESL em amostras de urina humana e comprimidos e obtiveram um LD de $0,003 \mu\text{mol L}^{-1}$, mas a menor concentração detectada foi de $25,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, além do método apresentar problemas de adsorção, afetando a precisão das medições. Recentemente, Nagao *et al.* (2020) fizeram uso de um eletrodo de diamante dopado com boro para a determinação de DESL em amostras farmacêuticas, de urina e de água de torneira. O método analítico baseado em VPD foi capaz de detectar DESL num intervalo de concentração de $0,099$ a $6,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ obtendo um LD de $0,041 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Com o desenvolvimento de novos materiais, especialmente materiais nanoestruturados, diferentes arquiteturas de eletrodos de trabalho podem ser obtidas por uma simples modificação de eletrodos tradicionalmente empregados. Esses eletrodos são conhecidos como eletrodos quimicamente modificados (SVÍTKOVÁ *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2017; BEITOLLAHI *et al.*, 2018; HAJIALIZADEH *et al.*, 2018).

A principal razão para modificar um eletrodo é promover a eletrocatalise, ou seja, aumentar o sinal analítico e/ou deslocar o potencial redox para menores valores, de forma a permitir que o analito oxide/reduza dentro da faixa de potencial de trabalho do eletrodo específico (BARD, 1983; BEITOLLAHI *et al.*, 2018). Os NTC de paredes múltiplas (NTC_{PM}) têm sido amplamente utilizados para modificar eletrodos, pois, como um material nanoestruturado, apresentam características eletrocatalíticas devido à sua alta área superficial e mobilidade eletrônica (GOODING, 2005; KUMAR; VICENTE-BECKETT, 2012; SCREMIN *et al.*, 2018).

O procedimento de preparação e uso de NTC_{PM} como um modificador de eletrodo é baseado em sua suspensão/dispersão em um solvente específico antes da cobertura da superfície do eletrodo. A maioria dos procedimentos utiliza meio fortemente ácido/oxidante para tratar os NTC_{PM} a fim de facilitar sua dispersão em solventes polares devido aos grupos carboxílicos incorporados ao nanomaterial (MIRZANASIRI *et al.*, 2018; ÖZCAN; GÜRBÜZ, 2018; RAO *et al.*, 2018; SARAVANAN *et al.*, 2018). Quando primitivos, os NTC_{PM} podem ser dispersos em solvente orgânico,

como metanol (MOKHTARI; NEMATOLLAHI; SALEHZADEH, 2018), e em uma solução aquosa de β -ciclodextrina (oligossacarídeos cíclicos contendo sete resíduos de glicose ligados por ligações α -(1 \rightarrow 4) formando estruturas semelhantes a gaiolas) (SIPA et al., 2018). Recentemente, foram descobertos polissacarídeos que aumentam a capacidade dispersiva em água das nanoestruturas de carbono (ZHOU; FANG; RAMASAMY, 2019), e a dispersão de NTC_{PM} em meio aquoso foi alcançada usando diferentes substratos atuando como dispersantes, como quitosana e β -ciclodextrina (RUNGROTMONGKOL et al., 2011; YANG et al., 2015; FATEMI; FOROUTAN, 2016; SIPA et al., 2018).

Nesse sentido, o exopolissacarídeo fúngico denominado botriosferana (BOT), uma β -glucana do tipo (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)- β -D-glucana de *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 (DEKKER et al., 2019), derivatizado quimicamente por carboximetilação para produzir carboximetil-botriosferana (CMB), foi considerado como um adjuvante na dispersão de NTC_{PM}, pois recentemente demonstrou possuir novas aplicações eletroanalíticas (EISELE et al., 2019; MATTOS et al., 2019). A CMB ainda não foi usada com a finalidade de dispersar NTC_{PM}. Assim, neste trabalho, é proposto o uso de CMB para dispersar NTC_{PM} em água para a construção de um sensor eletroquímico para a determinação do fármaco anti-histamínico DESL em amostras farmacêuticas e biológicas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os produtos químicos utilizados neste trabalho foram de grau analítico e foram utilizados sem algum tratamento. As soluções foram preparadas com água ultra-purificada (resistividade $\geq 18,2$ M Ω cm) obtida de um sistema Milli-Q (Millipore, EUA).

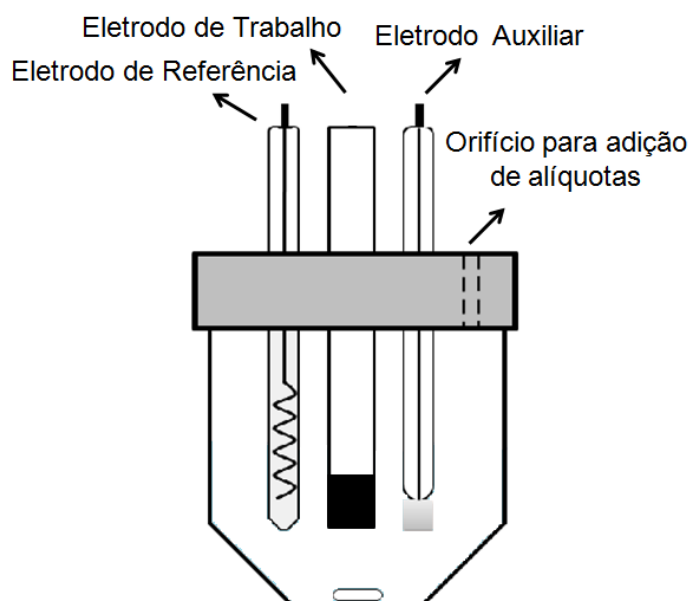
O padrão analítico de DESL (99,8%) e NTC_{PM} primitivos (20-30 nm de diâmetro e 0,5-2 μ m de comprimento; pureza $\geq 95\%$) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA). Os medicamentos contendo DESL foram adquiridos em uma farmácia em Londrina-PR, Brasil. Quatro amostras foram usadas: duas formulações em forma de comprimidos contendo 5 mg de DESL por unidade e dois tipos de xarope com a concentração de DESL de 0,5 mg mL⁻¹.

O eletrólito de suporte das medidas voltamétricas foi uma solução tampão fosfato, preparada a partir de hidrogenofosfato de potássio na concentração de $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ com o pH ajustado para 8,0 com adição de uma solução de NaOH a $2,0 \text{ mol L}^{-1}$. A solução estoque de DESL na concentração de 10 mmol L^{-1} foi preparada diariamente, dissolvendo o padrão em água ultrapura. As soluções de trabalho, em concentrações menores, foram preparadas por diluição da solução estoque com o eletrólito suporte.

2.2 INSTRUMENTAÇÃO

Todos os experimentos eletroquímicos foram realizados em uma célula eletroquímica de compartimento único com três eletrodos (Figura 2), incluindo uma placa de platina ($0,5 \times 0,5 \text{ cm}^2$) como eletrodo auxiliar, um Ag/AgCl (KCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$) como eletrodo de referência, o qual se referem todos os potenciais apresentados na sequência, e o sensor desenvolvido como eletrodo de trabalho. O ECV foi adquirido da Tokay Carbon Co., Tóquio, Japão (5 mm, diâmetro).

Figura 2 – Representação esquemática da célula eletroquímica contendo três eletrodos, eletrodo auxiliar, de referência e de trabalho, além do orifício para adição das alíquotas



Fonte: o próprio autor.

As medidas voltamétricas foram realizadas usando um potenciostato/galvanostato PGSTAT 101 (Metrohm Autolab B. V., Schiedam, Holanda) controlado pelo programa NOVA 2.1.

Os experimentos de EIE foram realizados usando um potenciostato/galvanostato FRA II μ Autolab tipo III (Metrohm Autolab B. V., Schiedam, Holanda) controlado pelo software NOVA 1.0. Os experimentos foram realizados com a aplicação do potencial formal do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (0,27 V para os eletrodos empregados neste trabalho), variando de 10 mHz a 100 KHz (10 pontos por década), e com uma perturbação de 10 mV. A solução consistiu em uma mistura de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 5,0 mmol L^{-1} , $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 5,0 mmol L^{-1} e KCl 0,5 mol L^{-1} .

O pH das soluções foi medido a $25,0 \pm 1,0$ °C usando um pHmetro HI-221 (Hanna Instruments, EUA), empregando um eletrodo de vidro combinado com um eletrodo de Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L^{-1}) como referência externa.

As imagens microscópicas foram obtidas utilizando um microscópio eletrônico de varredura (MEV, modelo FEI Quanta 200, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) operado em uma voltagem de 5000 V.

2.3 PRODUÇÃO DA CARBOXIMETIL-BOTRIOSFERANA

O polissacarídeo botriosferana foi obtido do fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 cultivado por fermentação submersa em meio nutricional contendo 50 g mL^{-1} de sacarose de acordo com o reportado por Barbosa *et al.* (2003).

A derivatização da botriosferana por carboximetilação foi realizada de acordo o método de Xu *et al.* (XU *et al.*, 2009), com pequenas modificações. A massa de 1 g de BOT liofilizada foi suspensa em isopropanol e mantida sob agitação por 15 min. Em seguida, uma solução de hidróxido de sódio 20% (m/v) foi adicionada gota a gota, mantendo-se sob agitação por 3 horas. Outra solução contendo a mistura de ácido cloroacético, hidróxido de sódio 20% (m/v) e isopropanol foi adicionada a reação, mantendo sob agitação por mais 1 h. Posteriormente, uma solução contendo apenas ácido cloroacético e isopropanol foi adicionada a reação, sendo mantida à 60 ± 2 °C por 3 h. A reação foi interrompida transferindo a mistura para um banho de gelo até atingir temperatura ambiente. Logo após, a CMB foi precipitada com a adição de metanol e posteriormente lavada com metanol 80% (v/v), etanol 99,5%, etanol 80%

(v/v) e, por último, éter etílico 99,8%. O precipitado obtido foi solubilizado em água destilada, e a solução resultante foi dialisada contra água destilada por 48 h e liofilizada. Após a obtenção da CMB liofilizada, ela foi mantida sob refrigeração à 4 °C. O grau de substituição dos grupos carboximéticos na estrutura da BOT foi determinado de acordo com o descrito por Tatongjai e Lumdubwong (2010), obtendo um grau de substituição igual a 0,84.

2.4 PREPARO DO ELETRODO MODIFICADO

Antes do uso, o ECV foi cuidadosamente polido com suspensão de alumina de 0,3 mm em um pano de polimento e enxaguado com água ultrapura em abundância e deixado secar à temperatura ambiente por 10 min.

Uma dispersão aquosa dos NTC_{PM} foi preparada misturando 5,0 mg de NTC_{PM} primitivos em 5 mL de uma solução aquosa contendo 1 mg mL⁻¹ de CMB. Essa mistura foi sonicada em banho ultrassônico por 5 min. A dispersão de NTC_{PM}-CMB foi armazenada sob refrigeração a 4° C. Antes da modificação do ECV, a dispersão foi homogeneizada por sonicação durante 1 min em banho ultrassônico.

O sensor foi preparado pelo método de gotejamento em uma única etapa. O ECV, previamente polido com alumina, foi colocado na posição vertical e, em seguida, 20 µL da dispersão aquosa de NTC_{PM} foram depositados na superfície do eletrodo com o auxílio de uma micropipeta e deixado secar à temperatura ambiente. Após a secagem, o sensor foi ativado em solução tampão fosfato (pH 8,0) aplicando dez ciclos em uma janela de potencial de 0,0 a 1,4 V a uma velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹ usando VC.

2.5 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

A VC e a VVL foram empregadas para a caracterização do eletrodo modificado e para o desenvolvimento do método analítico para a determinação de DESL.

A VVL foi usada na construção de curvas analíticas para avaliar o comportamento linear da corrente obtida para a DESL em função de sua concentração. As curvas analíticas foram construídas por meio de adição sucessivas de pequenas alíquotas da solução de trabalho de DESL na célula eletroquímica

contendo 10 mL da solução tampão fosfato (pH 8,0) onde, após cada adição de alíquota a solução da célula eletroquímica era homogeneizada por agitação magnética por 30 s e após 5 s de repouso, o voltamograma de varredura linear era registrado.

A análise de regressão linear, bem como os parâmetros estatísticos das curvas analíticas foram calculados usando o software Origin Pro 8, considerando o nível de significância de 5%. Os valores de LD foram calculados usando a Equação 1:

$$LD = 3 \frac{s}{m} \quad \text{Eq. 1}$$

onde s é o desvio padrão dos valores do intercepto da curva analítica e m é a sensibilidade (coeficiente angular) da curva analítica (LONG; WINEFORDNER, 1983).

2.6 PREPARO DAS AMOSTRAS DE MEDICAMENTOS E ANÁLISE

As formulações farmacêuticas contendo DESL foram preparadas para análise da seguinte maneira:

- a) Dez comprimidos de cada amostra foram finamente pulverizados em um almofariz com um pistilo. A massa representativa de um único comprimido (5 mg de DESL) foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com a solução tampão fosfato (pH 8,0). Após, a solução da amostra foi submetida a sonicação em banho de ultrassom em temperatura ambiente por 5 min.
- b) As amostras da solução oral (xarope) foram analisadas diretamente, sem algum preparo ou diluição prévia.

Para as análises voltamétricas, uma alíquota das soluções para comprimidos DESL, bem como uma alíquota das soluções orais, foram transferidas diretamente para a célula eletroquímica contendo 10 mL do eletrólito suporte. Para avaliar a significância dos resultados, as medições foram realizadas em triplicata. A concentração de DESL em cada amostra foi determinada usando a curva analítica obtida previamente. Para fins comparativos, as formulações farmacêuticas também foram analisadas usando um método espectrofotométrico validado descrito na literatura (KUSHARE et al., 2011).

2.7 PREPARO DA AMOSTRA DE SORO DE SANGUE DE RATO E ANÁLISE

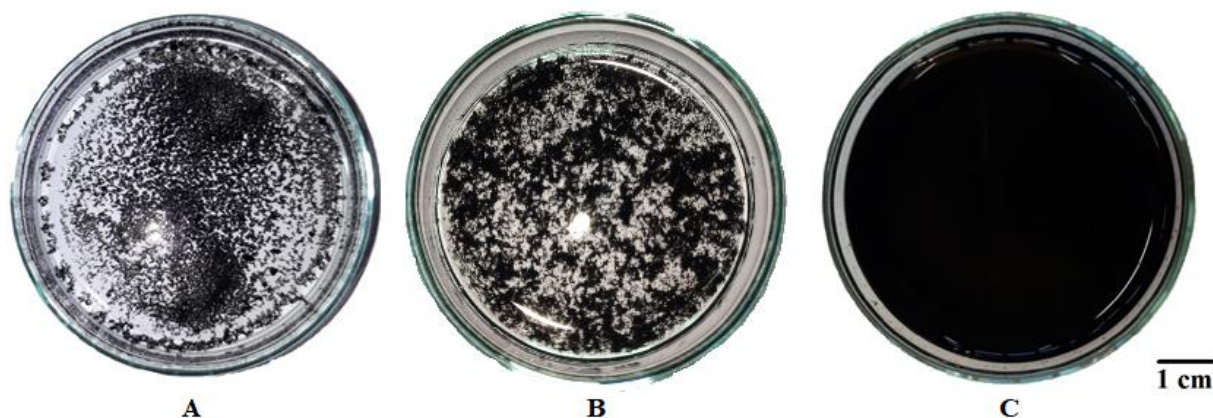
O desempenho do sensor também foi avaliado em uma amostra de soro de sangue de rato. A amostra de sangue foi obtida de uma rata fêmea do criadouro do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina. O rato foi mantido em uma sala com temperatura controlada em um ciclo de 12 horas claro/escuro, com ração padrão (Nuvital, Curitiba, Brasil) e água *ad libitum*. Com 12 semanas de idade, a rata foi anestesiada (tiopental de sódio, 40 mg kg⁻¹), uma amostra de sangue foi coletada da aorta abdominal e depois centrifugada para separar o soro utilizado nas experiências. O procedimento de coleta de amostras de sangue foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA/UEL: 6996.2015.02) na Universidade Estadual de Londrina-PR, Brasil. A amostra de soro foi dopada com uma solução padrão de DESL para que atingisse a concentração de 50 µmol L⁻¹. Para a análise, 500 µL foram transferidos para a célula eletroquímica contendo 10 mL da solução tampão fosfato (pH 8,0), onde a concentração esperada de DESL fosse de 2,38 µmol L⁻¹. Na sequência, foi empregado o método de adição de padrão para a determinação da concentração de DESL.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 DISPERSÃO DE NTC_{PM} EM SOLUÇÃO AQUOSA DE CMB E CONSTRUÇÃO DE ELETRODOS DE TRABALHO

A dispersão dos NTC_{PM} foi avaliada por meio da mistura de 5,0 mg do nanomaterial carbonáceo (*i*) com 5 mL de água, (*ii*) com 5,0 mg de botriosferana liofilizada sem derivatização química e 5 mL de água e (*iii*) com 5 mL de uma solução aquosa de CMB. Todas as misturas foram sonicadas por 30 min em banho de ultrassom à temperatura ambiente. A Figura 3 apresenta fotografias das dispersões resultantes obtidas.

Figura 3 – Fotografia de uma placa de Petri contendo **(A)** 5 mL de uma suspensão de NTC_{PM} em água (1 mg mL^{-1}), **(B)** 5 mL de uma suspensão de NTC_{PM} (1 mg mL^{-1}) em uma mistura de água com botriosferana liofilizada sem derivatização química (1 mg mL^{-1}), e **(C)** 5 mL da dispersão de NTC_{PM} (1 mg mL^{-1}) estabilizados com 1 mg mL^{-1} de botriosferana derivatizada quimicamente por carboximetilação. As fotos foram tiradas após sonicação das soluções por 30 min



Fonte: o próprio autor.

Como mostrado na Figura 3, os NTC_{PM} não se dispersaram rapidamente na água porque o nanomaterial de carbono tende a se agregar (FATEMI; FOROUTAN, 2016). Quando a botriosferana liofilizada foi adicionada, os NTC_{PM} ainda estavam agregados, no entanto, a adição de CMB à mistura NTC_{PM} -água promoveu a dispersão completa dos NTC_{PM} . Isso ocorreu porque as biomoléculas polares da CMB, contendo grupamentos carboximetil possuem alta afinidade por estruturas contendo carbono, permitindo que os NTC_{PM} primitivos sejam distribuídos homogeneamente em uma solução aquosa (KHARISSOVA; KHARISOV; DE CASAS ORTIZ, 2013; SINAR; KNOPF, 2014; KARAGIANNIDIS et al., 2017; DAI et al., 2018; ZHOU; FANG; RAMASAMY, 2019).

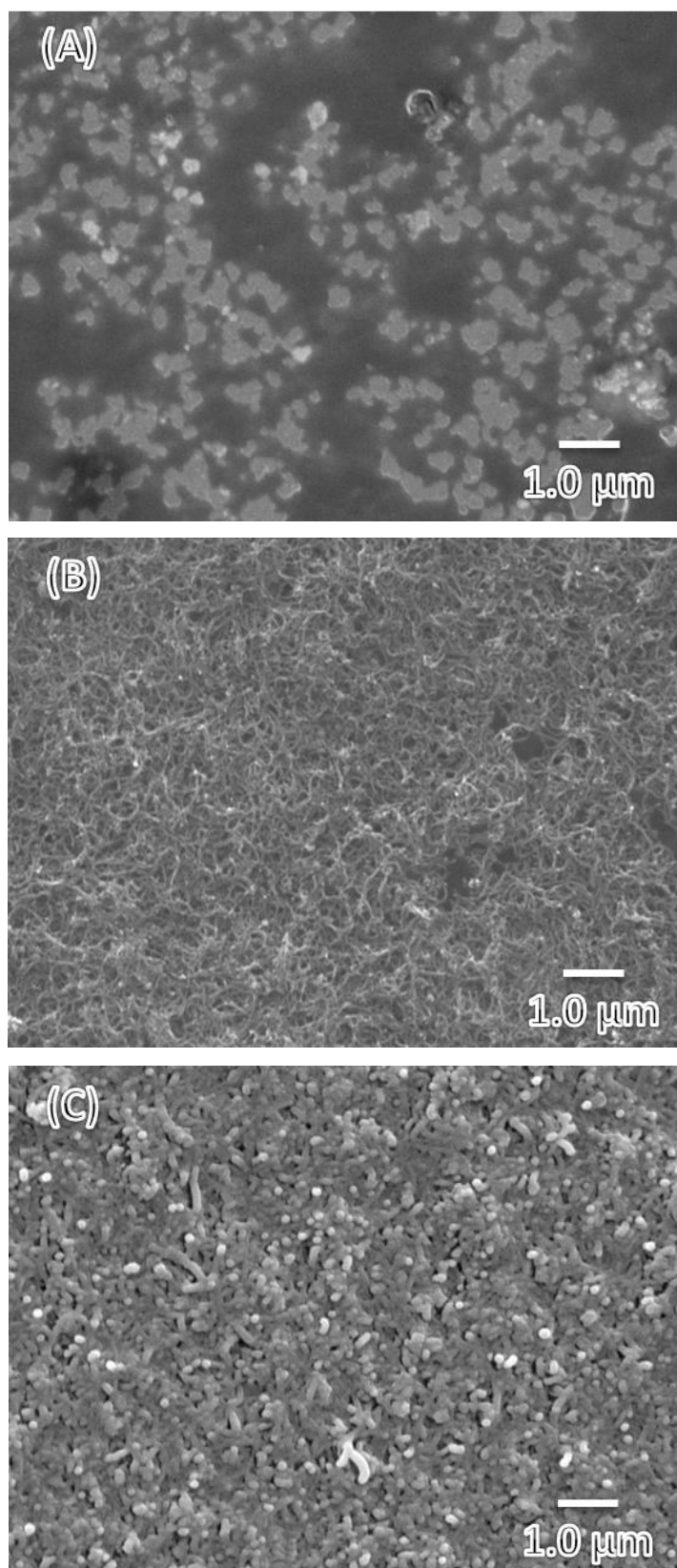
Após esta etapa, três eletrodos de trabalho diferentes foram preparados por meio da modificação da superfície de um ECV, sendo eles: ECV modificado com (i) CMB (ECV/CMB), (ii) suspensão de NTC_{PM} em água (ECV/ NTC_{PM}) e (iii) dispersão aquosa de NTC_{PM} estabilizada com CMB (ECV/ NTC_{PM} -CMB). Cada um desses eletrodos foi preparado por meio da modificação de um ECV pelo gotejamento de $20 \mu\text{L}$ das respectivas misturas modificadoras.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS ELETRODOS MODIFICADOS

3.2.1 Análise Morfológica

Os três eletrodos preparados foram analisados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As imagens obtidas por MEV do ECV/ NTC_{PM}-CMB e dos outros eletrodos preparados são mostradas na Figura 4. Na Figura 4A, pode se observar que, no ECV/CMB, as moléculas de CMB estão cobrindo partes da superfície do ECV. No ECV/NTC_{PM} (Figura 4B), a imagem obtida por MEV mostra que os NTC_{PM} não se distribuem bem na superfície do ECV usando a suspensão NTC_{PM}-água. Por fim, a imagem obtida por MEV do ECV/NTC_{PM}-CMB (Figura 4C) indica uma distribuição homogênea do nanomaterial disperso. Ainda, é possível observar que a CMB revestiu os NTC_{PM} à medida que sua espessura aumentou, assim como foi relatado o aumento de espessura de NTC_{PM} após a interação com quitosana (KUMAR; CASTRO; FELLER, 2012).

Figura 4 – Imagens obtidas por MEV dos seguintes ECV modificados: **(A)** ECV/CMB, **(B)** ECV/NTC_{PM}, e **(C)** ECV/NTC_{PM}-CMB

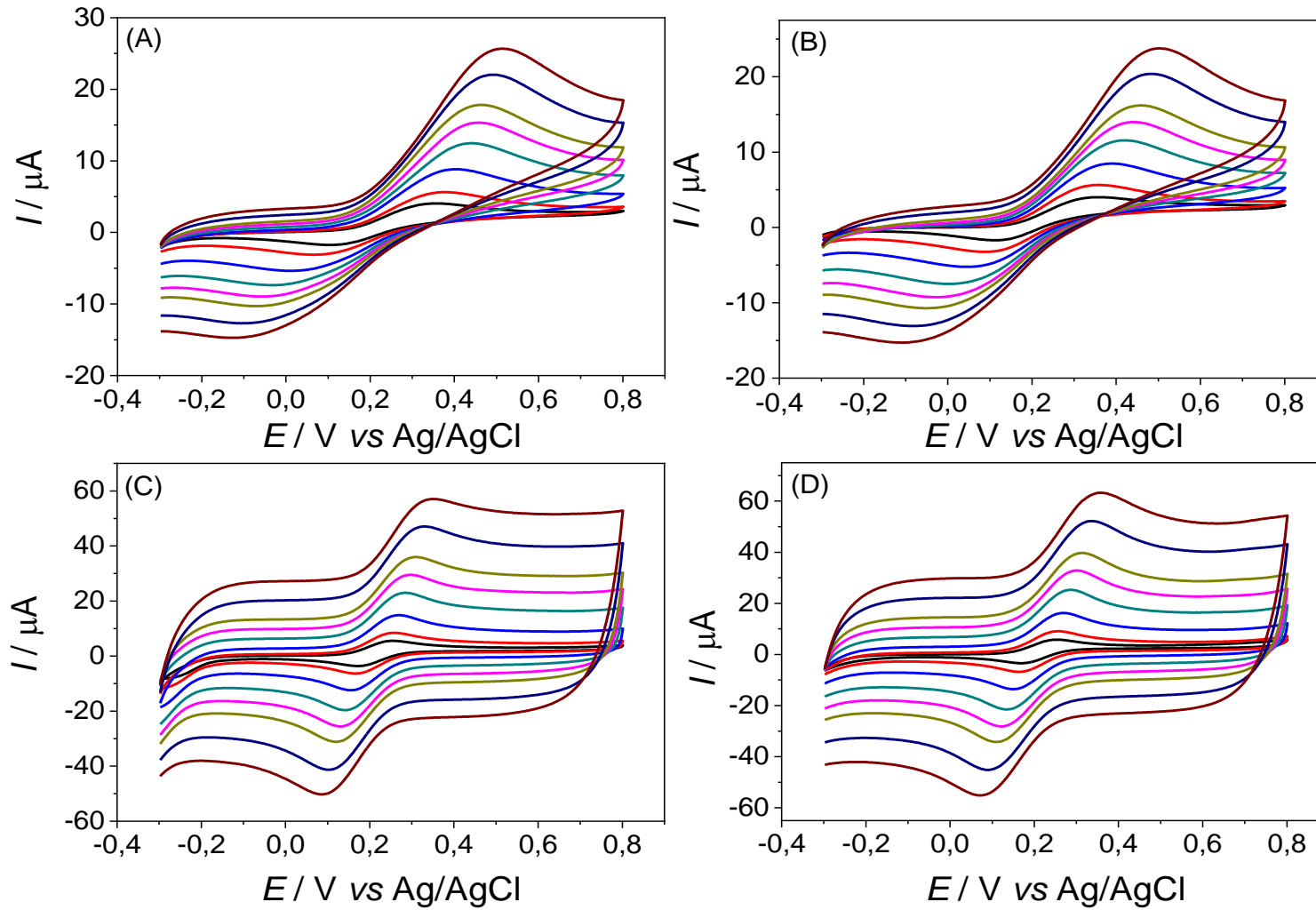


Fonte: o próprio autor.

3.2.2 Análise Voltamétrica Para Estimativa de Área Eletroativa

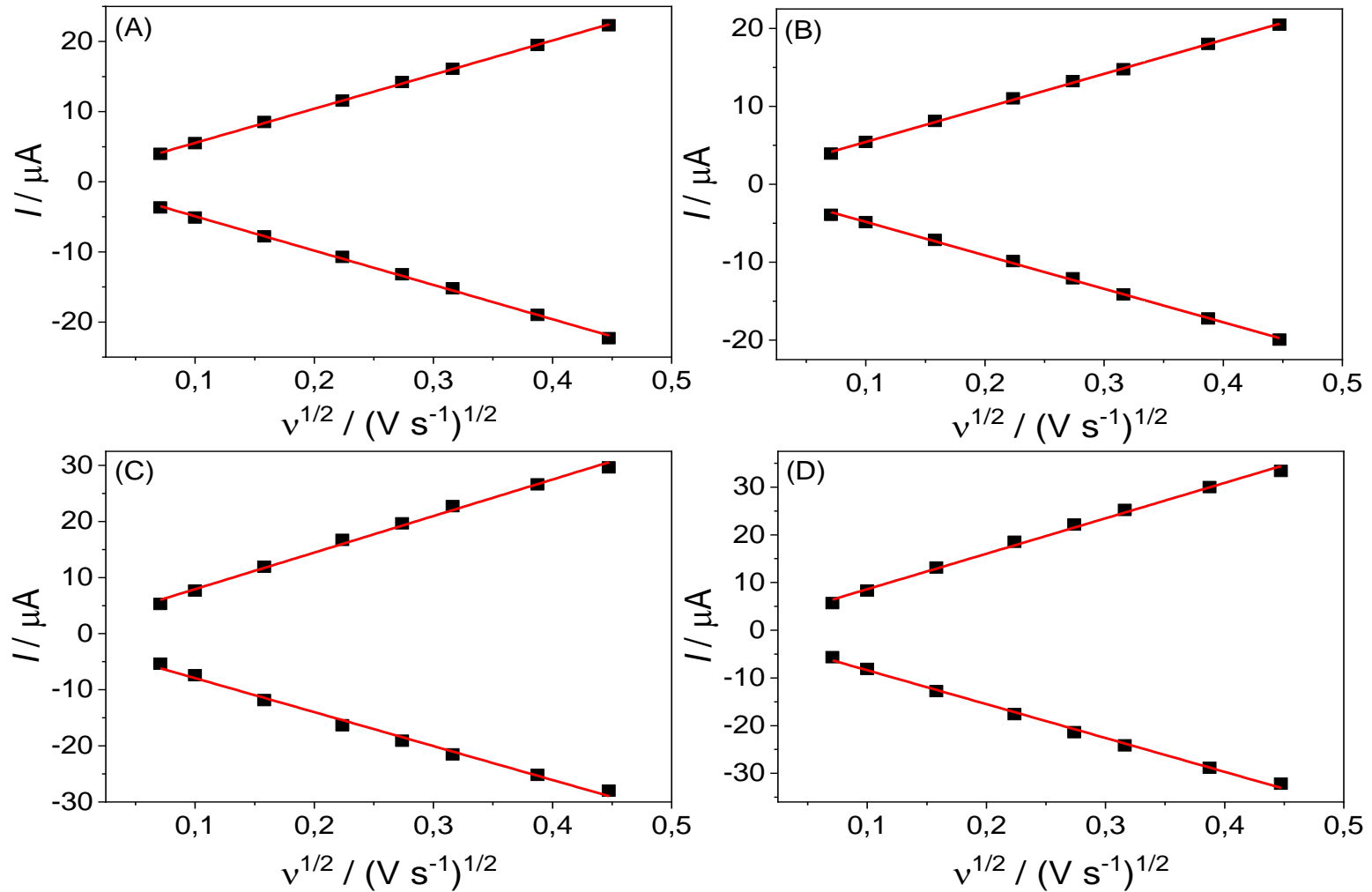
Os eletrodos também foram submetidos às análises de VC empregando o par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Para isso, foi empregado uma solução de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ na concentração de $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e KCl na concentração de $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. Foram obtidos voltamogramas em diferentes velocidades de varredura, de 5 a 200 mV s^{-1} (Figura 5). A área eletroativa dos eletrodos obtidos foi estimada a partir da equação de Randles-Sevcik (GOSSER, 1993), onde para isso, plotou-se a corrente obtida para a oxidação e redução do par redox contra a raiz quadrada da velocidade de varredura (Figura 6). Enquanto o valor da área geométrica de cada eletrodo era de $0,196 \text{ cm}^2$, os valores de área eletroativa estimados foram 0,131, 0,118, 0,176 e $0,201 \text{ cm}^2$ para os ECV, ECV/CMB, ECV/ NTC_{PM} e ECV/ NTC_{PM} -CMB, respectivamente. Os resultados demonstraram que o uso de nanomaterial de carbono na modificação do ECV levou a um aumento na área eletroativa em comparação com o ECV não modificado, no entanto o uso da CMB (ECV/CMB) diminuiu a área eletroativa. Além disso, a superfície do eletrodo não foi completamente coberta pelo nanomaterial ao usar a mistura NTC_{PM} -água (ECV/ NTC_{PM} – Figura 4B), na ausência de CMB. A CMB estabilizou a dispersão aquosa dos NTC_{PM} em água para a modificação do ECV e exibiu a maior área eletroativa. É importante ressaltar que, mesmo com as propriedades não condutoras da CMB, a homogeneidade do modificador foi responsável pela distribuição homogênea do nanomaterial na superfície do ECV (Figura 4C), levando à uma maior área eletroativa do ECV/ NTC_{PM} -CMB.

Figura 5 – Voltamogramas cíclicos em várias velocidades de varredura para o par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, obtidos usando os seguintes eletrodos **(A)** ECV, **(B)** ECV/CMB, **(C)** ECV/NTC_{PM} e **(D)** ECV/NTC_{PM}-CMB



Fonte: o próprio autor.

Figura 6 – Relação entre corrente de pico e raiz quadrada das velocidades de varredura obtidos a partir dos voltamogramas cíclicos para o par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ usando os seguintes eletrodos **(A)** ECV, **(B)** ECV/CMB, **(C)** ECV/NTC_{PM} e **(D)** ECV/NTC_{PM}-CMB

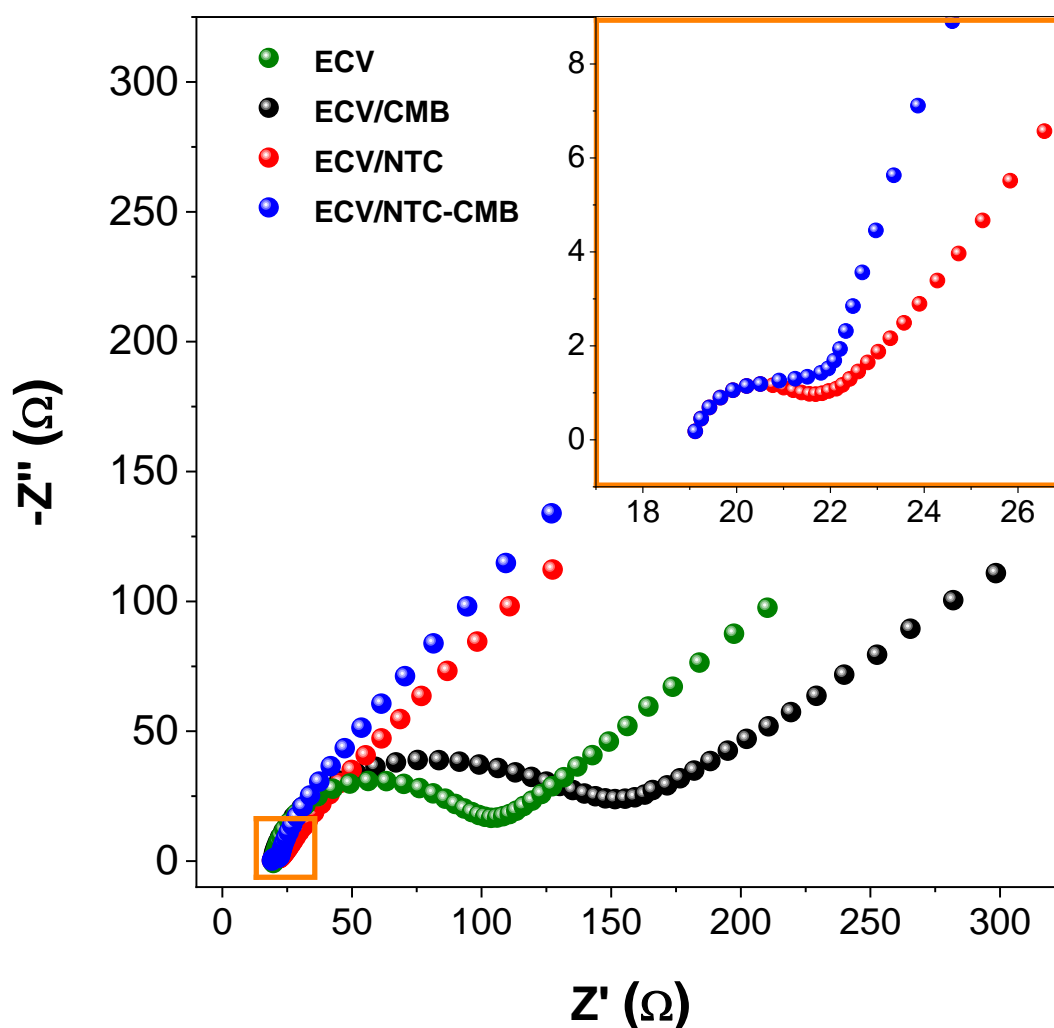


Fonte: o próprio autor.

3.2.3 Análise Espectroscópica

Os eletrodos preparados também foram caracterizados por EIE para avaliação de suas propriedades interfaciais. A Figura 7 mostra os espectros de impedância eletroquímica (apresentados em diagrama de Nyquist) para os ECV, ECV/CMB, ECV/NTC_{PM} e ECV/NTC_{PM}-CMB.

Figura 7 – Diagrama de Nyquist para os espectros de impedância eletroquímica dos ECV, ECV/CMB, ECV/NTC_{PM} e ECV/NTC_{PM}-CMB em solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 10 mmol L^{-1} e KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ no intervalo de frequência de 100 KHz a 0,1 Hz e potencial aplicado de 0,27 V vs Ag/AgCl. *Inserido:* Amplificação da região de alta frequência do espectro para os ECV/NTC_{PM} e ECV/NTC_{PM}-CMB



Fonte: o próprio autor.

O valor da resistência à transferência eletrônica (R_{tc}) é obtido a partir do semicírculo formado na região de alta frequência do diagrama de Nyquist, após subtração do valor de resistência da solução (GUAN; MIAO; ZHANG, 2004; ORAZEM; TRIBOLLET, 2008; LEVIN et al., 2013). A Tabela 1 apresenta os valores obtidos para a R_{tc} dos eletrodos avaliados. Pode-se observar que houve um aumento de 60 Ω quando o ECV foi modificado com CMB, em comparação com o ECV não modificado, devido principalmente às propriedades não condutoras de grandes biomoléculas (RUNGROTMONGKOL et al., 2011; DEKKER et al., 2019). Por outro lado, a adição de material nanoestruturado de carbono na superfície do ECV causou uma diminuição drástica no valor de R_{tc} , de 149,7 Ω (ECV/CMB) para 3,6 Ω (ECV/NTC_{PM}-CMB); isso representa uma diminuição de cerca de 98% no valor de R_{tc} devido à presença dos NTC_{PM}, cujas propriedades incluem grande área superficial e alta condutividade eletrônica (HERBST; FERNANDES MACÊDO; ROCCO, 2004; GAO et al., 2012).

Tabela 1 – Valores de área eletroativa, estimados por meio da equação de Randles-Sevcik, resistência de transferência eletrônica e constante heterogênea da velocidade de transferência de elétrons obtidos pela EIE para o ECV e suas respectivas modificações

Eletrodo	ECV	ECV/CMB	ECV/NTC_{PM}	ECV/NTC_{PM}-CMB
Área eletroativa (cm²)	0,131	0,118	0,176	0,201
R_{tc} (Ω)	89,7	149,7	2,8	3,6
K_{ap} (cm s⁻¹)	$2,19 \times 10^{-3}$	$1,45 \times 10^{-3}$	$5,23 \times 10^{-2}$	$3,56 \times 10^{-2}$

Fonte: o próprio autor.

Ainda, a partir dos valores de R_{tc} obtidos a partir da EIE, foi possível caracterizar a cinética das reações heterogêneas de transferência de elétrons na superfície do eletrodo. Para isso, foram calculadas as constantes heterogêneas de velocidade aparente (K_{ap}), as quais indicam a velocidade da reação entre as espécies redox e o eletrodo tendendo ao equilíbrio (SANTOS; WONG; FATIBELLO-FILHO, 2018). O valor de K_{ap} para os eletrodos foi calculado a partir da equação (Eq. 2):

$$K_{ap} = \frac{RT}{F^2 R_{tc} AC} \quad \text{Eq. 2}$$

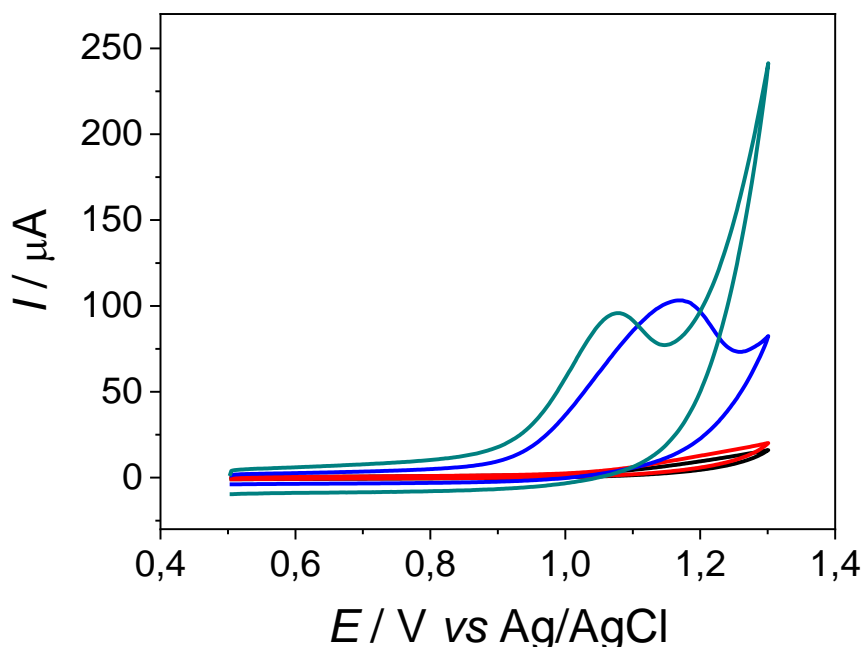
em que K_{ap} é a constante heterogênea da velocidade de transferência de elétrons (cm s^{-1}), R é a constante universal dos gases ($8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T é a temperatura termodinâmica ($298,15 \text{ K}$), F é a constante de Faraday (96485 C mol^{-1}), R_{tc} a resistência de transferência de elétrons (Ω), A é a área eletroativa do eletrodo (cm^2) e C é a concentração das espécies em solução $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ ($10 \mu\text{mol cm}^{-3}$).

Os resultados de K_{ap} (Tabela 1) revelaram uma transferência eletrônica mais rápida para os eletrodos contendo NTC_{PM} , devido principalmente às características eletrocatalíticas deste nanomaterial. Por outro lado, comparando os eletrodos com e sem CMB adicionada, foi possível observar que a presença de moléculas desse biopolímero causou uma diminuição na velocidade de transferência de elétrons, conforme relatado anteriormente (EISELE et al., 2019), confirmando suas propriedades isolantes.

3.3 DESEMPENHO ELETROQUÍMICO DOS ELETRODOS OBTIDOS PARA O SENSORIAMENTO DE DESL

O comportamento eletroquímico da DESL foi avaliado usando o ECV e os ECV modificados. As condições empregadas foram VC a 50 mV s^{-1} e DESL na concentração de $99,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato (pH 8,0). Os perfis de VC para a DESL usando os ECV e suas modificações são mostrados na Figura 8. Como pode ser observado, nessas condições experimentais a DESL não apresentou respostas voltamétricas quando foram empregados os ECV e ECV/CMB. Em contrapartida, um pico irreversível de oxidação da DESL foi observado em torno de 1,17 e 1,08 V ao empregar o ECV/ NTC_{PM} e ECV/ NTC_{PM} -CMB, respectivamente. Esse comportamento destacou o desempenho eletrocatalítico dos NTC_{PM} para a análise de DESL. Ademais, o potencial de oxidação do analito deslocado para valores mais positivos usando o ECV/ NTC_{PM} , em comparação ao ECV/ NTC_{PM} -CMB, é devido, principalmente, à heterogeneidade da modificação do ECV usando a mistura NTC_{PM} -água, o que ocasionou uma superfície do ECV parcialmente exposta, como pode ser observado na Figura 4B.

Figura 8 – Voltamogramas cíclicos (50 mV s^{-1}) de DESL na concentração de $99,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato (pH 8,0) empregando o ECV (—), ECV/CMB (—), ECV/NTC_{PM} (—) e o ECV/NTC_{PM}-CMB (—)



Fonte: o próprio autor.

Para avaliar a reprodutibilidade do preparo dos eletrodos, a mistura NTC_{PM}-água e a dispersão de NTC_{PM} estabilizada com CMB foram utilizadas para preparar seis eletrodos, sendo três eletrodos distintos de ECV/NTC_{PM} e outros três eletrodos distintos de ECV/NTC_{PM}-CMB. Esses eletrodos foram empregados nas medidas de voltametria cíclica da DESL na concentração de $99,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato (pH 8,0). O comportamento eletroquímico da DESL nos ECV/NTC_{PM} foi caracterizado por uma corrente muito instável de $102 \pm 12,7 \mu\text{A}$, devido à baixa reprodutibilidade no preparo do eletrodo, visto que os NTC_{PM} apresentam uma capacidade dispersiva muito baixa em água, acarretando numa heterogeneidade maior entre cada eletrodo. Com a estabilização da dispersão de NTC_{PM} em água pela adição de CMB, a reprodutibilidade do preparo do eletrodo modificado (ECV/NTC_{PM}-CMB) pôde ser melhorada e a resposta eletroquímica da DESL tornou-se mais precisa, com uma corrente de $97,6 \pm 1,1 \mu\text{A}$. Ainda, é importante mencionar que a adição de CMB ao eletrodo levou a uma diminuição na corrente da DESL devido às propriedades não condutoras dos polissacarídeos (ZHENG et al., 2013), e a vantagem

da reprodutibilidade das medidas foi a maior contribuição da CMB na construção do eletrodo para a análise de DESL. É importante ressaltar que a mesma dispersão foi utilizada durante todo o desenvolvimento do trabalho, e ela se manteve estável até presente momento.

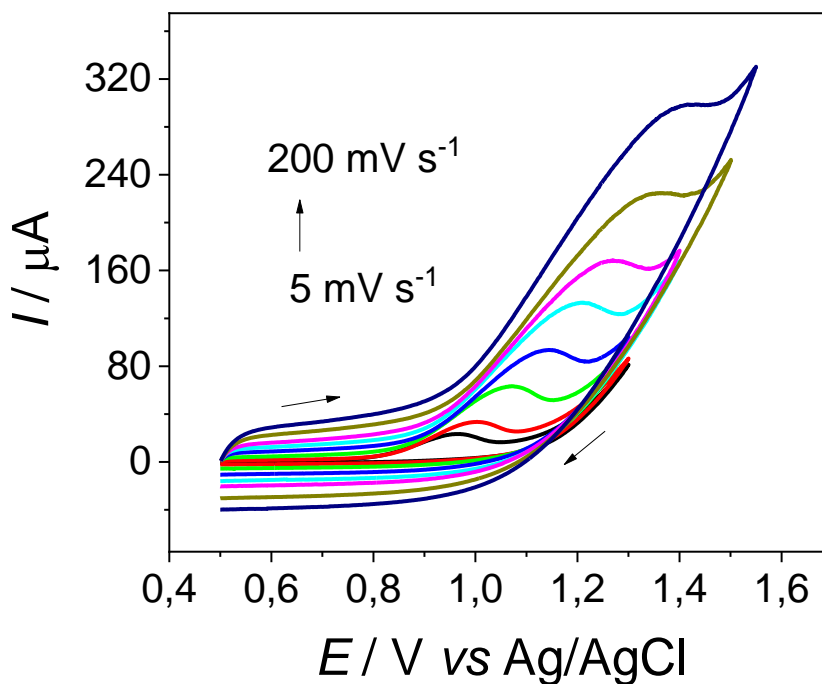
A quantidade de NTC_{PM} e CMB em função de sua dispersão também foi investigada. As razões avaliadas entre as concentrações de NTC_{PM} e CMB foram 1:1, 2:1 e 1:2 (mg mL^{-1} : mg mL^{-1}). Uma proporção de 2:1 (NTC_{PM} :CMB) não foi suficiente para se obter uma dispersão homogênea de NTC_{PM} , porque não houve biomoléculas suficientes para envolver as nanoestruturas de carbono, ao contrário, as proporções 1:2 e 1:1 (NTC_{PM} :CMB) resultaram em dispersões homogêneas. Além disso, como observado na Figura 8, a adição de CMB levou a uma ligeira diminuição na corrente de DESL devido às suas propriedades não condutoras (ZHENG et al., 2013). Por conseguinte, a razão de 1:1 (NTC_{PM} :CMB) foi escolhida para uso nas análises posteriores, garantindo uma dispersão homogênea de NTC_{PM} com um preparo do eletrodo reproduzível e resposta analítica da DESL relativamente mais alta e precisa.

Com o intuito de obter informações qualitativas acerca do mecanismo de eletrooxidação da DESL no ECV/ NTC_{PM} -CMB, voltamogramas cíclicos foram obtidos para a DESL na concentração de $99,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato (pH 8,0), no intervalo de 5 a 200 mV s^{-1} (Figura 9). Como pode ser visto, o potencial de oxidação da DESL desloca-se para potenciais mais positivos conforme a velocidade de varredura aumenta, confirmando a irreversibilidade da reação (GOSSER, 1993; BARD; FAULKNER, 2001). Ainda, uma relação linear entre o logaritmo da corrente e o logaritmo da velocidade de varredura foi obtida, sendo representada pela Equação 3:

$$\log I = 0,677 \log v + 0,853 \quad \text{Eq. 3}$$

onde o valor do coeficiente angular, de 0,68, indica que a etapa lenta da reação de oxidação da DESL no ECV/ NTC_{PM} -CMB é controlada por uma mistura de difusão e adsorção na superfície do eletrodo modificado (GOSSER, 1993; BARD; FAULKNER, 2001).

Figura 9 – Voltamogramas cíclicos da DESL na concentração de $99,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato (pH 8,0), obtidos em diferentes velocidades ($5 - 200 \text{ mV s}^{-1}$), usando o ECV/NTC_{PM}-CMB



Fonte: o próprio autor

O número de elétrons (n) participantes na reação de oxidação da DESL em solução tampão fosfato (pH 8,0) no ECV/NTC_{PM}-CMB foi estimado usando o voltamograma obtido a 50 mV s^{-1} com seus parâmetros aplicados na seguinte equação (Eq. 4) (GOSSER, 1993):

$$E_p - E_{\frac{p}{2}} = \frac{47,7 \text{ mV}}{\alpha n} \quad \text{Eq. 4}$$

onde E_p é o potencial do pico de oxidação, $E_{\frac{p}{2}}$ é o potencial no qual a corrente é a metade da corrente máxima do pico de oxidação e α é o coeficiente de transferência de carga, que, para sistemas irreversíveis assume valor de 0,5 (GOSSER, 1993). Os seguintes valores foram observados: E_p de 1,12 V e $E_{\frac{p}{2}}$ de 1,017 V, assim, o n foi estimado como 1.

3.4 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO VOLTAMÉTRICO PARA A DETERMINAÇÃO DE DESL

O ECV/NTC_{PM}-CMB provou ser uma excelente plataforma para o sensoriamento de DESL. Os objetivos do sensoriamento de DESL são o controle de qualidade de medicamentos, o monitoramento da quantidade desse fármaco no plasma sanguíneo, com a finalidade de ajuste de dosagens e/ou mudança de tratamento medicamentoso e até mesmo avaliar possíveis contaminações de águas superficiais que possam ser causadas pelo descarte inapropriado e/ou irregular de grandes quantidades desse fármaco.

O desenvolvimento de métodos voltamétricos se baseia na avaliação de alguns parâmetros experimentais e instrumentais que afetam a resposta analítica, no caso específico da voltametria, a corrente obtida da oxidação ou redução do analito a ser analisado. Busca-se, portanto, intensificar a corrente obtida e minimizar a corrente de possíveis interferentes presentes na matriz no qual está presente o analito.

Na sequência desse trabalho, uma série de experimentos foi conduzida objetivando o desenvolvimento de um método voltamétrico, empregando VVL, para a determinação de DESL em formulações farmacêuticas visando o controle de qualidade de medicamentos e também a análise de soro de rato, como experimento teste para avaliar a eficiência da nova plataforma sensorial na aplicação em matrizes biológicas.

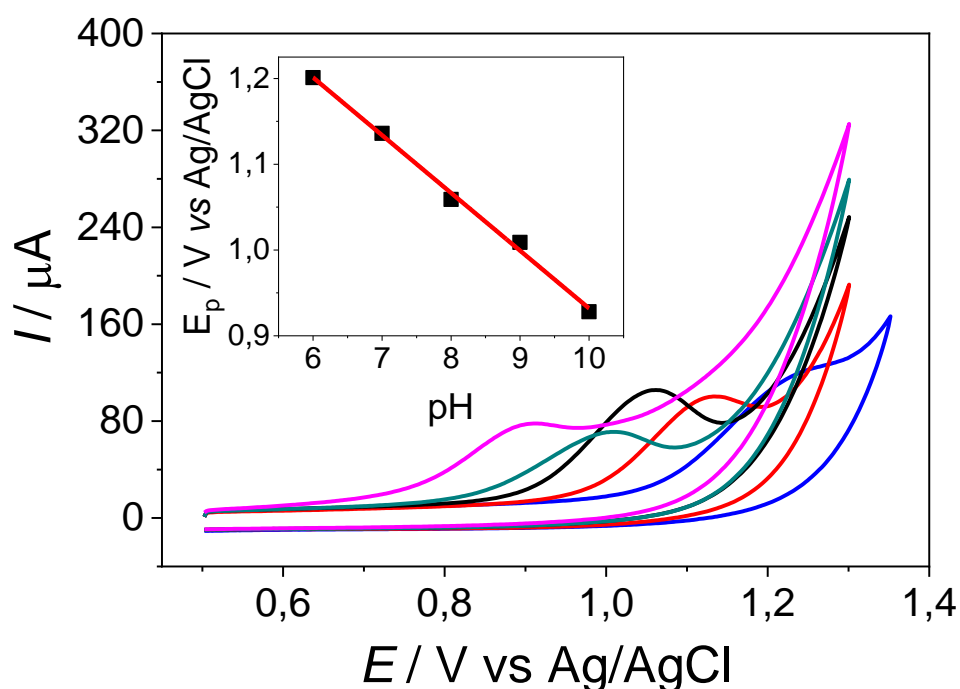
3.4.1 Efeito do pH

A avaliação do pH do eletrólito suporte em medidas voltamétricas é fundamental, pois o pH do meio pode afetar drasticamente a resposta voltamétrica de espécies redox, podendo ser responsável, por exemplo, pela separação de picos de analitos cujos potenciais redox são muito próximos. Moraes et al. (MORAES et al., 2017) ao determinarem quatro fármacos de mesma classe terapêutica (anti-hipertensivos), sendo eles cloridrato de amilorida, besilato de anlodipino, hidroclorotiazida e atenolol, selecionaram o valor de pH 9,0. Este valor de pH promoveu a separação do potencial de oxidação desses quatro anti-hipertensivos, não observando interferência de um na corrente voltamétrica dos outros.

Para a reação de oxidação da DESL na concentração de 99,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ no ECV/NTC_{PM}-CMB, o pH foi avaliado no intervalo de 2,0 a 10,0, empregando

solução tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Entre os valores de pH de 2,0 a 5,0 não foi observado corrente de oxidação da DESL. Por outro lado, entre os valores de pH de 6,0 a 10,0, foi observado corrente de oxidação para a DESL (Figura 10), no qual o valor de pH 8,0 foi aquele que a DESL apresentou um pico mais definido além de ser o de maior intensidade de corrente. Portanto, o pH 8,0 foi o valor escolhido para dar prosseguimento aos experimentos.

Figura 10 – Voltamogramas cíclicos (50 mV s^{-1}) de DESL na concentração de $99,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ usando o ECV/NTC_{PM}-CMB em solução tampão fosfato com o pH ajustado de 6,0 a 10,0. *Inserido*: relação linear entre o potencial de oxidação e o valor de pH



Fonte: o próprio autor

Ainda, nota-se na Figura 10 o deslocamento do pico de oxidação da DESL conforme o valor do pH é alterado. O gráfico inserido na Figura 10, mostra a relação linear obtida entre o potencial de oxidação da DESL e o valor de pH regida pela Equação 5.

$$E_p = -0,066 \times pH + 1,589 \quad \text{Eq. 5}$$

onde, o valor do coeficiente angular está próximo ao valor Nernstiano de $-59,2 \text{ mV}$

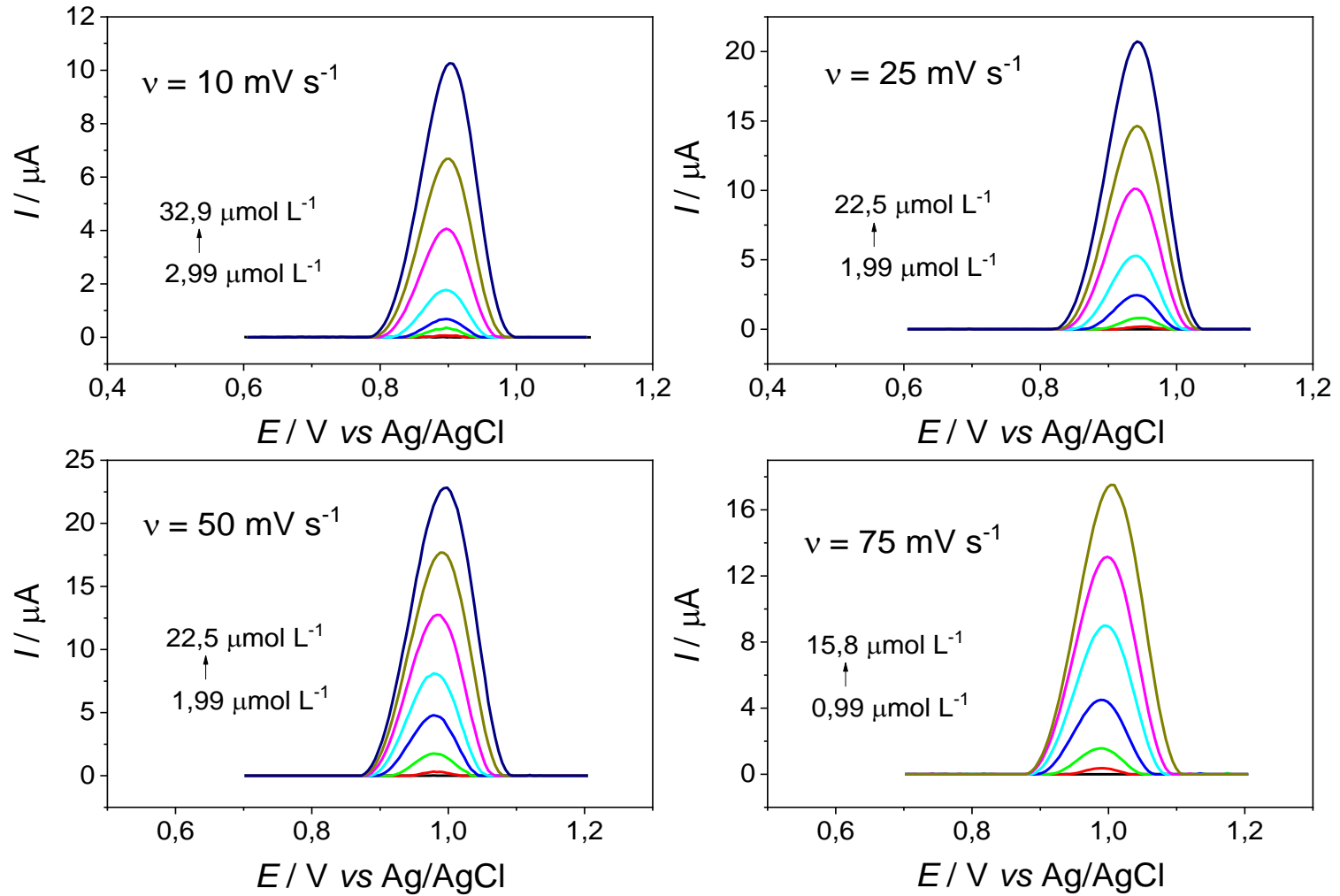
pH^{-1} , indicando que a reação ocorre com a perda de números iguais de prótons e elétrons (BRETT; BRETT, 1993; BARD; FAULKNER, 2001). Considerando que o número de elétrons estimados foi de 1 (seção 3.3) e baseados nos níveis energéticos dos orbitais moleculares da DESL (BRASCA et al., 2013), acredita-se que a oxidação desse anti-histamínico no ECV/NTC_{PM}-CMB ocorra, provavelmente, no anel piridínico perdendo um próton e um elétron.

3.4.2 Curva Analítica

Após a seleção do pH do eletrólito suporte, a VVL foi a técnica escolhida para a construção de curvas analíticas para a determinação de DESL. Na VVL, a aplicação do potencial é em forma de escada, onde a corrente é medida a cada potencial aplicado. A VVL se caracteriza pela variação do potencial de um potencial inicial, até o potencial final em um intervalo de tempo conhecido, assim a velocidade de varredura da VVL pode assumir diferentes valores.

O tamanho da camada de difusão acima da superfície do eletrodo é diferente dependendo da velocidade de varredura de potencial usada, assim, a corrente medida também é afetada pela velocidade de varredura. Em uma velocidade de varredura baixa, a camada de difusão crescerá para muito mais longe do eletrodo em comparação com uma velocidade de varredura rápida. Consequentemente, o fluxo de espécies redox para a superfície do eletrodo é consideravelmente menor em velocidades de varredura mais lentas do que em mais rápidas. Como a corrente é proporcional ao fluxo em direção ao eletrodo, a magnitude da corrente será menor em taxas lentas de varredura e maior em taxas altas. Isso destaca um ponto importante ao examinar os voltamogramas de varredura linear, assim, as curvas analíticas para a determinação de DESL foram construídas em diferentes velocidades de varredura. Para isso, foram empregadas as velocidades de varredura de 10 a 75 mV s^{-1} . A Figura 11 mostra os voltamogramas obtidos para diferentes concentrações de DESL usando diferentes velocidades de varredura.

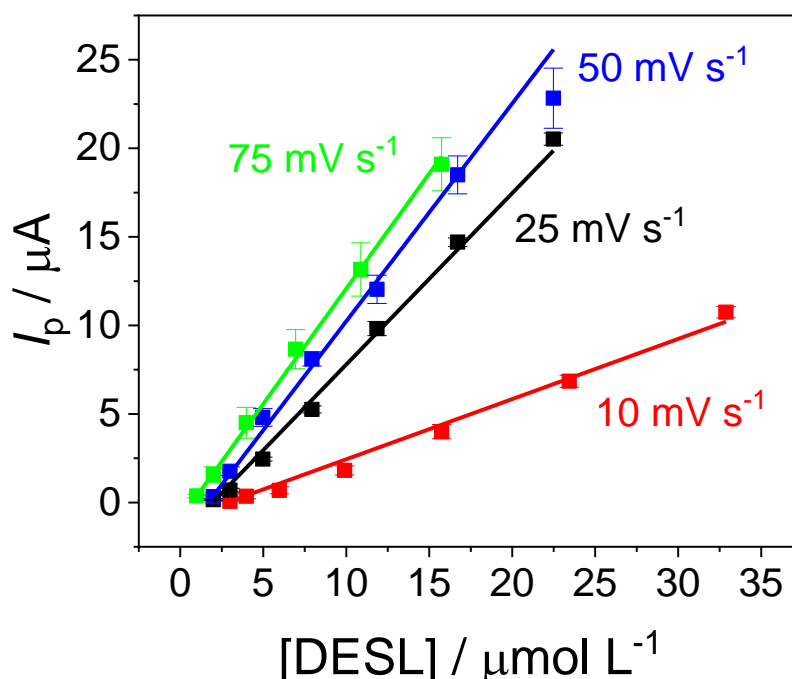
Figura 11 – Voltamogramas de varredura linear para diversas concentrações de DESL em solução tampão fosfato (pH 8,0), empregando velocidades de varredura de **(A)** 10, **(B)** 25, **(C)** 50 e **(D)** 75 mV s^{-1}



Fonte: o próprio autor

A partir desses voltamogramas foram plotadas as curvas analíticas onde se relaciona a corrente de pico (I_p) e as concentrações de DESL (Figura 12). A Tabela 2 apresenta os parâmetros analíticos das curvas obtidas usando as diferentes velocidades de varredura, bem como os parâmetros estatísticos obtidos a partir da análise de regressão linear das curvas analíticas a 95% de confiança. As curvas analíticas construídas apresentaram comportamento linear ($F_{\text{crit}} 4,49$; $p_{\text{crit}} 0,05$) em todas as velocidades de varredura analisadas. Também foi observado que com o aumento da velocidade de varredura, menores concentrações de DESL foram detectadas pelo ECV/NTC_{PM}-CMB, uma vez que em velocidades de varredura mais rápidas, a camada de difusão é menor, facilitando a chegada de moléculas de DESL na superfície do eletrodo modificado. Ainda, a sensibilidade das curvas analíticas também acompanhou a mesma tendência, sendo que a velocidade de varredura de 10 mV s^{-1} obteve a menor sensibilidade e as outras velocidades tiveram sensibilidades relativamente próximas, sendo que a maior sensibilidade foi obtida usando a velocidade de varredura de 75 mV s^{-1} . Do mesmo modo, com o aumento da sensibilidade e da detectabilidade, foram observados LD menores para velocidades de varredura maiores.

Figura 12 – Curvas analíticas obtidas em diferentes velocidades de varredura para a DESL em solução tampão fosfato (pH 8,0) usando o ECV/NTC_{PM}-CMB e VVL



Fonte: o próprio autor

Tabela 2 – Parâmetros analíticos e estatísticos das curvas analíticas de DESL obtidas com o ECV/NTC_{PM}-CMB em diferentes velocidades de varredura usando VVL

Velocidade de varredura (mV s ⁻¹)	Intervalo linear (μmol L ⁻¹)	LD (μmol L ⁻¹)	Sensibilidade (μA L μmol ⁻¹)	R²_{adj}	F_{reg}	p <
10	2,99 – 32,9	1,44	0,3575	0,993	826,4	0,001
25	1,99 – 22,5	0,88	1,018	0,997	3389	0,001
50	1,99 – 22,5	0,57	1,112	0,991	661,6	0,001
75	0,99 – 15,8	0,43	1,162	0,985	318,9	0,001

Fonte: o próprio autor

3.4.3 Precisão

Observou-se também, na Figura 12, que a velocidade de varredura também influenciou na repetibilidade das medidas de corrente da DESL, o que poderia comprometer a precisão do método voltamétrico.

Sendo assim, a precisão foi avaliada em termos de repetibilidade e pela precisão intermediária de correntes obtidas para a DESL na concentração de 4,98 μmol L⁻¹ em solução tampão fosfato (pH 8,0) empregando o ECV/NTC_{PM}-CMB, para todas as velocidades de varredura estudadas.

A repetibilidade foi avaliada em termos de desvio padrão relativo (DPR) das correntes obtidas para a DESL em dez medidas realizadas sucessivamente (N = 10). Já a precisão intermediária foi avaliada em termos de DPR de correntes obtidas em cinco dias de experimentos diferentes (N = 5). Os resultados são mostrados na Tabela 3. Como pode ser observado, houve uma alta precisão (baixo DPR) em velocidades de varredura menores, embora valores menores que 5% foram observados para todas as velocidades de varredura. Portanto, a velocidade de varredura de 25 mV s⁻¹ foi escolhida para ser usada na determinação de DESL pois, apresenta uma sensibilidade relativamente alta, baixo LD além de relativa alta precisão, características fundamentais para o desenvolvimento de métodos analíticos.

Tabela 3 – Repetibilidade e precisão intermediária para DESL empregando o ECV/NTC_{PM}-CMB

Velocidade de varredura (mV s ⁻¹)	Repetibilidade (DPR %)	Precisão intermediária (DPR %)
10	1,88	2,71
25	1,02	3,49
50	4,19	5,82
75	4,95	6,44

Fonte: o próprio autor

3.4.4 Seletividade

Outra característica analisada no desenvolvimento de métodos analíticos é a seletividade, pois sem seletividade suficiente, os outros parâmetros de desempenho perdem o sentido.

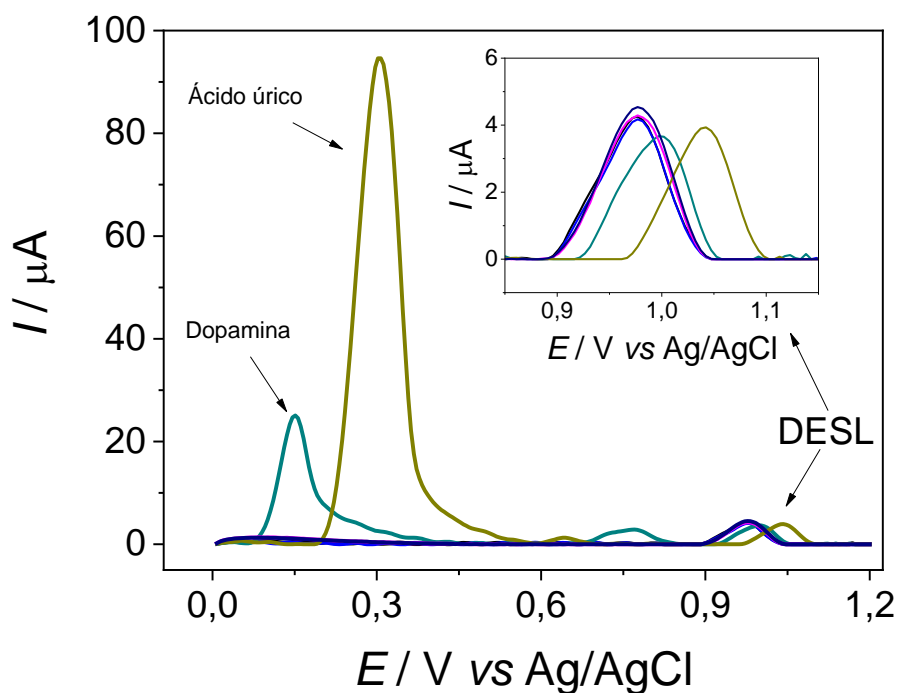
Seletividade é a habilidade de determinar inequivocadamente o analito na presença de componentes que se esperam estarem presentes na matriz a ser analisada. Sendo assim, a seletividade do ECV/NTC_{PM}-CMB foi examinada por VVL (25 mV s⁻¹), utilizando DESL na concentração de 4,98 µmol L⁻¹ na ausência e presença de possíveis agentes interferentes na mesma concentração de analito (4,98 µmol L⁻¹) e em concentração mais alta (49,5 µmol L⁻¹).

A escolha dos prováveis agentes interferentes levou em consideração a matriz das amostras a serem analisadas. Para as amostras de medicamentos, os interferentes testados foram os excipientes das formulações, tais como celulose microcristalina, dióxido de silício, estearato de magnésio, fosfato de cálcio, lactose, glicose, talco, dióxido de titânio e citrato de sódio. O ECV/NTC_{PM}-CMB provou ser seletivo para DESL, pois verificou-se que os excipientes não eram eletroativos nas condições analisadas (janela de potencial testada: 0 a 1,4 V), e as correntes de DESL variaram menos do que 3,77% na presença desses compostos.

Também foram avaliados possíveis agentes interferentes para uma matriz biológica, no caso o soro sanguíneo de rato. Para esta, o ácido ascórbico, dopamina, glicose, ácido úrico e ureia foram estudados. Ácido ascórbico, glicose e ureia foram eletroativas na janela de potencial testada (0 a 1,4 V), e dopamina e ácido úrico apresentaram picos de oxidação em potenciais distintos do potencial da

DESL (Figura 13). Nesse caso, a interferência foi monitorada em termos da resposta relativa (%) de DESL quando o agente interferente foi adicionado comparado com a corrente obtida sem a presença de interferentes (Tabela 4). Como pode ser observado, a resposta da DESL apresentou uma variação máxima de 7,5% na presença de ácido úrico em concentração dez vezes maior do que a do analito. Esses resultados indicaram o potencial do eletrodo modificado para determinar DESL em fluidos biológicos, pois nenhum dos agentes interferentes apresentou picos de oxidação no potencial da DESL, e a corrente obtida para o anti-histamínico não foi alterada significativamente na presença desses possíveis agentes interferentes.

Figura 13 – Voltamogramas de varredura linear para DESL na concentração de $4,98 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato (pH 8,0) e os possíveis agentes interferentes na concentração de $49,5 \mu\text{mol L}^{-1}$. *Inserido:* Amplificação da região da oxidação da DESL



Fonte: o próprio autor

Tabela 4 – Efeito de diferentes proporções de agentes interferentes na resposta relativa de DESL no ECV/NTC_{PM}-CMB em solução tampão fosfato (pH 8,0)

Agente interferente	Resposta relativa de DESL (%)	
	Proporção 1:1	Proporção 1:10
Ácido ascórbico	99,6	98,0
Dopamina	97,7	86,2
Glicose	100,5	100,9
Ácido úrico	98,7	92,5
Ureia	100,8	106,4

Fonte: o próprio autor

3.4.5 Exatidão

Por fim, a exatidão do método desenvolvido foi avaliada por meio de medidas voltamétricas para a determinação de DESL em amostras reais. As amostras foram submetidas à análise por VVL aliada ao ECV/NTC_{PM}-CMB e também por um método espectrofotométrico validado (KUSHARE et al., 2011). Os resultados são mostrados na Tabela 5. Pode-se observar que ambos os métodos apresentaram resultados bem concordantes, com erros relativos inferiores a 4,0%. Os dados foram submetidos a testes estatísticos de comparação e considerando os resultados do teste F (ELLISON; BARWICK; FARRANT, 2009) apresentado na Tabela 5, os valores calculados de F (F_{calc}) foram inferiores ao F_{crit} (19,0), significando que os métodos analíticos apresentaram níveis equivalentes de precisão. O teste t pareado (ELLISON; BARWICK; FARRANT, 2009) também foi aplicado. O valor de t calculado de 2,09 também foi menor que o valor de t crítico (2,20, 95% de confiança) mostrando que o método voltamétrico de varredura linear não foi estatisticamente diferente quando comparado ao procedimento espectrofotométrico validado.

Tabela 5 – Resultados obtidos para a análise de DESL em comprimidos e xarope comercialmente disponíveis por VVL em solução tampão fosfato (pH 8,0) empregando o ECV/NTC_{PM}-CMB em comparação com os resultados obtidos pelo método espectrofotométrico validado

Amostra	Conteúdo de DESL ^a			Erro relativo (E _r , %) ^b	F _{calc}
	Rotulado	VVL	Espectrofotometria		
Comprimido A	5 mg cpmd ⁻¹	4,80 ± 0,14	4,63 ± 0,31	3,67	4,90
Comprimido B	5 mg cpmd ⁻¹	5,01 ± 0,21	4,92 ± 0,40	1,83	3,63
Xarope A	0,5 mg mL ⁻¹	0,477 ± 0,08	0,487 ± 0,15	-2,05	3,52
Xarope B	0,5 mg mL ⁻¹	0,494 ± 0,09	0,475 ± 0,11	4,00	1,49

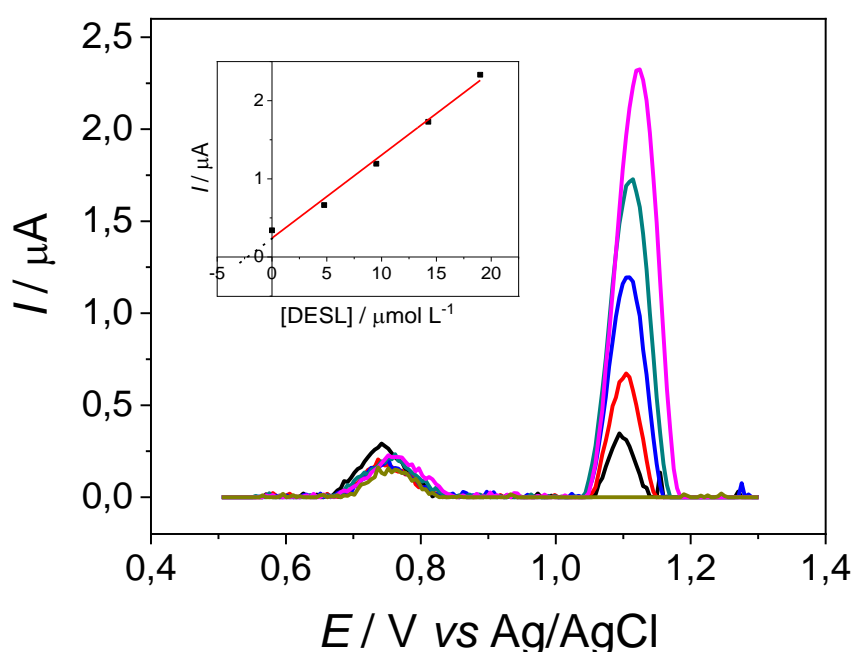
^a Valores obtidos em triplicata; unidades de acordo com o valor rotulado.

^b $E_r = 100\% \times ([VVL - \text{Espectrofotometria}] / \text{Espectrofotometria})$

Fonte: o próprio autor

A eficiência do ECV/NTC_{PM}-CMB também foi avaliada na análise de uma amostra biológica, na qual selecionou-se uma amostra de soro de rato. O método de adição de padrão foi aplicado (Figura 14) e os resultados mostraram que o ECV/NTC_{PM}-CMB é eficiente para a determinação de DESL neste tipo de matriz, visto que a concentração determinada de DESL ($2,28 \mu\text{mol L}^{-1}$) foi muito próxima da esperada ($2,38 \mu\text{mol L}^{-1}$). As porcentagens de recuperação foram calculadas para as medidas realizadas em triplicata, sendo obtida uma recuperação média de $102,6 \pm 5,6\%$, indicando a viabilidade do eletrodo modificado na determinação de DESL nesta amostra biológica.

Figura 14 – Voltamogramas de varredura linear (25 mV s^{-1}) para a amostra de soro de rato, amostra de soro de rato dopada com DESL e mais quatro adições da solução de trabalho de DESL, em solução tampão fosfato (pH 8,0) empregando o ECV/NTC_{PM}-CMB. *Inserido*: Curva de adição de padrão para a análise de DESL em soro de rato dopado



Fonte: o próprio autor

3.5 COMPARAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO COM MÉTODOS VOLTAMÉTRICOS PREVIAMENTE PUBLICADOS PARA A DETERMINAÇÃO DE DESL

O método voltamétrico de varredura linear em conjunto com o ECV/NTC_{PM}-CMB se mostrou uma ferramenta eficiente para a determinação de DESL em formulações farmacêuticas e em amostra de soro de rato. O método apresentou precisão satisfatória e uma seletividade suficiente para a determinação do DESL nas matrizes avaliadas, além de apresentar exatidão nas análises. Entretanto, outros métodos voltamétricos também foram reportados para a determinação de DESL usando outras técnicas voltamétricas e/ou outros eletrodos.

A Tabela 6 apresenta algumas características dos métodos voltamétricos que foram empregados para determinar DESL, incluindo o método desenvolvido por Nagao e colaboradores, publicado após a publicação deste trabalho. Como pode ser observado, o ECV/NTC_{PM}-CMB consiste em um eletrodo modificado e para tanto, foram necessárias algumas etapas para sua preparação. No entanto, o método voltamétrico de varredura linear proposto neste trabalho apresenta algumas vantagens em relação aos demais procedimentos publicados, pois não exigiu etapas prévias nas análises tais como tempo de desaeração e pré-concentração, e apresentou excelente repetibilidade em uma faixa linear mais ampla com um LD relativamente baixo. Já o trabalho descrito por Nagao e colaboradores (NAGAO et al., 2020) supera algumas características do método desenvolvido. Por exemplo, a faixa linear de concentração atinge concentrações bem menores e, por isso, foi possível determinar DESL em amostras ambientais, tais como água de torneira, onde a concentração de DESL é muito baixa.

Tabela 6 – Características e parâmetros analíticos de métodos voltamétricos para a determinação de DESL, em ordem cronológica

Eletrodo	Características do eletrodo e do método	Técnica	Intervalo linear de concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Amostras	Referência
EHgGP	<ul style="list-style-type: none"> - Tempo de pré-concentração de 10 s - Tempo para desaeração de 10 min - Excelente repetibilidade – DPR < 2,9 % para 5 medidas. - Possibilidade de determinar simultaneamente um metabólito da DESL 	VOQ	1,5 – 10,0	0,23	Plasma humano dopado	(ALEKSIĆ et al., 2010)
ECV	<ul style="list-style-type: none"> - Tempo para desaeração de 10 min - Eletrodo sem modificação - Intervalo linear de concentração de altas concentrações 	VOQ	25,5 – 1500	0,0028	Medicamentos e urina humana	(VIDYA et al., 2014)
EDDB	<ul style="list-style-type: none"> - Eletrodo sem modificação - Intervalo linear de concentração de baixas concentrações - Sem necessidade de tempo de pré-concentração ou desaeração 	VPD	0,099 – 6,3	0,041	Medicamentos, urina humana e água de torneira	(NAGAO et al., 2020)

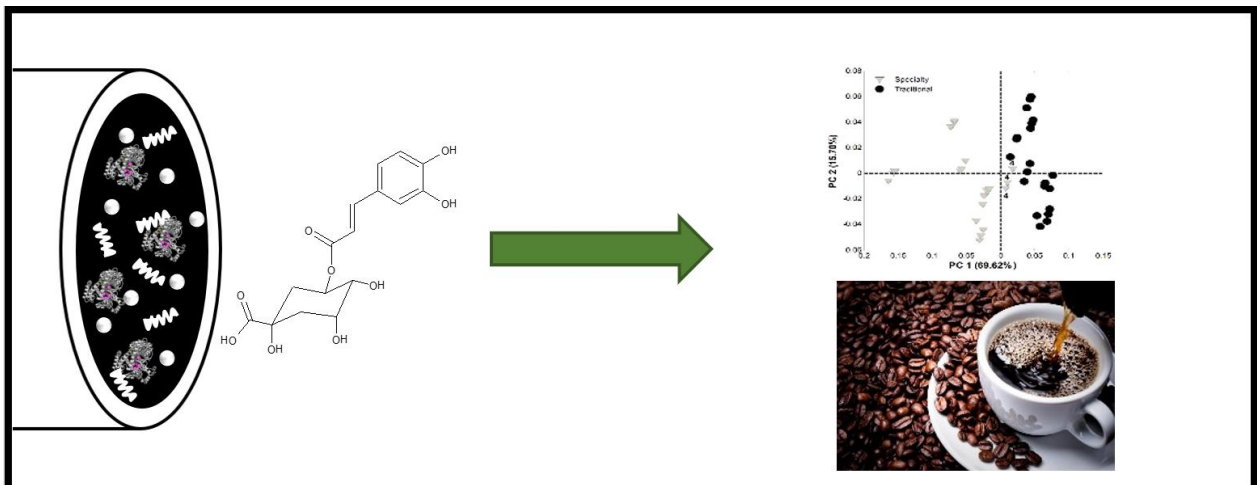
	- Eletrodo modificado						
	- Vida útil longa do eletrodo modificado						
ECV/NTC _{PM} -CMB	- Excelente repetibilidade – DPR = 1,08% para 10 medidas	VVL	1,99 – 32,9	0,88	Medicamentos e soro de rato	Este trabalho (2020)	
	- Sem necessidade de tempo de pré-concentração ou desaeração						

Fonte: o próprio autor

4 CONCLUSÃO

Neste trabalho, uma nova plataforma de sensoriamento foi construída por meio da modificação de um ECV com uma suspensão aquosa de NTC_{PM} estabilizados pela adição de CMB. O eletrodo mostrou-se homogêneo com alta área superficial e rápida transferência eletrônica. O ECV/ NTC_{PM} -CMB foi uma excelente plataforma para a determinação de DESL, sendo então aplicado em conjunto com a VVL na quantificação desse anti-histamínico em medicamentos e em amostras de soro de rato. Os resultados obtidos para a análise dos medicamentos com o método voltamétrico não foram diferentes daqueles obtidos usando um método espectrofotométrico validado, ao nível de 95% de confiança. Os resultados para a determinação de DESL em amostras de soro de rato não indicaram interferência dos componentes da matriz da amostra, confirmando a seletividade do eletrodo modificado para DESL em uma amostra biológica complexa.

CAPÍTULO 2



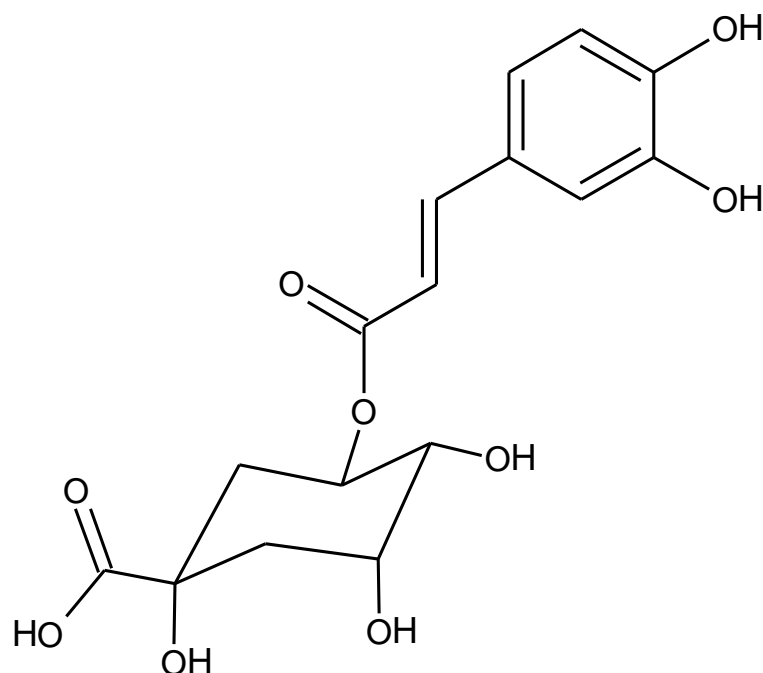
Construção assistida por quimiometria de um biossensor para determinar ácidos clorogênicos em café coado para avaliar qualidade

1 INTRODUÇÃO

O café é uma das bebidas mais consumidas em todo o mundo. O seu consumo está correlacionado com vários benefícios para a saúde, compreendendo redução do risco de Alzheimer, Parkinson, diabetes mellitus tipo 2 e doenças cardiovasculares. Seus benefícios para a saúde dependem de ácidos clorogênicos, cafeína, ácido cafeico, entre outros compostos (GÖKCEN; ŞANLIER, 2019). Esses compostos assim como os carboidratos, lipídios e vitaminas presentes estão diretamente relacionados com a qualidade do café. A proporção de cada composto depende de vários fatores como por exemplo o tipo de cultivar de café (*Coffea spp.*), o método de colheita e os procedimentos de torra dos grãos de café cru. O processo de infusão e filtração também podem ter influência (CHENG et al., 2016; GUIZELLINI et al., 2018; ANGELONI et al., 2019).

Dentre os mais de 950 compostos presentes nos grãos de café torrados (FARAH, 2012), os ácidos clorogênicos têm destaque. Esses compostos são ésteres polifenólicos dos ácidos cafeico, ferúlico e quínico que dão origem a uma família de ácidos o-cafeoilquínico, o-feruloilquínico e o-dicafeoilquínico que existem em três formas isoméricas nas posições 3, 4 e 5 da fração de ácido quínico (BICHO et al., 2013). Dentre os compostos, o ácido 5-cafeoilquínico (5-ACG – Figura 1) é o componente majoritário da classe de ácidos clorogênicos. Esses compostos polifenólicos apresentam várias biofuncionalidades, entre as quais a redução da pressão arterial, melhoram a regulação dos níveis de glicose no sangue, protegem contra doenças cardiovasculares e aterosclerose e apresentam atividade anti-inflamatória e antioxidante (JEON et al., 2019), e sua concentração está relacionada à qualidade do café (CLIFFORD, 1997; FARAH et al., 2006; LEROY et al., 2006).

Figura 1 – Estrutura química do ácido 5-cafeoilquínico, composto majoritário do grupo dos ácidos clorogênicos



Fonte: Farah (2012).

O teor de ácidos clorogênicos no grão torrado de café é em média 1,9 – 3,8 % (FARAH, 2012). O conteúdo de ácidos clorogênicos em bebidas de café já foi determinado por vários métodos analíticos que incluem espectrofotometria de absorção molecular na região do UV-Vis (MOORES; MCDERMOTT; WOOD, 1948) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (ZANIN et al., 2016; JEON et al., 2017; ANGELONI et al., 2019; JEON et al., 2019). A determinação de ácidos clorogênicos usando métodos eletroanalíticos também já foi reportada, principalmente por meio do uso de biossensores (FERNANDES et al., 2009; LITESCU et al., 2010; AMATATONGCHAI et al., 2013; RODRÍGUEZ-DELGADO et al., 2015). O emprego de biossensores é importante na análise eletroquímica de matrizes complexas como a do café coado, pois permite a determinação seletiva e rápida do analito alvo com instrumentação e custos analíticos reduzidos (NGUYEN et al., 2019).

Nesse contexto, a lacase, uma enzima multicobre que catalisa a oxidação de substratos fenólicos na forma reduzida, tem sido empregada em biossensores para determinar compostos fenólicos (RODRÍGUEZ-DELGADO et al., 2015). As lacases são produzidas por diferentes espécies microbianas e vegetais, sendo facilmente obtidas a partir do fungo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 cultivado

em meio nutriente basal com álcool veratrílico como indutor enzimático (VASCONCELOS et al., 2000; DEKKER et al., 2001). Essa enzima, na forma de extrato bruto enzimático, já foi empregada em biossensores para a determinação de epinefrina (MORAES et al., 2019a), dopamina (COELHO et al., 2019) e hidroquinona (MATTOS et al., 2019). O biossensor de lacase atua na catálise da reação de oxidação do composto fenólico à quinona correspondente, aumentando assim, a concentração da espécie oxidada na interface biossensor/solução. O composto oxidado é então reduzido aplicando uma varredura de potencial catódica.

Para isso, a enzima é imobilizada em um suporte na superfície de um eletrodo. Sabe-se que a imobilização enzimática em condições próximas às de seu ambiente natural garante uma enzima mais estável e ativa, sendo uma propriedade importante quando se considera seu uso em biossensores. Assim, a associação de lacase e de bioprodutos produzidos pelo fungo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 foi considerada para a construção do biossensor de lacase.

Em reportes anteriores sobre dispositivos de sensoriamento eletroquímico do Laboratório de Eletroanalítica e Sensores (LAES), o exopolissacarídeo botriosferana (BOT) foi empregado como material de suporte em sensores e biossensores (COELHO et al., 2019; EISELE et al., 2019; MATTOS et al., 2019; SCREMIN et al., 2021). BOT é um exopolissacarídeo do tipo β -(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)-D-glucana produzido pelo fungo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 quando cultivado em meio contendo glucose (DEKKER et al., 2019). O emprego de macromoléculas causa diminuição da transferência de carga em eletrodos devido às propriedades isolantes. Por outro lado, nanopartículas metálicas promovem rápida transferência de elétrons, maior sensibilidade e menores limites de detecção dos analitos, sendo bastante empregados em biossensores (HOLZINGER; LE GOFF; COSNIER, 2014; SCREMIN et al., 2018; MATTOS et al., 2021).

A proporção de materiais usados na construção de eletrodos modificados/biossensores é geralmente determinada aleatoriamente por experimentos univariados. Experimentos univariados (uma abordagem de "um fator de cada vez") não lidam com interações entre materiais e a resposta eletroquímica não é coberta de maneira ideal pelos parâmetros experimentais escolhidos. Uma ótima cobertura da região de resposta eletroquímica é garantida ao variar simultaneamente todos os materiais que influenciam a resposta do biossensor construído. Essa cobertura é obtida por meio de planejamentos de experimentos

(*Design of Experiments* (DoE), como o planejamento estatístico de misturas, onde um número mínimo de experimentos produz o máximo de informação (SCARMINIO; BARROS; BRUNS, 2001; MARCHEAFAVE et al., 2019). Assim, considerando que o uso de planejamento fatorial e de planejamento estatístico de misturas não foram explorados para este fim, o objetivo geral deste capítulo foi usar planejamento de experimentos para desenvolver um novo biossensor e um método voltamétrico para o monitoramento de ácido clorogênico em cafés coados tradicionais e especiais com o intuito de classificá-los quanto a qualidade.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os produtos químicos usados neste trabalho foram de grau analítico e usados como recebidos. Todas as soluções foram preparadas usando água ultra-purificada (resistividade $\geq 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) obtida de um sistema Milli-Q (Millipore®).

Ácido 5-cafeoilquínico (5-ACG; empregado como padrão de ácido clorogênico), ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido cumárico, ácido ascórbico, ácido cloroplatínico (H_2PtCl_6), polivinilpirrolidona (PVP, 55000 g mol^{-1}), dimetilformamida e grafite foram obtidos da Sigma-Aldrich. O eletrólito suporte para as medidas voltamétricas consistiu em uma solução tampão fosfato com o pH ajustado para 4,0 a partir da mistura de soluções $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de hidrogeno e dihidrogenofosfato de potássio (K_2HPO_4 e KH_2PO_4 (Labsynth)). A solução estoque de 5-ACG foi preparada na concentração de 10 mmol L^{-1} em água ultrapura, no dia da análise. As soluções de trabalho foram preparadas pela diluição da solução estoque com o eletrólito suporte.

2.2 INSTRUMENTAÇÃO

As medidas voltamétricas foram realizadas usando um potenciostato/galvanostato PGSTAT 101 (Metrohm Autolab B.V.) controlado pelo programa NOVA 2.1. Os experimentos foram realizados em uma célula de vidro convencional com três eletrodos: uma placa de platina como eletrodo auxiliar, Ag/AgCl ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$ KCl) como eletrodo de referência e o biossensor construído como eletrodo de trabalho.

As experiências de EIE foram realizadas usando um potenciostato/galvanostato FRA II μ Autolab tipo III (Metrohm Autolab B. V.) controlado pelo programa NOVA 1.0. Os experimentos foram realizados com a aplicação do potencial formal do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (0,322 V para os eletrodos empregados neste trabalho), variando de 10 mHz a 100 KHz (10 pontos por década), e com uma perturbação de 10 mV. A solução consistiu em uma mistura de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 5,0 mmol L^{-1} , $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 5,0 mmol L^{-1} e KCl 0,5 mol L^{-1} .

O pH das soluções foi medido usando um pHmetro (modelo W3B; BEL Engineering) empregando um eletrodo de vidro combinado com um eletrodo de referência externo Ag/AgCl (3,0 mol L^{-1} KCl).

As análises de CLAE foram realizadas usando um cromatógrafo Finnigan Surveyor 61607 acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos Plus (PDA) (Thermo Fisher Scientific Inc.). As condições cromatográficas usadas neste estudo foram as descritas por Vinson, Chen e Garver (2019) com algumas modificações. Foi empregada uma coluna ACE 5 C18 (250 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula: 5 μm) em uma temperatura de 24,0 (\pm 0,1) $^\circ\text{C}$. O padrão 5-ACG foi usado para a curva de calibração. O detector foi fixado em 325 nm, o volume de injeção foi de 20 μL e o tempo de retenção do 5-ACG foi de 18 min.

2.3 PREPARO DA PASTA DE ÓXIDO DE GRAFITE

O óxido de grafite foi preparado por tratamento ácido à temperatura ambiente de acordo com Wong et al. (2017). Para este propósito, 1,0 g de pó de grafite foi adicionado a 200 mL de uma mistura de H_2SO_4 e HNO_3 (proporção 1:1, v/v), e essa mistura foi agitada por 12 h, usando agitação magnética. Em seguida, com o auxílio de uma centrífuga, o óxido de grafite foi extensivamente lavado com água ultrapura até o pH atingir 6,5, seguida de secagem a 90 $^\circ\text{C}$. Uma pasta de óxido de grafite foi preparada misturando o óxido de grafite preparado e óleo mineral (Nujol[®]) na proporção de 70:30 % (m/m).

2.4 PRODUÇÃO DE LACASE E BOT PELO FUNGO *BOTRYOSPHAERIA RHODINA* MAMB-05

Lacase e BOT foram obtidos do fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. A lacase foi produzida em condições de fermentação submersa

em meio basal contendo o indutor álcool veratrílico ($30,4 \text{ mmol L}^{-1}$) conforme descrito por Vasconcelos et al. (2000), enquanto a BOT foi produzida em meio contendo 6% de sacarose conforme descrito por Steluti et al. (2004). A BOT foi isolada do caldo de fermentação livre de células por precipitação com etanol e o precipitado foi redissolvido em água sob agitação por 2 h a $60 \text{ }^\circ\text{C}$. O recuperado de Lacase e BOT foram exaustivamente dialisados por meio de várias mudanças de água destilada ao longo de 48 h, seguido de liofilização de ambas as preparações, em separado. O extrato bruto de lacase (LCE) foi obtido pela dissolução do liofilizado em água ultrapura na concentração de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ($0,33$ unidades) e mantida congelada ($-20 \text{ }^\circ\text{C}$). Já a solução aquosa de BOT foi obtida na concentração de $0,113 \text{ g L}^{-1}$ e foi armazenado sob refrigeração ($4 \text{ }^\circ\text{C}$).

2.5 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PLATINA

Para a síntese de nanopartículas de platina, 12 mg de ácido ascórbico e 70 mg de polivinilpirrolidona foram dissolvidos em 12 mL de água ultra purificada. Após completa dissolução, a mistura foi agitada por 10 minutos a $90 \text{ }^\circ\text{C}$. Após, 6 mL de uma solução de H_2PtCl_6 na concentração de $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$ foi rapidamente adicionada à mistura aquecida, produzindo uma suspensão de cor preta após 10 minutos. Após 30 minutos de reação, mais 6 mL da solução de H_2PtCl_6 na concentração de $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$ foi adicionada à mistura e após 30 minutos, as nanopartículas estavam prontas. As NPsPt foram lavadas com acetona (três vezes) e água (duas vezes) sendo as nanopartículas separadas por centrifugação. Para o uso, as NPsPt foram ressuspensas em uma mistura de água:dimetilformamida (1:1, v:v) empregando banho ultrassônico. O teor de platina na suspensão foi $0,16 \text{ mg mL}^{-1}$, determinado usando espectrometria de absorção atômica em chama.

2.6 CONSTRUÇÃO DO BIOSSENSOR

A pasta de óxido de grafite previamente preparada foi cuidadosamente transferida e acomodada na cavidade de um tubo de Teflon[®] contendo uma base gráfrica como contato elétrico (Figura 2). O eletrodo de pasta de óxido de grafite foi então posicionado verticalmente com a superfície da pasta virada para cima para permitir o gotejamento dos componentes do biossensor (NPsPt, lacase

e BOT) na superfície do eletrodo. O eletrodo de pasta de óxido de grafite apresentou área geométrica exposta de 0,0707 cm².

Figura 2 – Fotografia do tubo de Teflon[®] com cavidade gráfica para suporte da pasta de óxido de grafite para ser utilizado como eletrodo de trabalho (biossensor)



Fonte: o próprio autor.

A arquitetura ótima para a construção do biossensor foi determinada por um planejamento estatístico de mistura, onde a proporção ótima foi de 1:6:1 para NPsPt, BOT e lacase, respectivamente. O biossensor foi fabricado em duas etapas: primeiramente, 3 µL da suspensão de NPsPt foram depositados com o auxílio de uma micropipeta sobre a superfície do eletrodo de pasta de óxido de grafite e deixado para secar em temperatura ambiente por 1 h. Em seguida, 12 µL de solução de BOT seguido por 3 µL de lacase foram sequencialmente colocados na superfície contendo a camada de PtNPs. O biossensor foi então deixado secar a uma temperatura de 4,0 °C. Outros (bios)sensores foram fabricados para fins de caracterização e comparação usando o planejamento estatístico de mistura, conforme mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 – Planejamento estatístico de mistura para a construção do biossensor baseado na modificação do eletrodo de pasta de óxido de grafite com os componentes NPsPt, BOT e lacase

Biossensor	Planejamento Experimental			Proporção dos componentes		
	BOT	NPsPt	Lacase	BOT* (μL)	PtNPs* (μL)	Lacase* (μL)
1	1	0	0	18	0	0
2	0	1	0	0	18	0
3	0	0	1	0	0	18
4	0,50	0,50	0	9	9	0
5	0	0,50	0,50	0	9	9
6	0,50	0	0,50	9	0	9
7	0,66	0,17	0,17	12	3	3
8	0,17	0,66	0,17	3	12	3
9	0,17	0,17	0,66	3	3	12
10	0,33	0,33	0,33	6	6	6

* BOT: 0,113 g L⁻¹; Lacase: 1,0 mg mL⁻¹; PtNPs: 0,16 mg mL⁻¹

Fonte: o próprio autor.

2.7 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS E ESTATÍSTICA

As condições para otimizar os parâmetros para construir o biossensor para medir o teor de ácidos clorogênicos foram realizadas usando uma matriz de planejamento estatístico de mistura (SCARMINIO; BARROS; BRUNS, 2001) com três componentes (BOT, PtNPs e lacase) em uma configuração com 10 condições experimentais (Tabela 1). Em um experimento de mistura, a soma das frações dos componentes deve ser igual à unidade e suas proporções não devem ser negativas. As restrições sobre os níveis de cada fator são expressas da seguinte forma (Eq 1):

$$\sum_{i=1}^q x_i = 1 \quad (\text{i.e., } 100\%) \quad \text{Eq. 1}$$

onde x_i representa a proporção do i ésimo componente na mistura, e q é o número de componentes (SCARMINIO; BARROS; BRUNS, 2001). A vantagem de se utilizar esta abordagem sistemática na construção de um dispositivo biossensor está na modelagem dos dados através de modelos canônicos típicos para representar a resposta voltamétrica do biossensor em função da proporção dos componentes e assim, prever as interações entre eles. O modelo que descreve o maior número de interações entre esses componentes é o modelo cúbico completo.

O modelo cúbico completo para uma mistura de três componentes é dado pela expressão genérica simplificada (Eq. 2):

$$\begin{aligned} \hat{y} = & b_1^* x_1 + b_2^* x_2 + b_3^* x_3 + b_{12}^* x_1 x_2 + b_{13}^* x_1 x_3 + b_{23}^* x_2 x_3 \\ & + d_{12}^* x_1 x_2 (x_1 - x_2) + d_{13}^* x_1 x_3 (x_1 - x_3) + d_{23}^* x_2 x_3 (x_2 - x_3) \\ & + b_{123}^* x_1 x_2 x_3 \end{aligned} \quad \text{Eq. 2}$$

onde \hat{y} é a resposta preditiva em função da proporção dos componentes empregada, x_1 , x_2 e x_3 , e seus respectivos coeficientes de regressão (b^* e d^*). Os três primeiros termos da expressão descrevem a contribuição de componentes puros, os outros termos descrevem a contribuição resultante da interação entre pares de componentes e o último termo descreve a contribuição resultante da interação entre três componentes na resposta final. No caso do biossensor, um termo positivo nesta equação indica interações antagônicas, enquanto termos negativos indicam interações sinérgicas na resposta final do biossensor (maior corrente de redução).

A qualidade dos modelos de mistura é expressa pela Análise de Variância (ANOVA) dos dados de regressão, onde as variáveis independentes para a otimização dos parâmetros de construção de um dispositivo de biossensoriamento de ácidos clorogênicos foram BOT, NPsPt e lacase, conforme descrito na Tabela 1.

A otimização dos parâmetros experimentais e operacionais para a determinação voltamétrica de ácidos clorogênicos pelo biossensor consistiu em um planejamento fatorial 2^4 com ponto central (avaliando pH, amplitude (a), frequência (f) e incremento de potencial (ΔE) com 17 condições experimentais), seguido por um delineamento composto central (avaliando a , f e ΔE com 15 condições experimentais). As condições ótimas foram escolhidas com base na maior resposta do biossensor para a eletrorredução de 5-ACG (o componente majoritário dentre os ácidos clorogênicos).

A ANOVA e análises de regressão múltipla foram realizadas usando o programa Statistica 7.0. As análises estatísticas foram realizadas usando o programa Origin® com nível de confiança de 95 %. A análise de componentes principais foi realizada usando o programa MATLAB versão R2007b, enquanto que o programa PLS Toolbox versão 5.8.1 foi utilizado para pré-processamento, análise e visualização dos dados.

2.8 AMOSTRAS DE CAFÉ E PREPARO DA BEBIDA

O biossensor fabricado foi aplicado para determinar ácidos clorogênicos em cafés coados. As amostras de café (*Coffea arabica*) foram classificadas como tradicionais ou especiais. Os cafés tradicionais eram de diferentes marcas adquiridos em um supermercado local. Os cafés especiais (pontuação de torrefação Agrton 55) foram classificados como de muito boa qualidade de acordo com os protocolos da *Specialty Coffee Association of America* (SCAA) com pontuação de $83,3 \pm 0,9$, e foram obtidos na Feira Internacional de Cafés Especiais (março de 2016), em Jacarezinho-PR, Brasil.

As bebidas de café coado foram preparadas da seguinte maneira: 10 g de cada amostra de café moído foram transferidos para um filtro de papel de café disposto em um funil de vidro. Um volume de 100 mL de água de torneira aquecida a 97 °C foram adicionadas cuidadosamente ao pó de café, garantindo que toda a amostra contida no filtro fosse molhada. O filtrado foi coletado e corresponde a amostra de café coado a ser analisada.

Para análise eletroquímica, uma alíquota de 25 µL de cada amostra de café coado foi transferida diretamente para a célula eletroquímica. Para análise por CLAE, as amostras de café foram previamente filtradas em filtro de membrana PTFE-20/25 0,20 µm (Chromafil® Xtra), e então injetadas diretamente no sistema cromatográfico.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção de lacase e BOT depende do meio nutriente no qual o fungo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 é cultivado. Quando cultivada em meio basal (glicose e sais mínimos) na presença do indutor de lacase, álcool veratrílico, a lacase

é produzida acima dos níveis constitutivos (DEKKER; BARBOSA, 2001), mas ao mesmo tempo, nestas condições, a presença do indutor interferiu na biossíntese de BOT resultando em quantidades diminuídas de produção (DEKKER et al., 2001). Quando cultivado em meio de sacarose, os níveis de BOT aumentaram substancialmente (STELUTI et al., 2004), mas isso também foi acompanhado por baixos níveis de lacase (CUNHA et al., 2003). Assim, tendo em conta a produção de qualquer um dos bioprodutos, a lacase e BOT coexistem no meio de fermentação, representando um ambiente natural tanto para a enzima quanto para o exopolissacarídeo. A BOT apresenta propriedades de filme que podem servir na imobilização da lacase em biossensores (COELHO et al., 2019; MATTOS et al., 2019).

Considerando ainda que as NPsPt apresentam características eletrocatalíticas interessantes (RAMÍREZ-MENESES et al., 2009; SONG et al., 2019), neste trabalho buscou-se fabricar um dispositivo biossensor utilizando um planejamento estatístico de mistura na qual camadas de NPsPt, BOT e lacase fossem depositadas sequencialmente na superfície de um eletrodo de pasta de óxido de grafite, e empregar este biossensor desenvolvido para determinar eletroquimicamente o teor de ácidos clorogênicos em bebidas de café, um indicativo da qualidade do café (FARAH et al., 2006; LEROY et al., 2006; ZANIN et al., 2016).

3.1 PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO DE MISTURA PARA A CONSTRUÇÃO DO BIOSENSOR

A arquitetura do biossensor foi avaliada usando três componentes (NPsPt, BOT e lacase) dispostos em um planejamento estatístico de mistura (Tabela 1). Um total de dez (bio)sensores foram construídos com diferentes proporções dos componentes (Figura 3A), três arquiteturas correspondem a componentes puros (pontos de vértice – círculos brancos), três a uma mistura binária de dois componentes (pontos de aresta – círculos pretos), três à mistura ternária com proporções diferentes (pontos axiais – losango branco) , e a última correspondente à mistura ternária (ponto central – losango preto), que foi executada em triplicata para avaliação estatística. As respostas dos (bio)sensores foram avaliadas em termos da corrente catódica usando VOQ (a : 40 mV; f : 30 s⁻¹; ΔE : 2 mV) obtida para uma solução de 5-ACG 99,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato (pH 6,0). A Figura 3B apresenta o gráfico da superfície de resposta para o modelo cúbico simplificado (Eq. 3*) obtido com os dados experimentais de resposta voltamétrica, que indica a corrente obtida, onde quanto

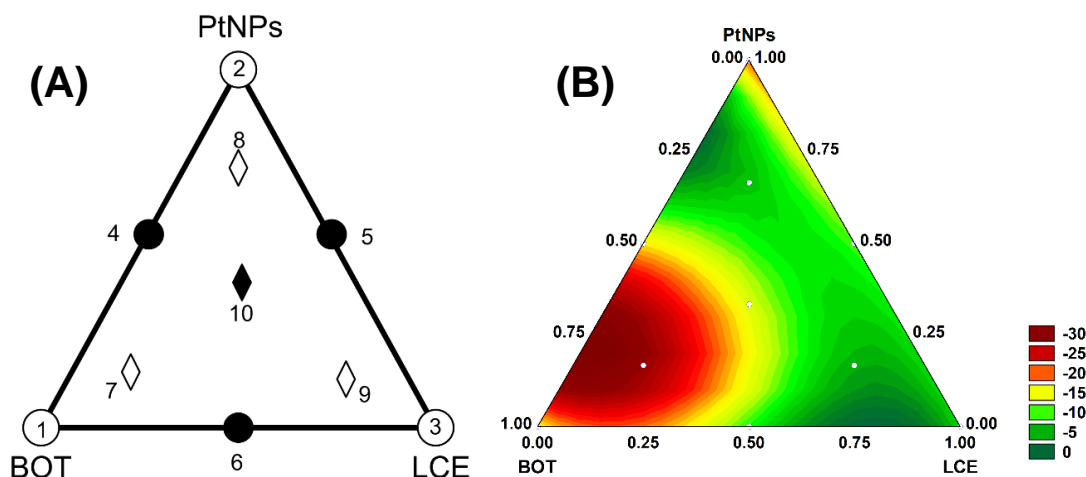
menor a corrente (mais negativa) maior a resposta do (bio)sensor.

$$\hat{y}_{\text{current}} = -14.70\text{BOT} - 6.31\text{LCE} - 19.15\text{PtNPs} + 6.78\text{BOT.LCE} + 12.36\text{LCE.PtNPs} - 75.21\text{BOT.LCE.PtNPs} - 82.10\text{BOT.LCE}(\text{BOT-LCE}) - 182.81\text{BOT.PtNPs}(\text{BOT-PtNPs}) \quad \text{Eq. 3}$$

(± 0.60) (± 0.60) (± 0.60) (± 2.93) (± 2.93) (± 19.22) (± 9.73) (± 9.73)

*LCE: lacase

Figura 3 – (A) Planejamento estatístico de mistura compreendendo componentes puros (○), misturas binárias (●) e misturas ternárias (◇ - proporções diferentes e ◆ - proporções iguais) para a construção do biossensor. As condições experimentais estão indicadas numericamente. **(B)** Gráfico de superfície de resposta obtidos para diversas composições de NPs Pt, BOT e lacase na construção do biossensor. As cores indicam a corrente obtida para a redução de 5-ACG pelo biossensor



Fonte: o próprio autor.

De acordo com a Eq. 3, os coeficientes lineares mais importantes foram NPs Pt e BOT seguidos por lacase. As combinações binárias (BOT-lacase e lacase- NPs Pt) apresentaram efeito antagônico na resposta do biossensor, mas a interação ternária (BOT-lacase- NPs Pt) teve efeito sinérgico na resposta, ou seja, quando os três materiais foram associados, respostas maiores foram alcançadas, em comparação às misturas binárias e componentes puros. A interação ternária é mostrada na curvatura da superfície de resposta próxima à condição experimental de número 7 do planejamento de mistura (Figura 3B e Tabela 1). A presença de NPs Pt contribuiu para uma maior resposta eletroquímica, pois apresenta características

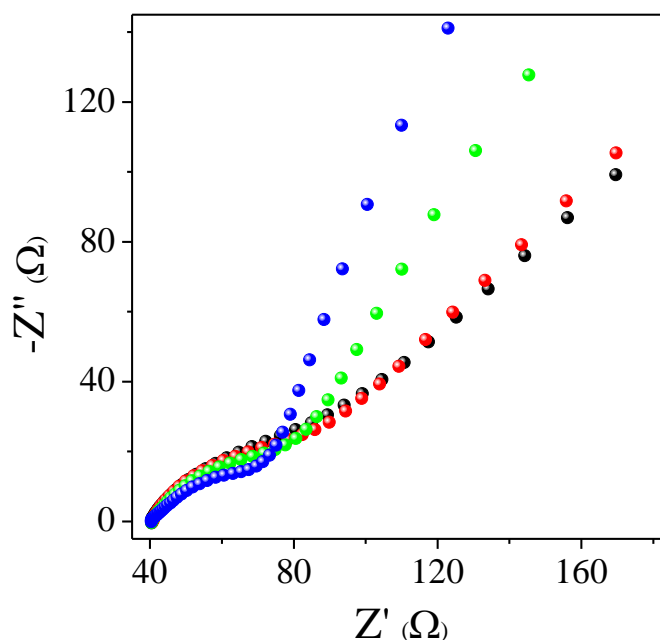
eletrocatalíticas e maior condutividade (RAMÍREZ-MENESES et al., 2009; SONG et al., 2019). Associada a esta característica, a combinação entre BOT e lacase indica que uma pequena quantidade da enzima colocada em seu ambiente natural (na presença de BOT) resulta em um biossensor de maior resposta, indicando uma maior atividade enzimática.

O modelo de regressão cúbica (Eq. 3) apresentou R_{aj}^2 superior a 98%, porém apresentou falta de ajuste no nível de confiança de 95% ($MQ_{lof} / MQ_{ep} = 16,7 < F_{1,2} = 18,5$), conforme os resultados da ANOVA. Essa observação indica que o modelo se ajusta satisfatoriamente aos dados experimentais, porém não pode ser usado para prever a resposta do biossensor com base na combinação dos três componentes. Dessa forma, considerando que a maior resposta obtida foi a do biossensor do ponto axial 7 (2/3 BOT; 1/6 PtNPs e 1/6 lacase - Tabela 1), a proporção combinada dos três componentes foi empregada para construir o biossensor.

3.2 CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DO BIOSENSOR

As propriedades de cada componente adicionado na construção do biossensor foram avaliadas por medidas de EIE, onde no gráfico de Nyquist obtido para o (bio)sensor investigado, o semicírculo formado na região de alta frequência após subtrair a resistência da solução de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ está relacionado ao valor da resistência de transferência de elétrons (R_{tc}) (ORAZEM; TRIBOLLET, 2008). Os espectros foram obtidos para o eletrodo de pasta de óxido de grafite antes e após cada adição sequencial dos componentes do biossensor, em solução $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$, no intervalo de frequência de 100 kHz a 0,1 Hz, em um potencial de 0,322 V vs Ag/AgCl (Figura 4). A adição de NPsPt ao eletrodo de pasta de óxido de grafite causou uma diminuição na R_{ct} de 56,2 para 44,7 Ω . Isso está relacionado à alta condutividade e propriedades eletrocatalíticas das nanopartículas metálicas (HOLZINGER; LE GOFF; COSNIER, 2014). A adição de BOT e lacase foi responsável por um aumento na R_{ct} para 63,8 e 67,2 Ω , respectivamente. Os resultados obtidos estão de acordo com observações anteriores sobre as propriedades de baixa condutividade da BOT e da lacase (COELHO et al., 2019; EISELE et al., 2019; MATTOS et al., 2019).

Figura 4 – Diagramas de Nyquist do (verde) eletrodo de pasta de óxido de grafite e suas modificações com (azul) NPsPt, (vermelho) NPsPt e BOT e (preto) NPsPt, BOT e lacase, em solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ no intervalo de frequência de 100 KHz e 0,1 Hz. $E_{\text{aplicado}} = 0,322 \text{ V vs. Ag/AgCl}$



Fonte: o próprio autor.

Ao comparar o biossensor composto pelos três componentes e o sensor composto apenas por NPsPt e BOT, conforme a execução experimental número 7 sem adição de lacase (Tabela 1), verificou-se que o biossensor apresentou um valor de R_{ct} menor, pois continha uma maior quantidade de biomoléculas com características isolantes. No entanto, a resposta do biossensor para a redução de 5-ACG $99,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato (pH 4,0) foi maior que o sensor com dois componentes ($I_{\text{biossensor}} = -127 \pm 0,27 \mu\text{A}$ e $I_{\text{sensor}} = -106 \pm 1,4 \mu\text{A}$). Essa observação destaca e confirma o papel da lacase na oxidação catalítica de polifenóis (RODRÍGUEZ-DELGADO et al., 2015; MORAES et al., 2019a). É importante mencionar que esses dados foram obtidos após a otimização dos parâmetros operacionais da VOQ, que é descrita na próxima seção.

3.3 PLANEJAMENTO FATORIAL PARA A OTIMIZAÇÃO DA RESPOSTA PARA ÁCIDOS CLOROGÊNICOS

Dependendo do pH, a atividade da lacase bem como a resposta voltamétrica para a redução do 5-ACG é diferente e, conseqüentemente, o efeito do pH foi avaliado. Como a resposta voltamétrica do biossensor está diretamente relacionada aos parâmetros operacionais da técnica voltamétrica utilizada, foi empregado um planejamento fatorial 2^4 completo com ponto central (Tabela 2) seguido de outra abordagem experimental de planejamento com um delineamento composto central (Tabela 3). A otimização do método foi realizada por meio da execução de vários experimentos variando o pH e cada um dos parâmetros operacionais da VOQ (a , f e ΔE) em dois níveis diferentes com um ponto central, para o planejamento fatorial (Tabela 2). Para o planejamento composto central (Tabela 3), os parâmetros operacionais da VOQ foram avaliados em uma faixa mais específica, a partir dos resultados experimentais do planejamento fatorial. As Tabelas 2 e 3 apresentam os parâmetros estudados e os dados obtidos para cada experimento.

Tabela 2 – Matriz experimental de planejamento fatorial 2^4 e os respectivos resultados para otimização de pH e parâmetros operacionais da VOQ para determinação de 5-ACG pelo biossensor

Planejamento Fatorial (2^4)					
Fatores	Níveis				
	Inferior (-)	Superior (+)	Central (0)		
<i>pH</i>	4	8	6		
<i>a</i> (mV)	25	100	62,5		
<i>f</i> (s ⁻¹)	30	50	40		
ΔE (mV)	3	7	5		

Experimento	Níveis codificados				Resposta (- μ A)
	pH	<i>a</i>	<i>f</i>	ΔE	
1	-	-	-	-	17,4 \pm 0,50
2	+	-	-	-	5,49 \pm 0,25
3	-	+	-	-	58,9 \pm 0,71
4	+	+	-	-	14,3 \pm 0,61
5	-	-	+	-	15,1 \pm 0,31
6	+	-	+	-	5,81 \pm 0,20
7	-	+	+	-	54,2 \pm 0,62
8	+	+	+	-	15,6 \pm 0,24
9	-	-	-	+	29,1 \pm 0,15
10	+	-	-	+	8,35 \pm 0,10
11	-	+	-	+	127 \pm 0,27
12	+	+	-	+	23,4 \pm 0,18
13	-	-	+	+	23,3 \pm 0,07
14	+	-	+	+	6,42 \pm 0,12
15	-	+	+	+	75,6 \pm 0,41
16	+	+	+	+	20,3 \pm 0,37
17	0	0	0	0	34,6 \pm 0,25

Fonte: o próprio autor.

Tabela 3 – Matriz experimental de planejamento de composto central e os respectivos resultados para otimização de parâmetros operacionais da VOQ para determinação de 5-ACG pelo biossensor

Planejamento composto central (2 ³)			
Fatores	Níveis		
	Inferior (-)	Superior (+)	Central (0)
a (mV)	80	120	100
f (s⁻¹)	20	40	30
ΔE (mV)	5	9	7

Experimento	Níveis codificados			Resposta (-μA)
	a	F	ΔE	
1	-	-	-	91,5 ± 0,60
2	+	-	-	115 ± 0,54
3	-	+	-	83,2 ± 0,03
4	+	+	-	113 ± 0,09
5	-	-	+	113 ± 0,34
6	+	-	+	156 ± 0,88
7	-	+	+	104 ± 0,61
8	+	+	+	152 ± 0,44
9	1.68	0	0	151 ± 0,91
10	-1.68	0	0	87,2 ± 0,62
11	0	1.68	0	107 ± 0,15
12	0	-1.68	0	128 ± 0,94
13	0	0	1.68	153 ± 0,60
14	0	0	-1.68	72,8 ± 0,59
15	0	0	0	127 ± 0,27

Fonte: o próprio autor.

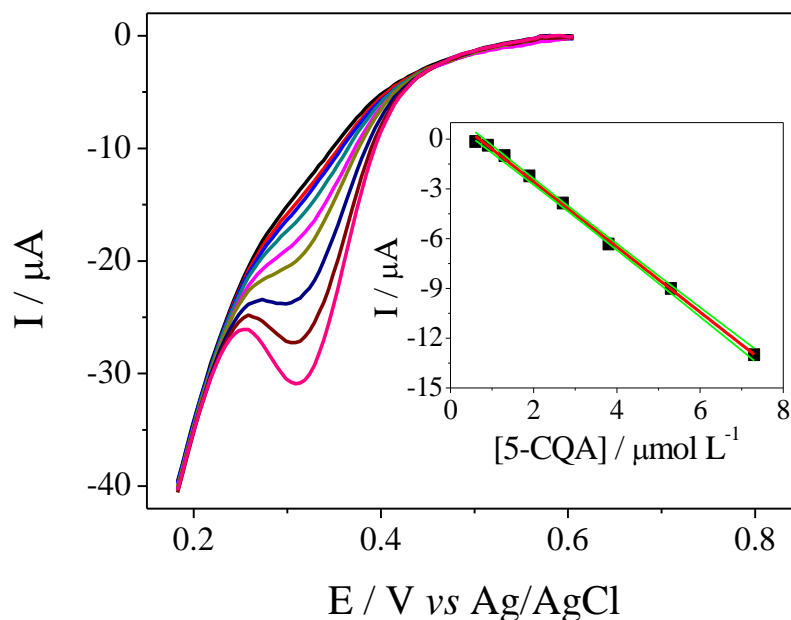
Como pode ser visto na Tabela 2, quanto menor o pH e os valores de f , maiores respostas voltamétricas foram obtidas. Por outro lado, quanto maior os valores de a e ΔE , maiores as respostas voltamétricas. Portanto, o pH foi fixado em

4,0, e os parâmetros operacionais a de 100 mV, f de 30 s^{-1} e ΔE de 7 mV, passaram a ser o ponto central da nova matriz codificada do planejamento composto central, com os parâmetros variando conforme a Tabela 3. Maiores valores de a e ΔE , e menores valores de f contribuíram para o aumento da resposta do biossensor, mas ao mesmo tempo foram responsáveis por uma deformação no formato do pico de redução. Consequentemente, as condições do experimento 15 ($\text{pH} = 4,0$, $a = 100 \text{ mV}$, $f = 30 \text{ s}^{-1}$ e $\Delta E = 7 \text{ mV}$) foram escolhidas para a determinação de ácidos clorogênicos, pois foi a condição que apresentou uma elevada resposta voltamétrica sem ser notado qualquer deformação no formato do pico.

3.4 CURVA ANALÍTICA PARA O 5-ACG USANDO O BIOSSENSOR DE LACASE E AVALIAÇÃO DE ESTABILIDADE DE ARMAZENAMENTO E VIDA ÚTIL

Com a utilização dos parâmetros operacionais da VOQ (condição experimental 15, Tabela 3) otimizados, a curva analítica baseada na resposta voltamétrica do biossensor para o 5-ACG foi obtida em solução tampão fosfato ($\text{pH} 4,0$). Cada voltamograma de onda quadrada foi obtido após a adição de pequenas alíquotas da solução de trabalho de 5-ACG na célula eletroquímica contendo 10 mL do eletrólito suporte. A curva analítica foi construída em triplicata. Os voltamogramas e a curva analítica obtida estão apresentados na Figura 5.

Figura 5 – Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando o biossensor para diferentes concentrações de 5-ACG ($0,56 - 7,3 \mu\text{mol L}^{-1}$) em solução tampão fosfato (pH 4,0). *Inserido*: a respectiva curva analítica com ajuste linear (linha vermelha) e intervalos de confiança em 95% de nível de confiança (linhas verdes)



Fonte: o próprio autor.

A resposta do biossensor foi avaliada e apresentou comportamento linear para a corrente de redução do 5-ACG na faixa de concentração de $0,56 - 7,3 \mu\text{mol L}^{-1}$. A equação correspondente foi $I(\mu\text{A}) = 1,36 \mu\text{A} - 1,96 [5\text{-ACG}]/(\mu\text{mol L}^{-1})$. O LD foi calculado com base na relação sinal-ruído e o valor obtido foi de $0,18 \mu\text{mol L}^{-1}$.

A vida útil e a estabilidade durante armazenamento do biossensor foram avaliadas medindo a resposta voltamétrica para 5-ACG em uma concentração de $1,99 \mu\text{mol L}^{-1}$ usando o biossensor por 30 dias (cinco medições por dia), sem qualquer renovação superficial. Quando não estava em uso, o biossensor foi mantido sob refrigeração ($\sim 4 \text{ }^\circ\text{C}$) até a próxima análise. A resposta do biossensor diminuiu 3,48% no final do 7º dia (35 medições) e 6,59% no final do 30º dia (150 medições). Os resultados indicaram que o biossensor à base de lacase desenvolvido possui excelente estabilidade de armazenamento e uma longa vida útil quando comparado a outros biossensores à base de lacase já reportados (HUANG et al., 2008; ARSLAN et al., 2015; MORAES et al., 2019a).

3.5 ANÁLISE DE BEBIDAS DE CAFÉS TRADICIONAIS E ESPECIAIS

O biossensor desenvolvido foi aplicado na determinação de ácidos clorogênicos em cafés especiais e tradicionais. Previamente, foi realizado um estudo de interferência para identificar possíveis interferências de outros componentes nas amostras de café durante as análises eletroquímicas por VOQ. Compostos como ácido ferúlico, ácido cumárico, ácido cafeico, cafeína e glicose, comumente presentes no café, foram avaliados como possíveis agentes interferentes. A interferência foi avaliada em termos de variação da resposta do biossensor (corrente catódica) para $1,99 \mu\text{mol L}^{-1}$ de 5-ACG após a adição de $1,99$ (1:1) e $19,6$ (1:10) $\mu\text{mol L}^{-1}$, de cada um dos compostos interferentes em solução tampão fosfato (pH 4,0). A resposta do biossensor teve uma variação máxima de 4,5% após a adição dos compostos interferentes na concentração equimolar de $1,99 \mu\text{mol L}^{-1}$, e não mais que 6,3% após a adição de compostos interferentes em altas concentrações ($19,6 \mu\text{mol L}^{-1}$), indicando assim baixa interferência na determinação de ácidos clorogênicos (em termos da resposta do componente majoritário, 5-ACG) pelo dispositivo biossensor desenvolvido.

As bebidas de café coado foram analisadas diretamente pelo biossensor de lacase usando VOQ e, para fins comparativos, também foram analisadas por um método cromatográfico (adaptado de (VINSON; CHEN; GARVER, 2019)). Os resultados do teor de ácidos clorogênicos (em termos de 5-ACG) nos cafés tradicionais e especiais são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Resultados obtidos na determinação de ácidos clorogênicos (em termos de 5-ACG) em bebidas de cafés especiais e tradicionais pelo método voltamétrico empregando o biossensor e pelo método cromatográfico

Amostra de café ^a	Concentração de ácidos clorogênicos ^{b, c}		Erro Relativo (%) ^d	$F_{\text{calculado}}^e$
	CLAE	Biossensor/VOQ		
E1	330,2 ± 9,4	326,2 ± 9,3	-1,19	1,02
E2	360,5 ± 7,6	377,8 ± 3,3	4,78	5,39
E3	402,6 ± 9,1	401,3 ± 5,3	-0,31	2,99
E4	236,1 ± 8,6	223,9 ± 9,3	-5,14	1,17
E5	380,3 ± 9,3	361,9 ± 6,5	-4,84	2,76
E6	361,5 ± 6,5	366,3 ± 3,9	1,32	2,75
E7	322,5 ± 1,9	318,1 ± 4,1	-1,36	4,71
T1	264,3 ± 7,3	271,5 ± 4,5	2,70	2,63
T2	258,4 ± 6,4	259,6 ± 5,4	0,47	1,40
T3	227,4 ± 8,2	212,8 ± 2,8	-6,42	8,55
T4	298,2 ± 3,3	312,3 ± 7,8	4,73	5,81
T5	239,0 ± 2,1	233,0 ± 1,3	-2,49	2,55
T6	324,3 ± 4,6	317,4 ± 4,9	-2,12	1,15
T7	261,1 ± 6,2	267,2 ± 8,7	2,32	1,98

^a E: café especial; T: café tradicional; ^b Concentração dada em mg por 100 mL de café coado; ^c Realizado em triplicata; ^d Erro Relativo = 100% × (biossensor – CLAE)/CLAE; ^e $F_{\text{teórico}} = 19,0$.

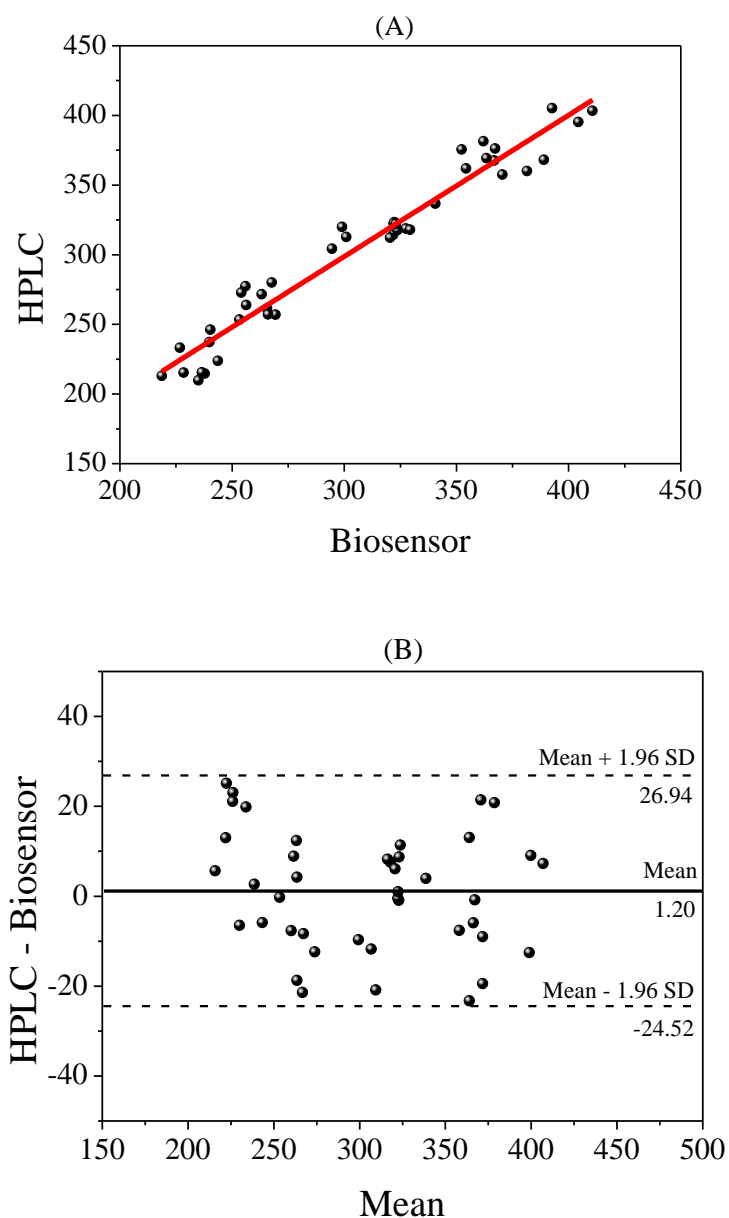
Fonte: o próprio autor.

Como pode ser visto, os dois métodos apresentaram resultados muito

semelhantes para a concentração de ácidos clorogênicos com erros relativos inferiores a 6,42 %, e os valores de F calculados também indicaram que não houve diferença na variância dos resultados obtidos por ambos os métodos. A análise de correlação de Pearson (Figura 6A) mostrou $r = 0,975$ indicando alta correlação entre os resultados obtidos pelos dois métodos de análise. O teste t pareado também foi aplicado a esses resultados e não demonstrou diferença significativa entre as médias obtidas pelos dois métodos ($t = 0,598$; $p > 0,553$, Graus de liberdade: 41). Por fim, a análise do gráfico de Bland-Altman (Figura 6B) mostrou alta concordância entre a concentração de ácidos clorogênicos obtida pelos dois métodos, com todos os resultados dentro dos limites de concordância a 95% de confiança (linha tracejada).

O teor de ácidos clorogênicos medido como 5-ACG nos dois diferentes tipos de cafés também foi avaliado. Um teste t foi aplicado aos teores de ácidos clorogênicos nos cafés tradicionais e especiais obtidos usando o método voltamétrico com o biossensor de lacase. Os resultados do teste t indicam que a concentração média de ácidos clorogênicos nos cafés tradicionais e especiais foram significativamente diferentes ($t = 4,911$; $p > 0,001$; graus de liberdade: 40). Neste estudo, verificou-se que o teor de ácidos clorogênicos nos cafés classificados como especiais (média: 339 mg por 100 mL de bebida) foi maior do que nos cafés tradicionais (268 mg por 100 mL de bebida). Esses resultados estão em concordância com os teores de ácidos clorogênicos relatados em vários produtos relacionados ao café (FARAH, 2012; JEON et al., 2019), e ligeiramente inferiores aos obtidos no café sob diferentes processos de fabricação (coados) (JEON et al., 2017).

Figura 6 – (A) Gráfico de correlação entre os resultados obtidos por CLAE e obtidos pelo biossensor para a determinação de ácidos clorogênicos. A linha vermelha indica o ajuste linear com coeficiente de correlação de Pearson de 97,5%. **(B)** Gráfico de Bland-Altman para a concordância entre os resultados obtidos pelo método cromatográfico e o método voltamétrico usando o biossensor. A linha preta indica a média e as linhas tracejadas indicam os limites de concordância a 95% de confiança



Fonte: o próprio autor.

Farah e colaboradores (FARAH et al., 2006) reportaram que uma menor concentração de ácidos clorogênicos está relacionada a bebidas de café de

alta qualidade, classificadas por análise sensorial. Clifford (1997) apontou que menores quantidades de ácidos clorogênicos podem ser responsáveis por evitar a formação de produtos potencialmente mutagênicos durante o processo de torra do café, e que também podem minimizar a deterioração oxidativa do café torrado. Mas, segundo Zanin e colaboradores (2016), a qualidade do café não pode ser atribuída apenas à concentração de ácidos clorogênicos, pois apresenta grande variação em cafés com graus de torra semelhantes, embora é possível obter bebidas de boa qualidade mesmo com altos teores de ácidos clorogênicos a depender de cuidado nos processos pós-colheita (ZANIN et al., 2016). Portanto, os resultados obtidos neste trabalho são atribuíveis ao cuidado minucioso no processamento dos cafés especiais, ou seja, os processos de pós-colheita foram mais controlados nos cafés especiais do que nos tradicionais. O processo de torrefação é responsável pela degradação de muitos compostos químicos nos cafés, sendo que a concentração de ácidos clorogênicos é reduzida pela metade (FARAH; DONANGELO, 2006; JEON et al., 2017), e nos cafés especiais, essa etapa geralmente é mais suave implicando em menor degradação dos compostos, resultando na maior concentração de ácidos clorogênicos no café torrado, conseqüentemente, maior concentração na bebida final de café.

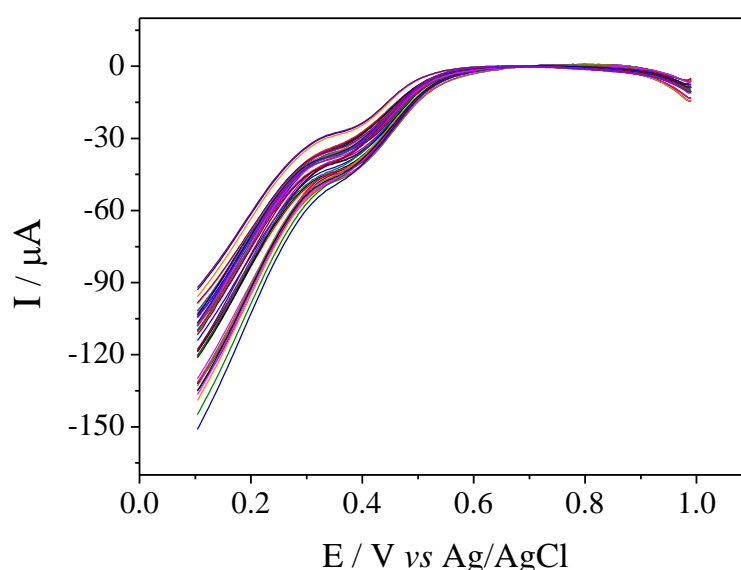
3.6 DISCRIMINAÇÃO DE CAFÉS ESPECIAIS E TRADICIONAIS PELA IMPRESSÃO DIGITAL VOLTAMÉTRICA (VOQ) E ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS

A classificação dos cafés especiais é baseada em análise sensorial que exige alto grau de treinamento dos baristas, que estão sujeitos a inúmeras interferências durante as análises. Métodos químicos de análise, discriminação e classificação desses cafés podem proporcionar um processo altamente confiável, rápido e reprodutível e, nesse sentido, uma impressão digital química aliada a ferramentas quimiométricas podem ser aplicadas para a discriminação de cafés especiais dos tradicionais. A impressão digital voltamétrica é definida como a característica do perfil voltamétrico que é capaz de distinguir conjuntos metabólicos específicos devido a alterações químicas composicionais (TSOPELAS; KONSTANTOPOULOS; KAKOULIDOU, 2018). A análise de componentes principais (PCA) é um método quimiométrico não supervisionado, ou seja, é um método de análise exploratória de dados que não requer nenhum conhecimento prévio a respeito

da classificação das amostras (FERREIRA, 2015)(FERREIRA, 2015), que reduz os dados projetando-os geometricamente em dimensões inferiores chamadas de componentes principais (PCs) em que padrões de discriminação são encontrados sem conhecimento prévio das amostras, ou seja, qualidade, origem, composição, por exemplo (WORLEY; POWERS, 2013).

A abordagem da impressão digital voltamétrica foi avaliada como uma ferramenta em potencial para a discriminação de cafés especiais de cafés tradicionais. Para tanto, foram avaliados os voltamogramas de onda quadrada obtidos com o biossensor construído para análise de ácidos clorogênicos em cafés (Figura 7).

Figura 7 – Impressão digital por VOQ de cafés coados analisados pelo biossensor de lacase

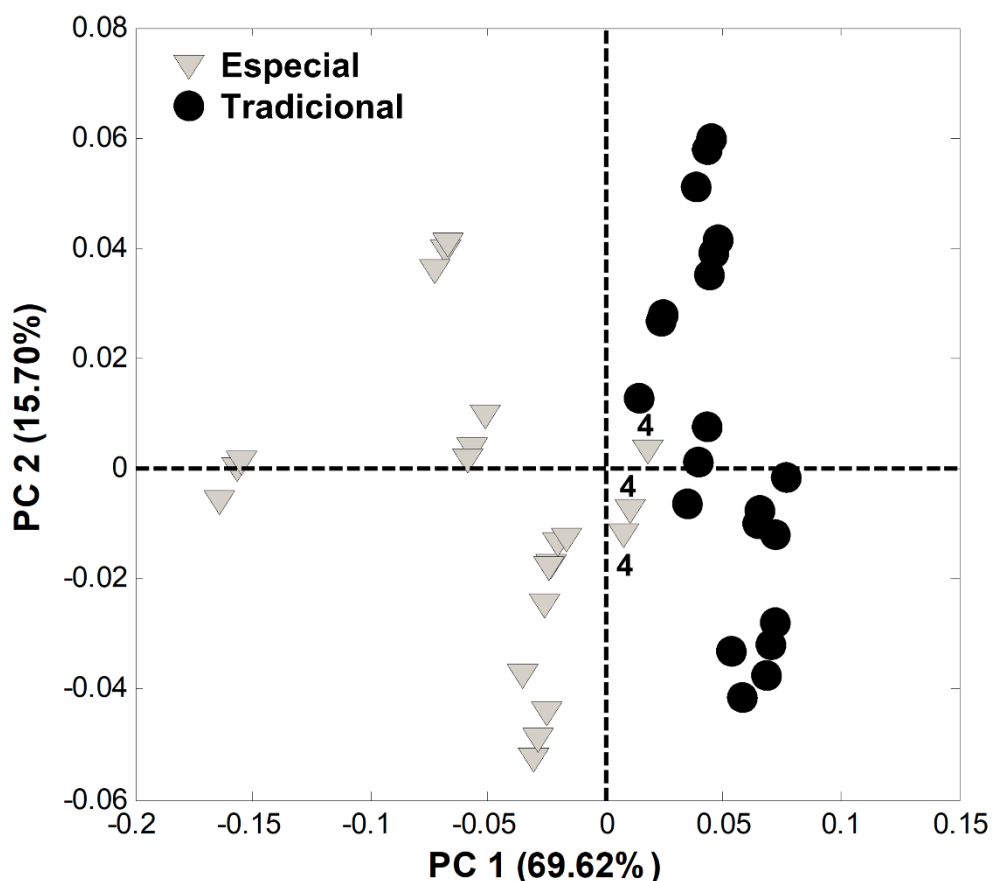


Fonte: o próprio autor.

Foi observado um pico catódico com potencial de redução em aproximadamente 0,38 V para todas as amostras de café coado, tanto especiais quanto tradicionais, com uma leve variação na intensidade de corrente para algumas amostras, porém, nenhum padrão discriminante pode ser identificado nos voltamogramas. Os voltamogramas apresentados na Figura 7 foram então submetidos à PCA (Figura 8). A matriz de dados consistiu em 42 linhas (21 cafés especiais e 21 cafés tradicionais) e 157 colunas (varredura de potencial). Os melhores resultados das análises em triplicata foram obtidos pela técnica de suavização de Savitzky-Golay com janela de 15 pontos, polinômio de segunda ordem, derivada

segunda e com dados centrados na média.

Figura 8 – Escores das duas primeiras componentes principais da impressão digital por VOQ de bebidas de cafés coados tradicionais mostrando o padrão de discriminação



Fonte: o próprio autor.

Verificou-se que as duas primeiras CPs representaram 69,62% e 15,70% da variância total, respectivamente (Figura 8), na qual foi observada um padrão discriminante. O gráfico de escores das CP1 e CP2 mostrou que a CP1 foi responsável pela discriminação dos cafés especiais e tradicionais, com exceção do café especial E4 (Figura 8). A Tabela 4 mostrou que a amostra de café coado E4 apresenta menor concentração de ácidos clorogênicos quando comparados com os demais cafés especiais examinados. As impressões digitais dos cafés especiais estão localizadas na região negativa do CP1, enquanto os cafés tradicionais estão localizados na região positiva da mesma CP. A impressão digital voltamétrica de cafés

especiais e tradicionais obtidos pelo biossensor, em análise direta, mostrou-se uma poderosa ferramenta para controle de qualidade desses cafés com base na abundância relativa de ácidos clorogênicos presentes. Essa ferramenta pode ser associada à análise sensorial e expandida para outras matrizes complexas semelhantes.

4 CONCLUSÃO

Neste capítulo, foi apresentado uma nova arquitetura para a obtenção de um dispositivo biossensor para a determinação de ácidos clorogênicos em bebidas de cafés especiais e tradicionais. Um planejamento estatístico de mistura de três componentes (NPsPt, BOT e lacase) foi empregado para definição da proporção dos componentes do biossensor. O modelo não foi preditivo da resposta do biossensor, mas indicou uma região de máxima resposta, a qual foi empregada na construção do dispositivo. As condições experimentais foram otimizadas empregando planejamentos fatoriais e o biossensor apresentou resposta de corrente catódica linear para o 5-ACG no intervalo de concentração de $0,56 - 7,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ com LD de $0,18 \mu\text{mol L}^{-1}$. O biossensor mostrou-se apto para a realização de 150 leituras (medidas) e pode ser armazenado em geladeira ($\sim 4 \text{ }^\circ\text{C}$) por 30 dias com apenas 6,59% de diminuição da resposta inicialmente apresentada. Amostras de cafés coados, tanto especiais quanto tradicionais, foram analisados usando o biossensor. Os resultados apresentados foram estatisticamente similares (95% de nível de confiança) aos obtidos usando CLAE. Por fim, a análise de componentes principais das impressões digitais voltamétricas obtidas com o biossensor desenvolvido, proporcionou a discriminação dos cafés em tradicionais e especiais. Assim, a plataforma eletroquímica composta por NPsPt, BOT e lacase pode servir como um biossensor seletivo para ácidos clorogênicos para o controle de qualidade de bebidas de café.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O emprego de materiais produzidos pelo fungo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 em Eletroanalítica, apesar de recente, apresenta inúmeras vantagens e é uma linha de pesquisa do Laboratório de Eletroanalítica e Sensores em parceria com os pesquisadores Aneli Barbosa-Dekker e Robert Dekker. Ambos os biomateriais, BOT e lacase, podem ser produzidos em larga escala e a partir de uma mesma cepa, que é mantida por longos períodos em geladeira.

No primeiro capítulo desta tese, o produto da derivatização da BOT, CMB foi empregada com sucesso para a dispersão e estabilização de NTC_{PM} em água e o sensor obtido foi empregado para a determinação de DESL em produtos farmacêuticos. O sensor também respondeu satisfatoriamente para a determinação de DESL em amostra de soro de rato.

No segundo capítulo a associação de lacase e BOT, ambos produzidos pelo fungo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05, juntamente com nanopartículas de platina foi empregada para modificar um eletrodo de pasta de óxido de grafite. O biossensor resultante foi aplicado para análise de ácidos clorogênicos em bebidas de café e usando análise de componentes principais as amostras de café foram classificadas em dois grupos de acordo com a qualidade: especiais e tradicionais.

Os trabalhos apresentados nesses dois capítulos contribuiram para o desenvolvimento de outros trabalhos dentro e fora do grupo de pesquisa coordenado pela Prof^a Dr^a Elen Romão Sartori. Dentro do grupo por exemplo, a CMB foi empregada como adjuvante no preparo e dispersão da nanoestrutura de carbono, grafeno. Esta abordagem foi proposta para a construção de um dispositivo biossensor específico para o diagnóstico sorológico da doença estrogiloidíase em pacientes reais. Já fora do grupo, os trabalhos do capítulo 1 e 2, publicados em periódicos de alto fator de impacto no ano de 2020, já foram consultados e citados por 24 autores em outros artigos científicos.

REFERÊNCIAS

- ALEKSIĆ, M. M. et al. The possibility of simultaneous voltammetric determination of desloratadine and 3-hydroxydesloratadine. **Acta Chimica Slovenica**, v. 57, n. 3, p. 686–92, set. 2010.
- ALMEIDA, L. C. et al. Electrochemical mineralization of the azo dye Acid Red 29 (Chromotrope 2R) by photoelectro-Fenton process. **Chemosphere**, v. 89, n. 6, p. 751–758, 2012.
- AMATATONGCHAI, M. et al. Rapid screening method for assessing total phenolic content using simple flow injection system with laccase based-biosensor. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 8, p. 10526–10539, 2013.
- ANASTAS, P. T. Green chemistry and the role of analytical methodology development. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 3, p. 167–175, 1999.
- ANGELONI, G. et al. What kind of coffee do you drink? An investigation on effects of eight different extraction methods. **Food Research International**, v. 116, p. 1327–1335, 2019.
- ARDUINI, F. et al. Carbon black as an outstanding and affordable nanomaterial for electrochemical (bio)sensor design. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 156, n. January, p. 112033, 2020.
- ARISTOV, N.; HABEKOST, A. Cyclic voltammetry - a versatile electrochemical method investigating electron transfer processes. **World Journal of Chemical Education**, v. 3, n. 5, p. 115–119, 2015.
- ARSLAN, F. et al. A new laccase-based biosensor for epinephrine determination. **Gazi University Journal of Science GU J Sci**, v. 28, n. 1, p. 1–9, 2015.
- BAG, S. S.; JANA, S.; KASULA, M. Sonogashira Cross-Coupling: Alkyne-Modified Nucleosides and Their Applications ☆. In: **Palladium-Catalyzed Modification of Nucleosides, Nucleotides and Oligonucleotides**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 75–146.
- BAGHBAMIDI, S. E. et al. Modified Carbon Nanotube Paste Electrode for Voltammetric Determination of Carbidopa, Folic Acid, and Tryptophan. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2012, p. 1–8, 2012.
- BALUCHOVÁ, S. et al. Recent progress in the applications of boron doped diamond electrodes in electroanalysis of organic compounds and biomolecules – A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1077, p. 30–66, 2019.
- BARBOSA, A. M. et al. Structural characterization of Botryosphaeran: a (1→3;1→6)-β-D-glucan produced by the ascomyceteous fungus, Botryosphaeria sp. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 16, p. 1691–1698, 2003.
- BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; HARDY, G. E. S. Veratryl alcohol as an inducer

of laccase by an ascomycete, *Botryosphaeria* sp., when screened on the polymeric dye Poly R-478. **Letters in Applied Microbiology**, v. 23, n. 2, p. 93–96, ago. 1996.

BARD, A. J. Chemical modification of electrodes. **Journal of Chemical Education**, v. 60, n. 4, p. 302–304, 1983.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2001.

BEITOLLAHI, H. et al. A review on the effects of introducing CNTs in the modification process of electrochemical sensors. **Electroanalysis**, v. 30, p. 1–10, 2018.

BICHO, N. C. et al. Quality assessment of Arabica and Robusta green and roasted coffees-A review. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 25, n. 12, p. 945–950, 2013.

BIFARMA; ANVISA. **DESALEX ® desloratadina FORMAS FARMACÊUTICAS E APRESENTAÇÕES**. [s.l: s.n.].

BOUNEGRU, A. V.; APETREI, C. Voltammetric sensors based on nanomaterials for detection of caffeic acid in food supplements. **Chemosensors**, v. 8, n. 2, p. 41, 2020.

BRADY, D.; JORDAAN, J. Advances in enzyme immobilisation. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 11, p. 1639–1650, 2009.

BRAININA, Kh. et al. Nanomaterials: Electrochemical Properties and Application in Sensors. **Physical Sciences Reviews**, v. 3, n. 9, 25 set. 2018.

BRASCA, R. et al. Spectroscopic behavior of loratadine and desloratadine in different aqueous media conditions studied by means of TD-DFT calculations. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 115, p. 250–258, nov. 2013.

Brazilian Pharmacopoeia. 5. ed. Brasilia: ANVISA, 2010.

BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O. **Electrochemistry: principles, methods, and applications**. 1. ed. Oxford: Oxford University Press Inc, 1993.

BRITISH PHARMACOPOEIA COMMISSION. **British Pharmacopoeia**. 5. ed. London: The Stationery Office, 2013.

BRYCHT, M. et al. Sensitive determination of anticancer drug imatinib in spiked human urine samples by differential pulse voltammetry on anodically pretreated boron-doped diamond electrode. **Diamond and Related Materials**, v. 68, p. 13–22, 2016. . Acesso em: 6 jul. 2016.

CANNATELLI, M. D.; RAGAUSKAS, A. J. Two Decades of Laccases: Advancing Sustainability in the Chemical Industry. **Chemical Record**, v. 17, n. 1, p. 122–140, 2017.

CASERO, E. et al. Laccase biosensors based on different enzyme immobilization strategies for phenolic compounds determination. **Talanta**, v. 115, p. 401–408, out. 2013.

CHEN, X. et al. Graphene and graphene-based nanomaterials: the promising materials for bright future of electroanalytical chemistry. **The Analyst**, v. 136, n. 22, p. 4631–4640, 2011.

CHENG, B. et al. Influence of genotype and environment on coffee quality. **Trends in Food Science & Technology**, v. 57, p. 20–30, 2016.

CHRISTENSEN, P. A.; HAMNETT, A. **Techniques and mechanisms in electrochemistry**. London: Blackie Academic & Professional, 1994.

CLIFFORD, M. N. The nature of chlorogenic acids - Are they advantageous compounds in coffee? In: 17th ASIC Colloquium, Nairobi, Kenya. **Anais...** Nairobi, Kenya: 1997.

COELHO, J. H. et al. Exploring the exocellular fungal biopolymer botryosphaeran for laccase-biosensor architecture and application to determine dopamine and spironolactone. **Talanta**, v. 204, p. 475–483, 1 nov. 2019.

COSTA, D. J. E. et al. Determination of tryptamine in foods using square wave adsorptive stripping voltammetry. **Talanta**, v. 154, p. 134–140, 2016.

CROGNALE, S. et al. Production of β -glucan and related glucan-hydrolases by *Botryosphaeria rhodina*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 3, p. 860–871, mar. 2007.

CUNHA, M. A. A. et al. The effect of carbohydrate carbon sources on the production of constitutive and inducible laccases by *Botryosphaeria* sp. **Journal of Basic Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 385–392, 2003.

DA SILVA, E. M. et al. Development of a composite electrode based on graphite and polycaprolactone for the determination of antihypertensive drugs. **Microchemical Journal**, v. 158, p. 105228, 1 nov. 2020. . Acesso em: 28 fev. 2022.

DADFAR, S. M. M.; KAVOOSI, G. Mechanical and water binding properties of carboxymethyl cellulose/multiwalled carbon nanotube nanocomposites. **Polymer Composites**, v. 36, n. 1, p. 145–152, jan. 2015.

DAI, J. et al. Dispersing carbon nanotubes in water with amphiphiles: dispersant adsorption, kinetics and bundle size distribution as defining factors. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 122, n. 42, p. 24386–24393, 25 out. 2018.

DE LA ROCA, M. F. et al. Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos. **Rev. Bras. Farm**, v. 88, n. 4, p. 177–180, 2007.

DEKKER, R. F. H. et al. A new role for veratryl alcohol: regulation of synthesis of

lignocellulose-degrading enzymes in the ligninolytic ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp.; influence of carbon source. **Biotechnology Letters**, v. 23, n. 24, p. 1987–1993, 2001.

DEKKER, R. F. H. et al. Botryosphaeran – A fungal exopolysaccharide of the (1→3)(1→6)-β-D-glucan kind: structure and biological functions. In: COHEN, E.; MERZENDORFER, H. (Ed.). **Extracellular Sugar-Based Biopolymers Matrices, Biologically-Inspired Systems 12**. [s.l.] Springer Nature Switzerland, 2019. p. 433–484.

DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. The effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases by the ascomycete *Botryosphaeria* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, n. 1, p. 81–88, 2001.

DUARTE, E. H.; KUBOTA, L. T.; TARLEY, C. R. T. Carbon Nanotube Based Sensor for Simultaneous Determination of Acetaminophen and Ascorbic Acid Exploiting Multiple Response Optimization and Measures in the Presence of Surfactant. **Electroanalysis**, v. 24, n. 12, p. 2291–2301, dez. 2012.

DUMITRESCU, I.; UNWIN, P. R.; MACPHERSON, J. v. Electrochemistry at carbon nanotubes: Perspective and issues. **Chemical Communications**, n. 45, p. 6886–6901, 2009. . Acesso em: 28 fev. 2022.

DURST, R. A. et al. Chemically modified electrodes: Recommended terminology and definitions. **Pure and Applied Chemistry**, v. 69, n. 6, p. 1317–1323, jun. 1997.

EISELE, A. P. P. et al. Layering of a film of carboxymethyl-botryosphaeran onto carbon black as a novel sensitive electrochemical platform on glassy carbon electrodes for the improvement in the simultaneous determination of phenolic compounds. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 287, p. 18–26, 15 maio 2019.

EL-GHANY, N. A. A. Antimicrobial activity of new carboxymethyl chitosan–carbon nanotube biocomposites and their swell ability in different pH media. **Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 36, n. 1, p. 31–44, 2 jan. 2017. . Acesso em: 13 jan. 2020.

ELLISON, S. L. R.; BARWICK, V. J.; FARRANT, T. J. D. **Practical statistics for the analytical scientist**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2009.

FALONE, M. F. et al. Electrochemical evaluation and voltammetric determination of laxative drug bisacodyl on boron-doped diamond electrode. **Measurement**, v. 137, p. 464–469, 2019.

FARAH, A. et al. Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. **Food Chemistry**, v. 98, p. 373–380, 2006.

FARAH, A. Coffee Constituents. In: YI-FANG CHU (Ed.). **Coffee: Emerging Health Effects and Disease Prevention**. 1. ed. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2012. p. 21–58.

FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal**

of **Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p. 23–36, 2006.

FATEMI, S. M.; FOROUTAN, M. Recent developments concerning the dispersion of carbon nanotubes in surfactant/polymer systems by MD simulation. **Journal of Nanostructure in Chemistry**, v. 6, n. 1, p. 29–40, 2016.

FERNANDES, S. C. et al. Biosensor for chlorogenic acid based on an ionic liquid containing iridium nanoparticles and polyphenol oxidase. **Talanta**, v. 79, n. 2, p. 222–228, 2009.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, M. Á.; MOLDES, D. Recent developments and applications of immobilized laccase. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1808–1825, dez. 2013.

FERREIRA, H. S.; RANGEL, M. do C. Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1860–1870, 2009.

FERREIRA, M. M. C. **QUIMIOMETRIA: CONCEITOS, MÉTODOS E APLICAÇÕES**. 1. ed. Campinas: Editora Unicamp, 2015.

FU, J. et al. Carboxymethyl cellulose assisted immobilization of silver nanoparticles onto cellulose nanofibers for the detection of catechol. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 738, p. 92–99, fev. 2015.

GAO, C. et al. The new age of carbon nanotubes: An updated review of functionalized carbon nanotubes in electrochemical sensors. **Nanoscale**, v. 4, n. 6, p. 1948–1963, 2012.

GÖKCEN, B. B.; ŞANLIER, N. Coffee consumption and disease correlations. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 2, p. 336–348, 2019.

GOMES, A. et al. Covalent attachment of laccase to carboxymethyl-botryosphaeran in aqueous solution for the construction of a voltammetric biosensor to quantify quercetin. **Bioelectrochemistry**, v. 135, p. 107543, out. 2020.

GOODING, J. J. Nanostructuring electrodes with carbon nanotubes: A review on electrochemistry and applications for sensing. **Electrochimica Acta**, v. 50, n. 15, p. 3049–3060, 2005.

GOSSER, D. K. **Cyclic voltammetry: simulation and analysis of reaction mechanisms**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1993.

GREEF, R. et al. **Instrumental methods in electrochemistry**. 1. ed. Chichester: Ellis Horwood Limited, 1985.

GUAN, J.-G.; MIAO, Y.-Q.; ZHANG, Q.-J. Impedimetric biosensors. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 97, n. 4, p. 219–226, 2004.

GUIZELLINI, F. C. et al. PARAFAC HPLC-DAD metabolomic fingerprint investigation of reference and crossed coffees. **Food Research International**, v. 113, p. 9–17,

2018.

HAIJALIZADEH, A. et al. Electrochemical behavior and determination of carbidopa on modified graphite screen printed electrode. **Anal. Bioanal. Electrochem**, v. 10, n. 4, p. 404–413, 2018.

HAMMAM, E. Behavior and quantification studies of amiloride drug using cyclic and square-wave adsorptive stripping voltammetry at a mercury electrode. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 34, n. 5, p. 1109–1116, 10 mar. 2004.

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G. **Goodman & Gilman's – The pharmacological basis of therapeutics**. 9. ed. New York: McGraw-Hill, 1996.

HERBST, M. H.; FERNANDES MACÊDO, M. I.; ROCCO, A. M. Tecnologia dos nanotubos de carbono: Tendências e perspectivas de uma área multidisciplinar. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 986–992, 2004.

HERNÁNDEZ-IBÁÑEZ, N. et al. Electrochemical lactate biosensor based upon chitosan/carbon nanotubes modified screen-printed graphite electrodes for the determination of lactate in embryonic cell cultures. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 77, p. 1168–1174, mar. 2016.

HOLZINGER, M.; LE GOFF, A.; COSNIER, S. Nanomaterials for biosensing applications: a review. **Frontiers in chemistry**, v. 2, p. 63–72, 2014.

HUANG, J. et al. A novel fiber optic biosensor for the determination of adrenaline based on immobilized laccase catalysis. **Analytical Letters**, v. 41, n. 8, p. 1430–1442, jun. 2008.

IJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature** 1991 **354:6348**, v. 354, n. 6348, p. 56–58, 1991. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/354056a0>>. Acesso em: 28 fev. 2022.

JEON, J.-S. et al. Determination of chlorogenic acids and caffeine in homemade brewed coffee prepared under various conditions. **Journal of Chromatography B**, v. 1064, p. 115–123, 2017.

JEON, J.-S. et al. Contents of chlorogenic acids and caffeine in various coffee-related products. **Journal of Advanced Research**, v. 17, p. 85–94, 2019.

KAGIMURA, F. Y. et al. Carboxymethylation of (1 → 6)- β -glucan (lasiodiplodan): Preparation, characterization and antioxidant evaluation. **Carbohydrate Polymers**, v. 127, p. 390–399, 20 ago. 2015. . Acesso em: 28 fev. 2022.

KARAGIANNIDIS, P. G. et al. Microfluidization of graphite and formulation of graphene-based conductive inks. **ACS Nano**, v. 11, n. 3, p. 2742–2755, 2017.

KHARISSOVA, O. V.; KHARISOV, B. I.; DE CASAS ORTIZ, E. G. Dispersion of carbon nanotubes in water and non-aqueous solvents. **RSC Advances**, v. 3, n. 47, p. 24812–24852, 2013.

KRAFT, A. Doped diamond: a compact review on a new, versatile electrode material. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 2, p. 355–385, 2007.

KUMAR, B.; CASTRO, M.; FELLER, J. F. Controlled conductive junction gap for chitosan-carbon nanotube quantum resistive vapour sensors. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 21, p. 10656–10664, 7 jun. 2012.

KUMAR, S.; VICENTE-BECKETT, V. Glassy carbon electrodes modified with multiwalled carbon nanotubes for the determination of ascorbic acid by square-wave voltammetry. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 3, n. 1, p. 388–396, 10 maio 2012.

KUSHARE, S. U. et al. Spectrophotometric method for simultaneous estimation of desloratadine and pseudoephedrine hydrochloride from tablets and dissolution media. **Asian Journal of Research in Chemistry**, v. 4, n. 9, p. 1440–1443, 2011.

LEAL, C. V. et al. Caracterização e avaliação in vitro de nanocompósitos de poli (L-ácido láctico) e nanotubos de carbono de paredes múltiplas purificados. **Química Nova**, v. 38, n. 9, p. 1153–1161, 1 nov. 2015.

LENIART, A. et al. An application of a glassy carbon electrode and a glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes in electroanalytical determination of oxycarboxin. **Ionics**, v. 24, n. 7, p. 2111–2121, 1 jul. 2018.

LEROY, T. et al. Genetics of coffee quality. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p. 229–242, 2006.

LEVIN, O. V. et al. Charge transfer processes on electrodes modified by polymer films of metal complexes with Schiff bases. **Electrochimica Acta**, v. 109, p. 153–161, 2013.

LITESCU, S. C. et al. Laccase-nafion based biosensor for the determination of polyphenolic secondary metabolites. **Analytical Letters**, v. 43, n. 7–8, p. 1089–1099, 2010.

LIV, L.; NAKIBOĞLU, N. Cost-effective voltammetric determination of boron in dried fruits and nuts using modified electrodes. **Food Chemistry**, v. 311, 1 maio 2020.

LONG, G. L.; WINEFORDNER, J. D. Limit of detection a closer look at the IUPAC definition. **Analytical Chemistry**, v. 55, n. 7, p. 712A-724A, jun. 1983.

MALHOTRA, B. D.; SRIVASTAVA, S.; AUGUSTINE, S. Biosensors for food toxin detection: Carbon nanotubes and graphene. In: Materials Research Society Symposium Proceedings, **Anais...Materials Research Society**, 2015.

MANDAL, B. et al. A biodegradable, biocompatible transdermal device derived from carboxymethyl cellulose and multi-walled carbon nanotubes for sustained release of diclofenac sodium. **RSC Advances**, v. 6, n. 23, p. 19605–19611, 2016. . Acesso em: 13 jan. 2020.

MARCHEFAVE, G. G. et al. Experimental mixture design solvent effects on pigment

extraction and antioxidant activity from *Coffea arabica* L. leaves. **Microchemical Journal**, v. 146, p. 713–721, maio 2019.

MATTOS, G. J. et al. Laccase stabilized on β -D-glucan films on the surface of carbon black/gold nanoparticles: A new platform for electrochemical biosensing. **Bioelectrochemistry**, v. 129, p. 116–123, out. 2019.

MATTOS, G. J. et al. A photoelectrochemical enzyme biosensor based on functionalized hematite microcubes for rutin determination by square-wave voltammetry. **Microchimica Acta**, v. 188, n. 1, 2021.

MAZLOUM-ARDAKANI, M.; SHEIKH-MOHSENI, M. A. Carbon Nanotubes in Electrochemical Sensors. **Carbon Nanotubes - Growth and Applications**, 9 ago. 2011. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/chapters/17077>>. Acesso em: 28 fev. 2022.

MENDES, R. K.; CLARO-NETO, S.; CAVALHEIRO, E. T. G. Evaluation of a new rigid carbon-castor oil polyurethane composite as an electrode material. **Talanta**, v. 57, p. 909–917, 2002.

MIRZANASIRI, N. et al. Electrochemiluminescence analysis of levodopa using luminol at MWCNT-modified electrode. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 10, n. 1, p. 147–160, 2018.

MOGHARABI, M.; FARAMARZI, M. A. Laccase and Laccase-Mediated Systems in the Synthesis of Organic Compounds. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 356, n. 5, p. 897–927, mar. 2014.

MOKHTARI, B.; NEMATOLLAHI, D.; SALEHZADEH, H. Electrochemical simultaneous determination of nifedipine and its main metabolite dehydronifedipine using MWCNT modified glassy carbon electrode. **Journal of Molecular Liquids**, v. 264, p. 543–549, 2018.

MOORES, R. G.; MCDERMOTT, D. L.; WOOD, T. R. Determination of chlorogenic acid in coffee. **Analytical Chemistry**, v. 20, n. 7, p. 620–624, 1948.

MORAES, J. T. et al. Advanced sensing performance towards simultaneous determination of quaternary mixture of antihypertensives using boron-doped diamond electrode. **Microchemical Journal**, v. 134, p. 173–180, set. 2017.

MORAES, J. T. et al. Laccase from *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 as a biological component in electrochemical biosensing devices. **Analytical Methods**, v. 11, n. 6, p. 717–720, 2019a.

MORAES, J. T. et al. Fast and sensitive simultaneous determination of antihypertensive drugs amlodipine besylate and ramipril using an electrochemical method: application to pharmaceuticals and blood serum samples. **Analytical Methods**, v. 11, n. 31, p. 4006–4013, 2019b.

MOUNESH et al. Simultaneous and sensitive detection of ascorbic acid in presence of

dopamine using MWCNTs-decorated cobalt (II) phthalocyanine modified GCE. **Microchemical Journal**, v. 147, p. 755–763, 1 jun. 2019.

NAGAO, K. Y. H. et al. A differential pulse voltammetric method for submicromolar determination of antihistamine drug desloratadine using an unmodified boron-doped diamond electrode. **Analytical Methods**, v. 12, n. 8, p. 1115–1121, 2020.

NASCIMENTO, L. O. et al. A novel strategy for quantifying clopidogrel using square-wave voltammetry and a boron-doped diamond film. **Electroanalysis**, p. elan.201900219, 10 set. 2019.

NGUYEN, H. H. et al. Immobilized enzymes in biosensor applications. **Materials**, v. 12, n. 1, p. 1–34, 2019.

NICHOLSON, R. S.; SHAIN, Irving. Theory of stationary electrode polarography. Single scan and cyclic methods applied to reversible, irreversible, and kinetic systems. **Analytical Chemistry**, v. 36, n. 4, p. 706–723, 1964.

ORAZEM, M. E.; TRIBOLLET, B. 18 Model-Based Graphical Methods. **Electrochemical Impedance Spectroscopy**, p. 353–362, 2008.

ÖZCAN, A.; GÜRBÜZ, M. Development of a modified electrode by using a nanocomposite containing acid-activated multi-walled carbon nanotube and fumed silica for the voltammetric determination of clopyralid. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 255, n. 1, p. 262–267, 2018.

PASCHOAL, L. R. et al. Aplicação do método da espectrofotometria de derivadas na identificação e doseamento simultâneo de sistemas multicomponentes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 39, n. 1, 2003.

PATHIRATNE, K. A. S.; SKANDARAJA, S. S.; JAYASENA, E. M. C. M. Linear sweep voltammetric determination of free chlorine in waters using graphite working electrodes. **Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka**, v. 36, n. 1, p. 25–31, 28 mar. 2008. Disponível em: <<http://jnsfsl.sjoi.info/articles/10.4038/jnsfsl.v36i1.130/>>. Acesso em: 28 fev. 2022.

PÉREZ-LÓPEZ, B.; MERKOÇI, A. Carbon nanotubes and graphene in analytical sciences. **Microchimica Acta**, v. 179, n. 1–2, p. 1–16, 9 out. 2012.

PÉREZ-RÀFOLS, C. et al. Voltammetric Electronic Tongues in Food Analysis. **Sensors**, v. 19, p. 4261, 2019.

RAJ, C. R.; TOKUDA, K.; OHSAKA, T. Electroanalytical applications of cationic self-assembled monolayers: square-wave voltammetric determination of dopamine and ascorbate. **Bioelectrochemistry**, v. 53, n. 2, p. 183–191, 2001.

RAMANATHAN, R. et al. Disposition of desloratadine in healthy volunteers. **Xenobiotica**, v. 37, n. 7, p. 770–787, jul. 2007.

RAMÍREZ-MENESES, E. et al. Electrochemical characterization of platinum nanoparticles stabilized by amines. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 483, n. 1–2, p. 573–577, 2009.

RAO, M. M. et al. Electrochemical determination of catechol using functionalized multiwalled carbon nanotubes modified screen printed carbon electrode. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 13, p. 6126–6134, 2018.

RAY, S. C. Application and Uses of Graphene Oxide and Reduced Graphene Oxide. In: **Applications of Graphene and Graphene-Oxide Based Nanomaterials**. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 39–55.

RIVAS, G. A. et al. Carbon Nanotubes Paste Electrodes. A New Alternative for the Development of Electrochemical Sensors. **Electroanalysis**, v. 19, n. 7–8, p. 823–831, abr. 2007.

ROCHFORT, D.; KOUISNI, L.; GENDRON, K. Physical immobilization of laccase on an electrode by means of poly(ethyleneimine) microcapsules. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 617, n. 1, p. 53–63, 2008.

RODRÍGUEZ-DELGADO, M. M. et al. Laccase-based biosensors for detection of phenolic compounds. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 74, p. 21–45, 2015.

RUNGROT MONGKOL, T. et al. Increased dispersion and solubility of carbon nanotubes noncovalently modified by the polysaccharide biopolymer, chitosan: MD simulations. **Chemical Physics Letters**, v. 507, n. 1–3, p. 134–137, 2011.

SALAMANCA-NETO, C. A. R. et al. Electrochemical evaluation and simultaneous determination of binary mixture of antihypertensives hydrochlorothiazide and enalapril in combined dosage forms using carbon nanotubes paste electrode. **Ionics**, v. 21, n. 6, p. 1615–1622, 2015.

SALAMANCA-NETO, C. A. R. et al. Differential pulse voltammetric method for the individual and simultaneous determination of antihypertensive drug metoprolol and its association with hydrochlorothiazide in pharmaceutical dosage forms. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 230, 2016.

SALAMANCA-NETO, C. A. R. et al. Assessment of the performance of triphenylphosphine for the voltammetric determination of elemental sulphur in cosmetic products. **Analyst**, v. 143, n. 15, p. 3600–3606, 7 ago. 2018.

SALAMANCA-NETO, C. A. R. et al. In-house validation of a totally aqueous voltammetric method for determination of diltiazem hydrochloride. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 837, p. 159–166, 2019.

SANTOS, A. M.; WONG, A.; FATIBELLO-FILHO, O. Simultaneous determination of salbutamol and propranolol in biological fluid samples using an electrochemical sensor based on functionalized-graphene, ionic liquid and silver nanoparticles. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 824, n. July, p. 1–8, 2018.

SARAVANAN, N. et al. In-situ electrochemical immobilization of [Mn(bpy)₂(H₂O)₂]²⁺ complex on MWCNT modified electrode and its electrocatalytic H₂O₂ oxidation and reduction reactions: A Mn-Pseudocatalase enzyme bio-mimicking electron-transfer functional model. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 812, p. 10–21, 2018.

SARTORI, E. R.; FATIBELLO-FILHO, O. Simultaneous Voltammetric Determination of Ascorbic Acid and Sulfite in Beverages Employing a Glassy Carbon Electrode Modified with Carbon Nanotubes within a Poly(Allylamine Hydrochloride) Film. **Electroanalysis**, v. 24, n. 3, p. 627–634, mar. 2012.

SASSOLAS, A.; BLUM, L. J.; LECA-BOUVIER, B. D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 489–511, 2012.

SCARMINIO, I. S.; BARROS, B.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos - Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 1. ed. Campinas: Editora Unicamp, 2001.

SCHOLZ, F. **Electroanalytical Methods**. 2. ed. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2010.

SCREMIN, J. et al. Amperometric determination of ascorbic acid with a glassy carbon electrode modified with TiO₂-gold nanoparticles integrated into carbon nanotubes. **Microchimica Acta**, v. 185, n. 5, p. 251, 12 maio 2018.

SCREMIN, J. et al. Application of botryosphaeran as a carbon black adherent on a glassy carbon electrode for the electrochemical determination of cyclobenzaprine. **Electrochimica Acta**, v. 379, p. 138176, maio 2021.

SIERRA-ROSALES, P. et al. MWCNT-modified electrode for voltammetric determination of allura red and brilliant blue FCF in isotonic sport drinks. **Electroanalysis**, v. 31, n. 5, p. 883–890, 6 maio 2019.

SILVA, T. A. et al. Electrochemical biosensors based on nanostructured carbon black: A review. **Journal of Nanomaterials**, v. 2017, p. 1–14, 2017.

SILVA, T. A.; WONG, A.; FATIBELLO-FILHO, O. Electrochemical sensor based on ionic liquid and carbon black for voltammetric determination of Allura red colorant at nanomolar levels in soft drink powders. **Talanta**, v. 209, p. 120588, mar. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914019312214>>.

SINAR, D.; KNOPF, G. K. Printed graphene interdigitated capacitive sensors on flexible polyimide substrates. In: 14th IEEE International Conference on Nanotechnology, **Anais...IEEE**, ago. 2014. Disponível em: <<http://ieeexplore.ieee.org/document/6968041/>>.

SIPA, K. et al. β-Cyclodextrins incorporated multi-walled carbon nanotubes modified electrode for the voltammetric determination of the pesticide dichlorophen. **Talanta**, v. 176, p. 625–634, 2018.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. São Paulo: Thomson, 2007.

SONG, B. B. et al. Electrochemical sensor based on platinum nanoparticles modified graphite-Like carbon nitride for detection of phenol. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 19, n. 7, p. 4020–4025, 2019.

SONG, J. et al. Graphite oxide film-modified electrode as an electrochemical sensor for acetaminophen. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 155, n. 1, p. 220–225, 5 jul. 2011.

STELUTI, R. M. et al. Comparison of Botryosphaeran production by the ascomyceteous fungus *Botryosphaeria* sp., grown on different carbohydrate carbon sources, and their partial structural features. **Journal of Basic Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 480–486, 2004.

SUN, W. et al. Linear Sweep Voltammetric Determination of Heparin Based on Its Interaction with Neutral Red. <http://dx.doi.org/10.1081/AL-200057217>, v. 38, n. 7, p. 1137–1148, 2007. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/AL-200057217>>. Acesso em: 28 fev. 2022.

SVÍTKOVÁ, J. et al. Chemical modification of boron-doped diamond electrodes for applications to biosensors and biosensing. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 46, n. 3, p. 248–256, 2016.

ŠVORC, L. et al. Simultaneous determination of paracetamol and penicillin V by square-wave voltammetry at a bare boron-doped diamond electrode. **Electrochimica Acta**, v. 68, p. 227–234, 2012.

ŠVORC, L. et al. Sensitive electrochemical determination of yohimbine in primary bark of natural aphrodisiacs using boron-doped diamond electrode. **Anal. Methods**, v. 6, n. 13, p. 4853–4859, 2014.

TALARICO, D. et al. Carbon black as successful screen-printed electrode modifier for phenolic compound detection. **Electrochemistry Communications**, v. 60, p. 78–82, nov. 2015.

TATONGJAI, J.; LUMDUBWONG, N. Physicochemical properties and textile utilization of low- and moderate-substituted carboxymethyl rice starches with various amylose content. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, n. 2, p. 377–384, 2010.

TESFAYE, A.; ASAYE, M. Voltammetric determination of ascorbic acid using carbon paste electrode in ginger samples from selected areas of Ethiopia. **Ethiopian Journal of Science and Technology**, v. 14, n. 1, p. 21–37, 30 jan. 2021. Disponível em: <<https://www.ajol.info/index.php/ejst/article/view/205766>>. Acesso em: 28 fev. 2022.

THAMILSELVAN, A.; RAJAGOPAL, V.; SURYANARAYANAN, V. Highly sensitive and selective amperometric determination of BPA on carbon black/f-MWCNT composite modified GCE. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 786, p. 698–706, 25 maio 2019.

TIAN, X. et al. Simultaneous determination of l-ascorbic acid, dopamine and uric acid with gold nanoparticles- β -cyclodextrin-graphene-modified electrode by square wave voltammetry. **Talanta**, v. 93, p. 79–85, 2012.

TRIPATHI, S. N. et al. Polyolefin/graphene nanocomposites: a review. **RSC Advances**, v. 7, n. 38, p. 23615–23632, 27 abr. 2017.

TSOPELAS, F.; KONSTANTOPOULOS, D.; KAKOULIDOU, A. T. Voltammetric fingerprinting of oils and its combination with chemometrics for the detection of extra virgin olive oil adulteration. **Analytica Chimica Acta**, v. 1015, p. 8–19, 2018.

United States Pharmacopoeia. 30. ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2007.

USLU, B.; OZKAN, S. A. Electroanalytical Methods for the Determination of Pharmaceuticals: A Review of Recent Trends and Developments. **Analytical Letters**, v. 44, n. 16, p. 2644–2702, 2011.

VALEZI, C. F. et al. An improved method for simultaneous square-wave voltammetric determination of amlodipine and enalapril at multi-walled carbon nanotubes paste electrode based on effect of cationic surfactant. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 205, p. 234–243, 2014.

VALEZI, C. F.; EISELE, A. P. P.; SARTORI, E. R. Versatility of a carbon paste electrode coupled to differential pulse voltammetry for determination of lisinopril with its associations (hydrochlorothiazide and amlodipine). **Analytical Methods**, v. 9, n. 31, p. 4599–4608, ago. 2017.

VASCONCELOS, A. F. D. et al. Optimization of laccase production by *Botryosphaeria* sp. in the presence of veratryl alcohol by the response-surface method. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 10, p. 1131–1138, 2000.

VIDYA, D. S. et al. Voltammetric determination of desloratadine in pharmaceutical and human urine samples using glassy carbon electrode. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 10, p. 119–122, 2014.

VINSON, J. A.; CHEN, X.; GARVER, D. D. Determination of total chlorogenic acids in commercial green coffee extracts. **Journal of Medicinal Food**, v. 22, n. 3, p. 314–320, 2019.

WANG, J. **Analytical Electrochemistry**. 2. ed. New York: WILEY-VCH, 2000.

WONG, A.; SILVA, T. A.; FATIBELLO-FILHO, O. Graphite oxide and gold nanoparticles as alternative materials in the design of a highly sensitive electrochemical sensor for the simultaneous determination of biological species. **Electroanalysis**, v. 29, n. 11, p. 2491–2497, 2017.

WORLEY, B.; POWERS, R. Multivariate Analysis in Metabolomics. **Current Metabolomics**, v. 1, n. 1, p. 92–107, 2013.

WU, Y. et al. Rapid recognition and determination of tryptophan by carbon nanotubes and molecularly imprinted polymer-modified glassy carbon electrode. **Bioelectrochemistry**, v. 131, 1 fev. 2020.

XU, J. et al. Carboxymethylation of a polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* enhances its antioxidant activities in vitro. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, n. 2, p. 227–234, 2009.

YANG, L. et al. Dual β -cyclodextrin functionalized Au@SiC nanohybrids for the electrochemical determination of tadalafil in the presence of acetonitrile. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 64, p. 126–130, fev. 2015.

YI, Y. et al. Electrochemical corrosion of a glassy carbon electrode. **Catalysis Today**, v. 295, p. 32–40, 15 out. 2017. . Acesso em: 28 fev. 2022.

ZANIN, R. C. et al. Good cup quality roasted coffees show wide variation in chlorogenic acids content. **LWT**, v. 74, p. 480–483, 2016.

ZENG, G. et al. Facile preparation of carbon nanotubes based carboxymethyl chitosan nanocomposites through combination of mussel inspired chemistry and Michael addition reaction: Characterization and improved Cu²⁺ removal capability. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 68, p. 446–454, 1 nov. 2016. . Acesso em: 13 jan. 2020.

ZHENG, M. et al. Electrocatalytical oxidation and sensitive determination of acetaminophen on glassy carbon electrode modified with graphene–chitosan composite. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 3, p. 1514–1520, 2013.

ZHOU, Y.; FANG, Y.; RAMASAMY, R. Non-covalent functionalization of carbon nanotubes for electrochemical biosensor development. **Sensors**, v. 19, n. 2, p. 392, 18 jan. 2019.