



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ANA PAULA PIRES EISELE

**DESENVOLVIMENTO DE UM SENSOR VOLTAMÉTRICO  
BASEADO EM POLISSACARÍDEO CARBOXIMETILADO E  
CARBON BLACK NANOESTRUTURADO PARA A  
DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE COMPOSTOS  
FENÓLICOS**

---

Londrina  
2018

ANA PAULA PIRES EISELE

**DESENVOLVIMENTO DE UM SENSOR VOLTAMÉTRICO  
BASEADO EM POLISSACARÍDEO CARBOXIMETILADO E  
CARBON BLACK NANOESTRUTURADO PARA A  
DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE COMPOSTOS  
FENÓLICOS**

Dissertação apresentada ao Departamento de  
Química da Universidade Estadual de Londrina,  
como requisito parcial à obtenção do título de  
Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Elen Julciléia Romão  
Sartori Braz

Londrina  
2018

ANA PAULA PIRES EISELE

**DESENVOLVIMENTO DE UM SENSOR VOLTAMÉTRICO BASEADO  
EM POLISSACARÍDEO CARBOXIMETILADO E CARBON BLACK  
NANOESTRUTURADO PARA A DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE  
COMPOSTOS FENÓLICOS**

Dissertação apresentada ao Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Prof. Dr. Marcos Fernando de Souza Teixeira  
Universidade Estadual de São Paulo - UNESP

---

Profa. Dra. Débora Nóbile Clausen Peraro  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 23 de fevereiro de 2018.

Dedico este trabalho aos meus pais,  
Maria e Bonifaz, por todo apoio e  
incentivo.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por me guiar por bons caminhos e pelas oportunidades que me proporcionou.

À minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elen Sartori, pela orientação, amizade e carinho. Espero que este trabalho seja, talvez, uma forma de honrar seus ensinamentos ao longo desses anos de orientação. Obrigada por ter acreditado em mim, te admiro muito e serei eternamente grata!

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Aneli Barbosa-Dekker pelo fornecimento da botriosferana carboximetilada e pelas discussões que contribuíram para a realização deste trabalho.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ieda Scarmínio pelo empréstimo da balança analítica e do banho ultrassônico.

Ao Prof. Dr. Pedro Camargo e ao doutorando Eduardo Barbosa da USP-São Paulo pelas imagens por Microscopia Eletrônica de Varredura.

Aos meus pais Maria e Bonifaz, e minha irmã Renata, pelo apoio, suporte e incentivo. Obrigada por tudo, amo vocês.

Aos meus companheiros do LAES: Camila Valezi, Carlos Salamanca, Débora, Gabriel, Jaqueline, Jessica, João, Louise e Max e também a aqueles que já passaram pelo nosso grupo: Camila Rosa, Eduardo Duarte Guilherme, Igor Rebech, Igor Ruiz, Michely, Simone e Vitória, pelos bons momentos juntos, amizade e apoio. Um agradecimento especial a Camila Valezi, pelo companheirismo e amizade nesses anos, principalmente durante este mestrado.

Aos meus amigos da graduação Angélica, Bruno, Carlos Bazoni, Douglas, Jhessica, Juliana, Lissa, Mariana, Meilyn, Michele e Regina, pela parceria e apoio durante essa etapa, sem vocês não teria chegado até aqui.

À todos que contribuíram na execução deste trabalho e na minha formação, meu muito obrigada.

À Cabot Corporation pelo fornecimento do Carbon Black.

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

“Tudo o que temos de decidir é o que  
fazer com o tempo que nos é dado”  
(J. R. R. Tolkien)

EISELE, Ana Paula Pires. **Desenvolvimento de um sensor voltamétrico baseado em polissacarídeo carboximetilado e carbon black nanoestruturado para a determinação simultânea de compostos fenólicos.** 2018. 61 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## RESUMO

Neste trabalho, uma modificação do eletrodo de carbono vítreo (ECV) é apresentada pela primeira vez, utilizando o polissacarídeo extracelular Botriosferana carboximetilado (BCM) e *carbon black* nanoestruturado (CB). A combinação entre o biopolímero e o nanomaterial carbonáceo mostrou melhorias nas respostas voltamétricas de dopamina (DOP) e paracetamol (PAR) quando comparado com o ECV sem modificação. A morfologia do sensor proposto foi caracterizada por microscopia eletrônica de varredura e a caracterização eletroquímica foi realizada por voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica utilizando o par redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ . Utilizando-se solução tampão fosfato (pH 7,0) e voltametria de pulso diferencial, DOP e PAR foram determinados simultaneamente em uma faixa linear de concentração de 0,099 – 2,9 e 0,70 – 19  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , com limites de detecção de 0,013 e 0,11  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , assim como limites de quantificação de 0,043  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e 0,36  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. O método desenvolvido é simples, rápido, sensível, de relativo baixo custo e foi aplicado com sucesso na determinação simultânea de DOP e PAR em fluidos biológicos e na determinação individual destes analitos em formulações farmacêuticas. Além disso, o sensor proposto possui vantagens como baixo custo do nanomaterial e a não toxicidade do biopolímero, tornando a combinação entre BCM e CB uma alternativa viável para a construção de novos sensores e determinação destes analitos.

**Palavras-chave:** Botriosferana carboximetilada.  $\beta$  (1  $\rightarrow$  3; 1  $\rightarrow$  6)-D-glucana. *Carbon black*. Determinação voltamétrica. Dopamina. Paracetamol.

EISELE, Ana Paula Pires. **Development of a voltammetric sensor based on carboxymethylate polysaccharide and carbon black nanostructured for the simultaneous determination of phenolic compounds.** 2018. 61 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

### ABSTRACT

In this work, a modification of the glassy carbon electrode (GCE) is presented for the first time, using the extracellular polysaccharide carboxymethyl botryosphaeran (CMB) and carbon black nanostructured (CB). The combination of the biopolymer and the carbonaceous nanomaterial showed improvements in the voltammetric responses of dopamine (DOP) and paracetamol (PAR) when compared to unmodified GCE. The morphology of the proposed sensor was characterized by scanning electron microscopy and the electrochemical characterization was performed by cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy using the redox couple  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ . Using phosphate buffer solution (pH 7.0) and differential pulse voltammetry, DOP and PAR were determined simultaneously in a linear range concentration of 0.099 – 2.9 and 0.70 – 19  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , with detection limits of 0.013 and 0.11  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , as quantification limits of 0.043  $\mu\text{mol L}^{-1}$  and 0.36  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectively. The developed method is simple, fast, sensitive, relatively inexpensive and has been successfully applied in the simultaneous determination of DOP and PAR in biological fluids and in the individual determination of these analytes in pharmaceutical formulations. In addition, the proposed sensor has advantages such as low cost nanomaterial and biopolymer nontoxic, making the combination between CMB and CB a viable alternative for the electrode modification and determination these analytes.

**Keywords:** Carboxymethylate Botryosphaeran.  $\beta$  (1 → 3; 1 → 6)-D-glucan. Carbon black. Voltammetric determination. Dopamine. Paracetamol.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> –	Representação estrutural da botriosferana carboximetilada .....	18
<b>Figura 2</b> –	Fórmula estrutural de (a) DOP e (b) PAR .....	20
<b>Figura 3</b> –	Representação esquemática do preparo do sensor .....	26
<b>Figura 4</b> –	Voltamogramas cíclicos ( $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ ) obtidos da comparação dos diferentes eletrodos estudados em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $192 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de DOP e $192 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de PAR .....	30
<b>Figura 5</b> –	MEV da superfície de (a) ECV, (b) BCM/ECV, (c) CB/ECV e (d) BCM-CB/ECV com ampliação de 50.000x .....	32
<b>Figura 6</b> –	Voltamogramas cíclicos ( $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ ) da comparação dos diferentes eletrodos estudados utilizando-se uma solução de $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl.....	34
<b>Figura 7</b> –	Diagramas de EIE dos diferentes eletrodos estudados utilizando-se uma solução de $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl.....	35
<b>Figura 8</b> –	Estudo do pH em tampão fosfato contendo $96 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de DOP e $96 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de PAR em VC ( $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ ) utilizando o BCM-CB/ECV .....	37
<b>Figura 9</b> –	Estudo do pH em função do potencial de pico anódico em tampão fosfato contendo $96 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de DOP e $96 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de PAR em VC ( $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ ) utilizando o BCM-CB/ECV .....	38
<b>Figura 10</b> –	Mecanismo proposto para a eletro-oxidação de (a) DOP e (b) PAR utilizando o BCM-CB/ECV.....	38
<b>Figura 11</b> –	Voltamogramas cíclicos em solução tampão fosfato (pH 7,0) em diferentes velocidades de varredura: (1) $5 \text{ mV s}^{-1}$ ; (2) $25 \text{ mV s}^{-1}$ ; (3) $50 \text{ mV s}^{-1}$ ; (4) $75 \text{ mV s}^{-1}$ ; (5) $100 \text{ mV s}^{-1}$ ; (6) $150 \text{ mV s}^{-1}$ ; (7) $200 \text{ mV s}^{-1}$ para (a) $192 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de DOP e (b) $192 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de PAR utilizando o BCM-CB/ECV.....	40

- Figura 12** – Relação linear entre a corrente de pico anódica versus velocidade de varredura e do logaritmo da corrente de pico anódica versus o logaritmo da velocidade de varredura para os voltamogramas cíclicos de (a) DOP e (b) PAR utilizando o BCM-CB/ECV nas condições mencionadas na Figura 11 .....41
- Figura 13** – Voltamogramas de (a) pulso diferencial e (b) de onda quadrada obtidos para 0,099 – 2,9  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de DOP (2 – 8) e 0,70 – 19  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de PAR (2 – 8) em tampão fosfato (pH 7,0) utilizando o BCM-CB/ECV. Parâmetros da VPD:  $a = 75 \text{ mV}$ ;  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ ;  $t = 5 \text{ ms}$ . Parâmetros da VOQ:  $f = 30 \text{ Hz}$ ;  $a = 60 \text{ mV}$ ;  $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$  .....43
- Figura 14** – Curvas analíticas obtidas para a determinação de DOP e PAR simultaneamente de (a) VPD e (b) VOQ em tampão fosfato (pH 7,0) utilizando o BCM-CB/ECV. Parâmetros da VPD:  $a = 75 \text{ mV}$ ;  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ ;  $t = 5 \text{ ms}$ . Parâmetros da VOQ:  $f = 30 \text{ Hz}$ ;  $a = 60 \text{ mV}$ ;  $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$  .....44
- Figura 15** – Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para (a) 0,099 – 2,9  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de DOP (2 – 8) na presença de 2,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de PAR e (b) 0,68 – 19  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de PAR (2 – 8) na presença de 2,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de DOP em tampão fosfato (pH 7,0) utilizando o BCM-CB/ECV. Parâmetros da VPD:  $a = 75 \text{ mV}$ ;  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ ;  $t = 5 \text{ ms}$ .....46

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	– Valores de $R_{et}$ e $k'$ obtidos por EIE .....	35
<b>Tabela 2</b>	– Parâmetros analíticos para a determinação simultânea de DOP e PAR em solução tampão fosfato (pH 7,0) utilizando o BCM-CB/ECV em VPD ( $a = 75 \text{ mV}$ ; $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ ; $t = 5 \text{ ms}$ ) .....	45
<b>Tabela 3</b>	– Parâmetros analíticos para a determinação de DOP e PAR utilizando VPD ( $a = 75 \text{ mV}$ ; $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ ; $t = 5 \text{ ms}$ ) em solução tampão fosfato (pH 7,0) utilizando o BCM-CB/ECV .....	47
<b>Tabela 4</b>	– Comparação entre diferentes sensores reportados na literatura para a determinação simultânea de DOP e PAR .....	50
<b>Tabela 5</b>	– Determinação de DOP e PAR em fluido cerebrospinal por VPD ( $a = 75 \text{ mV}$ ; $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ ; $t = 5 \text{ ms}$ ) .....	52
<b>Tabela 6</b>	– Determinação de DOP e PAR em formulações farmacêuticas utilizando o sensor proposto e o método oficial .....	52
<b>Tabela 7</b>	– Determinação de DOP e PAR em urina por VPD ( $a = 75 \text{ mV}$ ; $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ ; $t = 5 \text{ ms}$ ) .....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>a</i>	Amplitude
<i>A</i>	Área
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)6-ácido sulfônico
AO	Ácido Oleico
AZ	Azofloxina
BCM	Botriosferana Carboximetilada
<i>C</i>	Concentração
CB	Carbon Black
CCM	Celulose Carboximetilada
<i>D</i>	Coeficiente de Difusão
DHP	Dihexadecil Hidrogenofosfato
DMF	N,N-dimetilformamida
DOP	Dopamina
DPR	Desvio Padrão Relativo
EAu	Eletrodo de Ouro
ECC	Eletrodo de Carbono Cerâmico
ECV	Eletrodo de Carbono Vítreo
EIE	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica
<i>F</i>	Constante de Faraday
<i>f</i>	Frequência
FCPi	Filme de Carbono Pirolítico
<i>k'</i>	Constante de Taxa Heterogênea Aparente
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
<i>n</i>	Número de Elétrons
NPs-Au	Nanopartículas de Ouro
NPs-Co	Nanopartículas de Cobalto
NTC	Nanotubos de Carbono
NTCMP	Nanotubos de Carbono de Múltiplas Paredes
NTCPS	Nanotubos de Carbono de Parede Simples

OG	Óxido de Grafeno
OGR	Óxido de Grafeno Reduzido
PAH	Hidrocloreto de Polialilamina
PAR	Paracetamol
Poli-AHM	poli-4-amino-6-hidroxi-2-mercaptopirimidina
PPO	Polipirrol Oxidado
QCM	Quitossana Carboximetilada
Qui	Quitossana
$R$	Constante Universal dos Gases
$R_{et}$	Resistência de Transferência de Elétrons
$T$	Temperatura
$t$	Tempo de Modulação
$v$	Velocidade
VC	Voltametria Cíclica
VOQ	Voltametria de Onda Quadrada
VPD	Voltametria de Pulso Diferencial
VXC72R	Vulcan XC72R
$\Delta E$	Variação de Potencial
$\Delta E_s$	Incremento de varredura
$\Gamma$	Concentração de Espécie Adsorvida

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	15
1.2	POLISSACARÍDEOS NATURAIS .....	16
1.3	BOTRIOSFERANA .....	17
1.4	CARBON BLACK .....	18
1.5	COMPOSTOS FENÓLICOS.....	19
1.6	DETERMINAÇÃO ELETROANALÍTICA DE DOP E PAR.....	20
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	23
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	23
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	24
3.1	REAGENTES E SOLUÇÕES.....	24
3.2	OBTENÇÃO DA BOTRIOSFERANA CARBOXIMETILADA .....	24
3.3	INSTRUMENTAÇÃO .....	25
3.4	PREPARO DO SENSOR.....	26
3.5	PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS.....	27
3.6	PREPARO DAS AMOSTRAS .....	27
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	29
4.1	ESTUDO DOS COMPONENTES DO SENSOR NA RESPOSTA VOLTAMÉTRICA DE DOP E PAR .....	29
4.2	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA.....	31
4.3	CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA .....	32
4.4	ESTUDO DO PH E ELETRÓLITO SUPORTE .....	36
4.5	ESTUDO DA VELOCIDADE DE VARREDURA.....	39
4.6	DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE DOP E PAR UTILIZANDO O BCM- CB/ECV .....	42
4.7	EFEITO DOS INTERFERENTES, REPETIBILIDADE DO SENSOR E ESTABILIDADE .....	48
4.8	COMPARAÇÃO ENTRE OS DIFERENTES SENSORES UTILIZADOS PARA A DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE DOP E PAR.....	48

4.9	DETERMINAÇÃO DE DOP E PAR EM FLUIDOS BIOLÓGICOS E FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS..	51
5	<b>CONCLUSÕES</b>	53
6	<b>REFERÊNCIAS</b>	5

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Eletrodos modificados constituem uma classe de eletrodos em que a incorporação de substâncias permite o desenvolvimento de dispositivos adequados para vários propósitos e aplicações, além de melhorar o estado de superfície do eletrodo, conduzindo a uma redução nos potenciais de oxidação/ redução e aumento da taxa de processo de transferência de elétrons (SOUZA, 1997; SHAHROKHIAN *et al.*, 2009). Nos últimos anos, o desenvolvimento de eletrodos modificados vem aumentando. Embora existam casos de modificações para o desenvolvimento de eletrodos de íon seletivo, as aplicações analíticas dos eletrodos modificados envolvem em grande parte as técnicas voltamétricas e amperométricas, para a determinação de íons e moléculas orgânicas ou inorgânicas de interesse ambiental, industrial e biológico (SOUZA, 1997). As modificações devem aumentar a seletividade e/ou sensibilidade de uma determinação em relação ao eletrodo base, justificando seu preparo.

Os materiais nanoestruturados são largamente empregados na construção de novos sensores eletroquímicos, uma vez que tem a capacidade de aumentar a área eletroativa do eletrodo, a condutividade, e melhorar a sensibilidade e seletividade analítica. Na literatura, há diversos relatos de eletrodos modificados com materiais nanoestruturados, como nanotubos de carbono (MUSAMEH *et al.*, 2002; JANEGITZ *et al.*, 2011; SARTORI; VICENTINI; FATIBELLO-FILHO, 2011), grafeno (YIN *et al.*, 2010; FAN *et al.*, 2011), nanopartículas metálicas (XIAO *et al.*, 2007; SARTORI; VICENTINI; FATIBELLO-FILHO, 2011), carbon black (DEROCO; LOURENCAO; FATIBELLO-FILHO, 2017; SILVA; FATIBELLO-FILHO, 2017), entre outros. Ademais, estes nanomateriais são muitas vezes utilizados ou imobilizados com outros tipos de materiais a fim de garantir estabilidade de modificação. Na literatura, diversos tipos de materiais imobilizantes são utilizados na eletroanálise, como o surfactante dihexadecil hidrogenofosfato (DHP) (JANEGITZ *et al.*, 2015), o polieletrólito hidrocloreto de polialilamina (PAH) (OLIVEIRA *et al.*, 2013; SILVA; VIEIRA, 2016), polímeros condutores como nafion (SANGHAVI; SRIVASTAVA,

2011; DESAI; SRIVASTAVA, 2012), polissacarídeos (CAO *et al.*, 2008; SHAHROKHIAN; GHALKHANI, 2010), entre outros.

## 1.2 POLISSACARÍDEOS NATURAIS

Nos últimos anos, a utilização de polissacarídeos naturais tem atraído grande interesse pela comunidade científica na construção de novas plataformas sensoriais, pois são de fácil aquisição, não tóxicos, biodegradáveis e aderentes a superfícies sólidas (SOUZA; GARCIA-CRUZ, 2004; EIRAS *et al.*, 2007; CROUZIER; BOUDOU; PICART, 2010).

Na literatura é reportado o uso de alguns destes biopolímeros em sensores eletroquímicos, como quitosana (CAO *et al.*, 2008; HASSAN; HABIB; HASSAN, 2008; JANEGITZ *et al.*, 2009), celulose (WANG; BONAKDAR; PACK, 1987; GILMARTIN; HART, 1994; FLOROU *et al.*, 2000), e porfirana (LIMA *et al.*, 2016).

Inspirados por esses aspectos, os derivados carboximetilados de quitosana e celulose foram utilizados na construção de novos sensores eletroquímicos. O interesse na incorporação destes derivados carboximetilados em novas plataformas de sensores se dá devido a inserção de grupos polares na cadeia polimérica, o que melhora a solubilidade do biopolímero e a transferência de elétrons na superfície eletródica.

Xu e colaboradores (2006), por exemplo, desenvolveram um biossensor amperométrico immobilizando a peroxidase de raiz forte em um eletrodo de carbono vítreo (ECV) modificado com nanocompósito de quitosana carboximetilada (QCM) e nanopartículas de ouro (NPs-Au) para a quantificação de peróxido de hidrogênio (XU *et al.*, 2006). Yang e colaboradores (2013) desenvolveram um citossensor modificando um ECV com grafeno e QCM para a quantificação de células HL-60 (YANG *et al.*, 2013), dentre outros trabalhos utilizando a QCM (WANG *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2016).

Utilizando a celulose carboximetilada (CCM) também são relatados diversos trabalhos. Lu e colaboradores (2015) modificaram um ECV com nanotubos de carbono (NTC), montmorillonita e CCM para a quantificação de ácido indol-3-acético e ácido salicílico (LU *et al.*, 2015). Chang e colaboradores (2016)

modificaram um ECV com CCM, NTC e nanotubos de haloisita para a determinação de ácido úrico, adenina e guanina em fluidos biológicos (CHANG *et al.*, 2016). Mais recentemente, Piovesan e colaboradores (2017) desenvolveram um sensor modificando a superfície de um ECV com NPs-Au estabilizadas em CCM para a determinação de taninos condensados em extratos de Acácia (PIOVESAN *et al.*, 2017), entre outros trabalhos utilizando a CCM (BARIK *et al.*, 2010; ARENAS *et al.*, 2016).

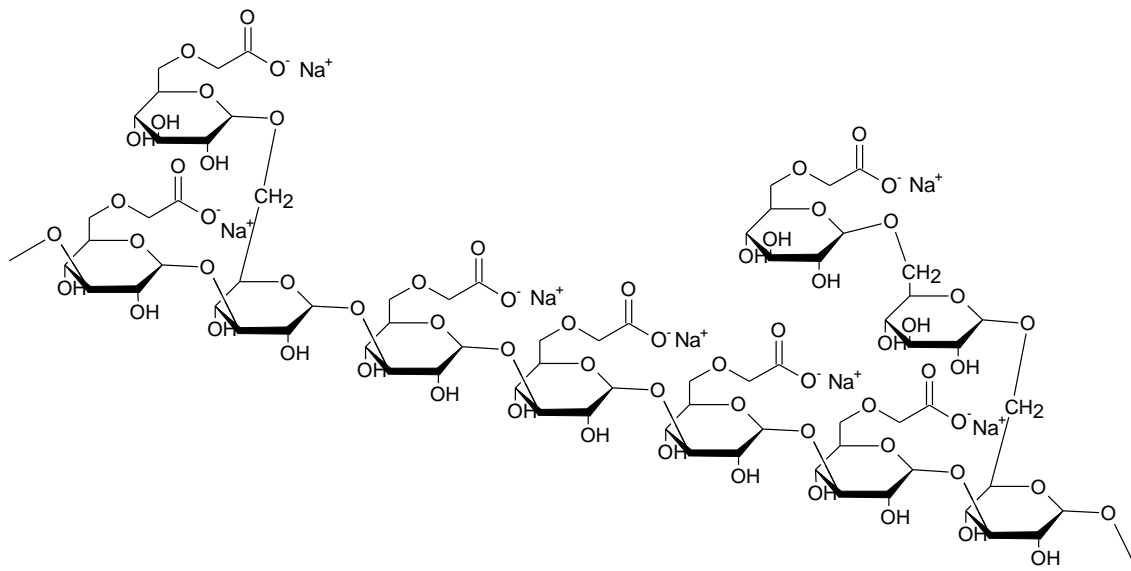
### 1.3 BOTRIOSFERANA

Os biopolímeros produzidos por algumas bactérias ou fungos são denominados polissacarídeos extracelulares ou exopolissacarídeos, e apresentam vantagens frente aos outros polissacarídeos naturais por apresentar processo de extração e purificação mais simples e maior rendimento, conferindo menor custo a produção (SOUZA; GARCIA-CRUZ, 2004). A botriosferana é um exopolissacarídeo do tipo  $\beta$  (1  $\rightarrow$  3; 1  $\rightarrow$  6)-D-glucana produzido pelo fungo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05, relatada pela primeira vez por Barbosa e colaboradores (2003) (BARBOSA *et al.*, 2003). As propriedades da botriosferana vêm sendo estudadas desde então, apresentando atividades biológicas anticancerígenas (QUEIROZ *et al.*, 2015), antioxidantes (GIESE *et al.*, 2015) e hipoglicemiantes (MIRANDA-NANTES *et al.*, 2011), além de aplicações eletroquímicas. França (2007) incorporou a botriosferana juntamente com polianilina na fabricação de um biofilme pela técnica de camada por camada (do inglês *layer by layer*) (FRANÇA, 2007). Cortes (2008) também utilizando essa técnica desenvolveu um biossensor depositando juntamente com botriosferana a enzima lacase, proveniente do mesmo fungo, em camadas alternadas com policloreto de dialildimetilamônio para a determinação de dopamina, utilizando ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico) como mediador de elétrons (CORTES, 2008). Entretanto, não existem reportados na literatura exemplos do uso de botriosferana carboximetilada (BCM) (Figura 1) na construção de sensores.

Como observado na Figura 1, a carboximetilação da botriosferana ocorre no carbono 6 e o grau de substituição pode variar conforme as condições experimentais. A investigação e aplicação deste biopolímero no campo da eletroanálise se fazem importante, uma vez que a quantidade de grupos polares

ligados à cadeia polimérica confere maior sensibilidade e estabilidade em sensores eletroquímicos, podendo também melhorar o desempenho de biossensores, pois institui um ambiente favorável a imobilização de componentes biológicos.

**Figura 1** – Representação estrutural da botriosferana carboximetilada.



**Fonte:** o próprio autor.

#### 1.4 CARBON BLACK

Diversos tipos de eletrodo base são utilizados na eletroanálise, destacando-se o ECV devido a boa condutividade elétrica, estabilidade térmica, facilidade de modificação, biocompatibilidade e robustez, entretanto, este eletrodo tem pouca sensibilidade e seletividade quando utilizado na determinação de alguns analitos de interesse clínico e ambiental (MALEKI *et al.*, 1998). Para superar esse inconveniente, emprega-se modificação química deste tipo de eletrodo com materiais carbonáceos nanoestruturados, resultando num dispositivo com melhor relação sinal-ruído e transferência rápida de elétrons (WU; FEI; HU, 2003; ALOTHMAN *et al.*, 2010; MADRAKIAN; HAGHSHENAS; AFKHAMI, 2014).

O carbon black (CB) é um nanomaterial carbonáceo, com cerca de 90% da produção destinada a indústria da borracha (DONNET; BANSAL; WANG, 1993), entretanto, outras aplicações do CB são encontradas na literatura, seja utilizado como adsorvente (PRETE; OLIVEIRA; TARLEY, 2017), na fabricação de baterias (ALCÁNTARA *et al.*, 2001) ou na eletroanálise, de forma análoga aos NTCs,

pois apresenta boas características eletroquímicas e baixo custo quando comparado com outros materiais carbonáceos comumente utilizados na eletroanálise como grafite, grafeno e NTC, apresentando características semelhantes ou até superiores aos mesmos (CINTI *et al.*, 2015).

A partir de 2010, o uso de CB ganhou notoriedade na construção de novos sensores, sendo utilizado para a modificação de eletrodos a base de carbono e empregado como eletrodo de trabalho na detecção e/ou quantificação de diversas espécies químicas, como íons mercúrio (II) (CINTI *et al.*, 2016b), compostos fenólicos (TALARICO *et al.*, 2015b), poluentes organofosforados (CINTI *et al.*, 2016a), proteínas heme (SUPRUN *et al.*, 2012), NADH (ZANARDI *et al.*, 2015), fosfato (TALARICO *et al.*, 2015a), fármacos (SILVA; FATIBELLO-FILHO, 2017; WONG; SANTOS; FATIBELLO-FILHO, 2018), pesticidas (DEROCO; LOURENCAO; FATIBELLO-FILHO, 2017), além de utilizados no desenvolvimento de biossensores (PORTACCIO *et al.*, 2013; ARDUINI *et al.*, 2015).

Em 2015, Vicentini e colaboradores, avaliaram três diferentes tipos de CB, realizando caracterização física, morfológica e eletroquímica, como potencial modificador frente a diferentes analitos. Os sensores fabricados indicaram que dentre os diferentes CB analisados, o Vulcan XC72R (VXC72R) apresentou melhores propriedades eletroquímicas além de melhor recobrimento de superfície, aumento na magnitude do sinal analítico e estabilidade (VICENTINI *et al.*, 2015). Nesse sentido, BCM pode ser incorporado no filme de CB para o desenvolvimento de uma nova arquitetura de sensor eletroquímico com propriedades eletroquímicas melhoradas, visto que não há descrito na literatura o uso de BCM para esse propósito.

## 1.5 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos representam uma importante classe de compostos químicos presentes em diversos produtos naturais, poluentes industriais, medicamentos e também no organismo humano. Por esse motivo, esses compostos são muito estudados, seja em função de suas propriedades ou na determinação dos mesmos em diferentes matrizes.

Dopamina (DOP) (Figura 2a) é uma catecolamina que atua como um neurotransmissor central importante relacionado a regulação do movimento. A

diminuição da concentração de DOP no organismo pode desencadear, dentre outras doenças, a de Parkinson e, ao contrário, uma sobredosagem pode causar aumento da frequência cardíaca e pressão arterial (HARDMAN; LIMBIRD; GILMAN, 1996).

Paracetamol (PAR) (Figura 2b), também conhecido como acetaminofeno, é um fármaco com propriedades analgésicas amplamente utilizado pela população, vendido sem prescrição médica e de baixo custo, se torna uma alternativa a pacientes portadores da doença de Parkinson para o alívio da dor crônica causada pela perda de controle da função motora. Além disso, altos níveis de PAR no organismo podem desencadear doenças hepáticas (HARDMAN; LIMBIRD; GILMAN, 1996). Sendo assim, os níveis de DOP e PAR podem ser determinados e monitorados em pacientes portadores desta doença, para um controle clínico dos níveis desses analitos no organismo. Neste contexto, é importante desenvolver métodos sensíveis, seletivos e rápidos para a determinação simultânea de DOP e PAR, além de verificar se um analito não interfere na determinação do outro, quantificando esses analitos individualmente.

**Figura 2** – Fórmula estrutural de (a) DOP e (b) PAR.



**Fonte:** o próprio autor.

## 1.6 DETERMINAÇÃO ELETROANALÍTICA DE DOP E PAR

Os métodos oficiais descritos para a determinação de DOP e PAR individualmente, envolvem o uso de espectrofotometria (UNITED STATES PHARMACOPOEIAL CONVENTION, 2007; BRITISH PHARMACOPOEIA COMMISSION, 2009; BRASIL, 2010), além disso, outros métodos são relatados na literatura para a determinação destes analitos como cromatografia (KNOX; JURAND, 1977; FOTOPOULOU; IOANNOU, 2002), fluorimetria (WANG; SUN; TANG, 2002; LLORENT-MARTÍNEZ *et al.*, 2007), eletroforese capilar (OLEFIROWICZ; EWING, 1990; HEITMEIER; BLASCHKE, 1999) e os métodos eletroanalíticos (KEELEY *et al.*, 2012; CHEEMALAPATI *et al.*, 2013).

A necessidade de se desenvolver métodos mais simples, rápidos e ambientalmente amigáveis, colocam os métodos eletroanalíticos frente às técnicas comumente utilizadas como cromatografia e espectrofotometria, uma vez que oferecem como vantagens o baixo custo de instrumentação, menor consumo de reagentes, uso de reagentes de menor toxicidade, menor tempo de análise, possibilidade de determinação de múltiplos analitos simultaneamente, além de fornecer limites de detecção (LD) extremamente baixos, tornando-se uma alternativa viável para a utilização em análises clínicas ou no controle de qualidade nas indústrias (SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003).

Nesse caso, as interessantes vantagens apresentadas pelas técnicas eletroanalíticas aliadas aos eletrodos modificados com materiais nanoestruturados e polissacarídeos naturais podem ser empregadas para a determinação simultânea de DOP e PAR em diferentes matrizes, melhorando a sensibilidade, diminuindo o LD e eliminando etapas de preparo da amostra (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

Existem alguns métodos eletroanalíticos reportados na literatura que utilizam eletrodos modificados para a determinação simultânea de DOP e PAR, destacando as suas vantagens frente a outros métodos analíticos comumente empregados para essa finalidade. Alothman e colaboradores (2010) desenvolveram um sensor modificando o ECV com nanotubos de carbono de múltiplas paredes (NTCMP) funcionalizados para a determinação simultânea de DOP e PAR em formulações farmacêuticas e soro humano (ALOTHMAN *et al.*, 2010).

Cheemalapati e colaboradores (2013) desenvolveram um sensor para a determinação simultânea de DOP e PAR em formulações farmacêuticas e urina, modificando a superfície de um ECV com nanocompósito de NTCMP e óxido de grafeno (OG) (CHEEMALAPATI *et al.*, 2013).

Keeley e colaboradores (2012) empregaram um filme fino de carbono pirolítico (FCPi) para a determinação de DOP e PAR em soro humano e formulações farmacêuticas simultaneamente (KEELEY *et al.*, 2012).

Um eletrodo de carbono cerâmico (ECC) modificado com nanotubos de carbono de parede simples (NTCPS) foi desenvolvido por Habibi, Jahanbakhshi e Pournaghi-Azar (2011), sendo aplicado na determinação simultânea de DOP e PAR em formulações farmacêuticas (HABIBI; JAHANBAKHSI; POURNAGHI-AZAR, 2011).

Kutluay e Aslanoglu (2014) desenvolveram um sensor eletroquímico modificando um ECV com NTCMP funcionalizados com nanopartículas de cobalto (NPs-Co) e empregaram na determinação simultânea de DOP e PAR em amostras biológicas e comerciais (KUTLUAY; ASLANOGLU, 2014).

Gholivand e Amiri (2012) modificaram um eletrodo de ouro (EAu) com filme de polipirrol oxidado (PPO) e azofloxina (AZ) para a determinação de DOP e PAR em soro humano e formulações farmacêuticas (GHOLIVAND; AMIRI, 2012).

Baccarin e colaboradores (2017) empregaram um sensor desenvolvido a partir da modificação de superfície do ECV com composto de óxido de grafeno reduzido (OGR), CB e Quitosana (Qui) para a determinação simultânea de DOP e PAR em urina (BACCARIN *et al.*, 2017).

Kannan e Sevel (2017) determinaram DOP e PAR simultaneamente em amostras comerciais utilizando um sensor baseado na modificação de um ECV com poli-4-amino-6-hidroxi-2-mercaptopyrimidina (Poli-AHM) (KANNAN; SEVEL, 2017).

Devaraj e colaboradores (2016) desenvolveram uma modificação para o ECV com NTCMP e nanopartículas de Cu/Cu<sub>2</sub>O estabilizadas em ácido oleico para a determinação de DOP e PAR em formulações farmacêuticas (DEVARAJ *et al.*, 2016).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

Desenvolver uma modificação para o ECV utilizando a BCM em conjunto com o CB.

Empregar o sensor proposto no desenvolvimento de um procedimento voltamétrico para a determinação simultânea de DOP e PAR.

Determinar os níveis de DOP e PAR em fluidos biológicos e amostras farmacêuticas empregando o sensor e o procedimento proposto.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Empregar a voltametria cíclica (VC) para estudos exploratórios do comportamento voltamétrico de DOP e PAR em diferentes condições.

Estudar a influência das concentrações da dispersão de CB e solução de BCM na resposta de DOP e PAR.

Caracterizar o sensor proposto eletroquimicamente e por microscopia eletrônica de varredura.

Avaliar o sensor proposto como eletrodo de trabalho para a determinação de DOP e PAR simultaneamente, comparando-o com outros eletrodos à base de carbono relatados na literatura.

Investigar o melhor valor de pH e o melhor eletrólito suporte para a determinação de DOP e PAR.

Empregar VC para caracterizar o tipo de processo predominante na reação eletroquímica.

Avaliar as técnicas voltamétricas de pulso diferencial e de onda quadrada para a construção de curvas analíticas para a determinação de DOP e PAR.

Avaliar o efeito dos possíveis interferentes presentes nas amostras analisadas e determinar os analitos em amostras biológicas, como urina e fluido cefalorraquiano, e formulações farmacêuticas.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes utilizados no presente trabalho foram de grau analítico. As soluções foram preparadas com água ultrapura Milli-Q sistema (Millipore®) com resistividade superior a 18 MΩ cm. DOP, PAR e ferricianeto de potássio foram obtidos da Sigma-Aldrich. Cloreto de potássio, fosfato de potássio monobásico, fosfato de potássio dibásico, hidróxido de sódio, ácido acético, ácido bórico, ácido fosfórico, ácido clorídrico, metanol e N, N-dimetilformamida (DMF) foram obtidos da Anidrol. CB VXC72R foi gentilmente cedido pela Cabot Corporation. As formulações farmacêuticas foram adquiridas em uma farmácia local na cidade de Londrina, Paraná, Brasil.

Os eletrólitos suporte utilizados foram uma solução de cloreto de potássio 0,1 mol L<sup>-1</sup> e uma solução tampão de fosfato. Esta última é composta de fosfato de potássio monobásico a 0,1 mol L<sup>-1</sup> com pH ajustado para 7,0 com solução de fosfato de potássio dibásico a 0,1 mol L<sup>-1</sup>.

O preparo das soluções padrão de DOP e PAR foi realizado a cada dia de trabalho, na ordem de concentração 0,01 mol L<sup>-1</sup>, ambos analitos dissolvidos em eletrólito suporte utilizado (tampão fosfato (pH 7,0) ou KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>). O ferricianeto de potássio foi preparado na ordem de concentração 5,0 mmol L<sup>-1</sup> em solução de cloreto de potássio 0,1 mol L<sup>-1</sup>.

#### 3.2 OBTENÇÃO DA BOTRIOSFERANA CARBOXIMETILADA

A botriosferana foi obtida como descrito por Barbosa e colaboradores (2003) com algumas modificações, sendo posteriormente dialisada e liofilizada para as reações de carboximetilação (BARBOSA *et al.*, 2003).

A carboximetilação do exopolissacarídeo foi realizada com algumas modificações do método descrito por Xu e colaboradores (2009) (XU *et al.*, 2009). Em uma proporção adequada, 1 g de botriosferana liofilizada foi suspensa em isopropanol e mantida sob agitação por 15 minutos. Em seguida, uma solução de hidróxido de sódio 20% (m/v) foi adicionada gota a gota, mantendo-se sob agitação

constante por 3 horas. Outra solução contendo a mistura de ácido monocloroacético, hidróxido de sódio 20% (m/v) e isopropanol foi adicionada a reação, mantendo sob agitação constante por 1 hora. Posteriormente, uma solução contendo apenas ácido monocloroacético e isopropanol foi adicionada a reação, sendo mantida em banho de glicerina à  $60 \pm 2$  °C por 3 horas. Após esse tempo, a reação foi interrompida, mantendo-se a mesma em banho de gelo até atingir temperatura ambiente. Logo após, foi realizada a neutralização da solução com ácido acético. A solução obtida foi precipitada com 3 volumes de metanol e posteriormente lavada com metanol 80% (v/v), etanol 99,5% P.A., etanol 80% (v/v) e, por último, éter etílico 99,8% P.A.. O precipitado obtido foi solubilizado em água destilada, e a solução resultante foi dialisada contra água destilada por 48 horas e liofilizada. Após a obtenção da BCM liofilizada, a mesma foi mantida sob refrigeração à 4 °C. Além disso, o grau de substituição dos grupos carboximéticos na estrutura da botriosferana foi determinado de acordo com o descrito por Tatongjai e Lumdubwong (2010), sendo neste trabalho utilizadas BCM com graus de substituição iguais a 0,84 e 1,02 (TATONGJAI; LUMDUBWONG, 2010).

### 3.3 INSTRUMENTAÇÃO

As análises voltamétricas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato AutoLab PGSTAT 101 controlado pelo software NOVA 2.1.3 e as análises impedimétricas realizadas em um potenciostato/galvanostato  $\mu$ AutoLab tipo III controlado pelo software NOVA 1.0, ambos acoplados a uma célula eletroquímica de vidro com capacidade para 15 mL, com uma tampa de Teflon® e encaixes para os eletrodos. Como eletrodo de referência foi utilizado um eletrodo de Ag/AgCl ( $\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$ ) e o eletrodo auxiliar utilizado foi uma placa de platina (5 mm x 5 mm). Como eletrodo de trabalho foi utilizado um ECV com 5 mm de diâmetro fabricado pela Tokay Carbon Co., Japão. Antes do uso, o ECV foi polido com suspensão de alumina de 0,3  $\mu\text{m}$  em um pano de polimento e enxaguado com água ultrapura em abundância, em seguida, o ECV foi sonicado durante 5 minutos em etanol 99,5% P.A. e depois 5 minutos em água ultrapura e seco em temperatura ambiente. Posteriormente, o mesmo foi modificado com filme de BCM, filme de CB ou filmes contendo BCM e CB, sendo o CB utilizado da forma natural.

O pH foi medido a  $25,0 \pm 0,5$  °C usando um pHmetro ION, modelo pHE500, empregando um eletrodo combinado de vidro com um eletrodo de referência externo de Ag/AgCl ( $\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$ ). As pesagens foram feitas utilizando-se uma balança analítica Shimadzu, modelo AY220, com precisão de  $\pm 0,1$  mg.

As imagens de microscopia foram obtidas utilizando um microscópio eletrônico de varredura JOEL FEG-SEM JSM 6330-F operado a 5,0 kV. As amostras foram preparadas em uma placa de carbono vítreo, e secas sob temperatura ambiente.

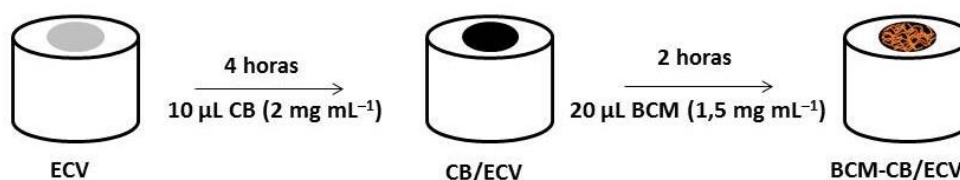
O método comparativo utilizado para a determinação individual de DOP e PAR em formulações farmacêuticas foi a espectrofotometria, empregando-se um espectrofotômetro ThermoSpectronic UV-visível, modelo Genesys, utilizando uma célula de quartzo de 1 cm acoplada a um computador.

### 3.4 PREPARO DO SENSOR

A solução de BCM foi obtida dissolvendo-se 1,5 mg de BCM liofilizada em 1,0 mL de água. A dispersão de CB foi preparada adicionando-se 2,0 mg de CB em 1,0 mL de DMF e posterior sonicação durante 1 hora a temperatura constante.

A modificação do eletrodo foi então realizada adicionando 10  $\mu\text{L}$  da dispersão de CB sob a superfície limpa do ECV com o auxílio de uma micropipeta, deixando-se secar por 4 horas em temperatura ambiente. Em seguida, 20  $\mu\text{L}$  da dispersão de BCM foi adicionada sobre a superfície do ECV modificado com CB, deixando-se secar por 2 horas a temperatura ambiente como mostrado na Figura 3.

**Figura 3** – Representação esquemática do preparo do sensor.



**Fonte:** o próprio autor.

### 3.5 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

As medidas voltamétricas foram realizadas em triplicata adicionando-se alíquotas das soluções padrão dos analitos à célula eletroquímica contendo 10 mL do eletrólito suporte, em que para cada adição, as medidas eram realizadas após 30 segundos de agitação. Nestes experimentos foram utilizadas a VC, voltametria de onda quadrada (VOQ) e voltametria de pulso diferencial (VPD). Os valores de LD e de limite de quantificação (LQ) foram calculados de acordo com a recomendação da IUPAC, sendo  $3 \times s/b$  e  $10 \times s/b$ , respectivamente, em que  $s$  é o desvio padrão de 10 medidas do branco e  $b$  o coeficiente angular da curva analítica (LONG; WINEFORDNER, 1983).

As medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foram realizadas no potencial formal do par redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  de 1 Hz a 100 kHz (10 pontos por década) e com perturbação de 10 mV (rms), para 5,0 mmol L<sup>-1</sup> de K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] em 0,1 mol L<sup>-1</sup> de KCl.

### 3.6 PREPARO DAS AMOSTRAS

O fluido cerebrospinal sintético foi preparado de acordo com a literatura dissolvendo-se 2,1 g de NaCl, 0,07 g de KCl, 0,08 g de CaCl<sub>2</sub>, 0,2 g de glicose, 0,4 g de NaHCO<sub>3</sub> e 0,002 g de uréia em um balão volumétrico de 250 mL e utilizado para a determinação simultânea de PAR e DOP (TOLEDO *et al.*, 2005). A urina sintética foi preparada dissolvendo-se 0,73 g de NaCl, 0,40 g de KCl, 0,28 g de CaCl<sub>2</sub>.2 H<sub>2</sub>O, 0,56 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,35 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,25 g de NH<sub>4</sub>Cl e 6,25 g de uréia em um balão volumétrico de 250 mL (LAUBE; MOHR; HESSE, 2001). Em uma célula voltamétrica contendo 10 mL de solução tampão fosfato (pH 7,0) foi adicionado 100 µL do fluido cerebrospinal sintético e urina sintética e determinadas as concentrações de DOP e PAR pelo método de adição e recuperação.

Para as determinações individuais de ambos analitos foram utilizadas solução injetável de DOP (5,0 mg mL<sup>-1</sup>) e comprimidos contendo 750 mg de PAR. A solução injetável foi preparada diluindo-se 307 µL desta solução em um balão volumétrico calibrado de 10 mL com solução tampão fosfato (pH 7,0). Em seguida, 15 µL da solução preparada foi transferida para a célula voltamétrica para a

quantificação. Para o PAR foram macerados 10 comprimidos e a massa referente a um comprimido transferida a um balão volumétrico calibrado de 10 mL, sendo dissolvido em tampão fosfato (pH 7,0). Seguidamente, a solução preparada foi diluída transferindo-se 20  $\mu\text{L}$  a um balão volumétrico de 10 mL. Por fim, 100  $\mu\text{L}$  da solução obtida foi transferida para a célula voltamétrica para a realização das análises.

O método de referência utilizado para comparação dos resultados foi o espectrofotométrico descrito na Farmacopeia Britânica (BRITISH PHARMACOPOEIA COMMISSION, 2009). Para DOP, a curva analítica foi construída em um intervalo de concentração de 65,3 – 262  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , sendo o analito e a amostra farmacêutica dissolvidos em solução de HCl 0,1  $\text{mol L}^{-1}$ . Para PAR, a curva analítica foi construída em uma faixa de concentração de 0,66 – 2,7  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , com o padrão e amostra farmacêutica dissolvidos em metanol. A absorvância foi medida em um intervalo de 220 – 350 nm, com máximos de absorção em 279 e 248 nm para DOP e PAR, respectivamente.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ESTUDO DOS COMPONENTES DO SENSOR NA RESPOSTA VOLTAMÉTRICA DE DOP E PAR

A modificação da superfície do ECV com CB é bem estabelecida na literatura (DEROCO; LOURENCAO; FATIBELLO-FILHO, 2017; SILVA; FATIBELLO-FILHO, 2017; WONG; SANTOS; FATIBELLO-FILHO, 2018). Houve necessidade do CB ser disperso em DMF, não sendo possível obter dispersão do CB em solução de BCM, pois o CB não apresentou boa dispersabilidade na solução do biopolímero e o mesmo não é solúvel em DMF. Desta forma, o sensor proposto foi construído modificando-se a superfície do ECV primeiramente com a dispersão de CB e em seguida a solução de BCM como relatado na seção 3.4.

A interação entre o CB e a BCM na construção do eletrodo proposto é reportada aqui pela primeira vez. Segundo Vicentini e colaboradores (2015) a composição do CB (VXC72R) é de 91,2% de carbono e 7,8% de oxigênio, correspondente a grupos gráfiticos, C = O, O = C – O e C – O (VICENTINI *et al.*, 2015). Tais grupos podem reagir com os grupos carboxílicos e hidroxila da BCM, sugerindo que a interação entre ambos na superfície do ECV ocorre via adsorção e interações físicas, como ligação de hidrogênio. O filme formado se mostrou aderente, homogêneo e estável sobre a superfície do ECV.

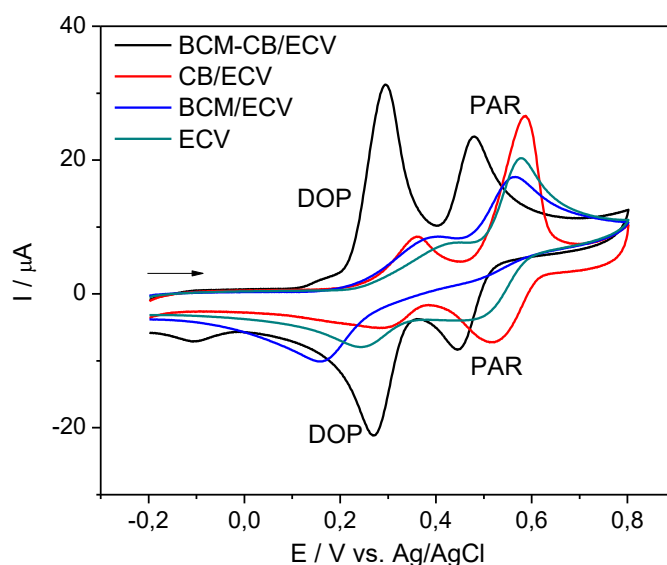
O eletrodo proposto (BCM-CB/ECV) foi comparado com o ECV não modificado, com o ECV modificado apenas com CB (CB/ECV) e com o ECV modificado apenas com BCM (BCM/ECV). O ECV modificado primeiramente com BCM seguido do CB (CB-BCM/ECV) não foi comparado, uma vez que a dispersão do CB causa um bloqueio nas propriedades superficiais da BCM. A Figura 4 mostra a comparação realizada entre os eletrodos, indicando melhor desempenho do sensor proposto (BCM-CB/ECV) em relação aos demais em termos de definição dos picos, reversibilidade e intensidade de sinal analítico, especialmente para DOP, sugerindo que a BCM desempenha papel importante na interação entre ambas moléculas e a superfície do eletrodo modificado.

O significativo aumento da magnitude de corrente para a DOP sugere prováveis interações eletrostáticas e interações do tipo ligação de hidrogênio entre os grupos carboxílicos e hidroxila da BCM e os grupos hidroxila e amina da

DOP. O mesmo não acontece com o PAR, uma vez que em sua estrutura apenas um grupo hidroxila esta disponível para interação. Assim, a interação da BCM com DOP é mais significativa do que aquela com PAR.

Analisando os voltamogramas para DOP e PAR na Figura 4, é possível identificar que os processos são quase-reversíveis, uma vez que foi observado pico no sentido da varredura reversa com valores de  $\Delta E$  iguais a 25 mV e 33 mV para DOP e PAR, respectivamente, utilizando o BCM-CB/ECV. Além disso, os potenciais de oxidação distintos observados entre DOP e PAR permitem a determinação simultânea de ambos analitos em amostras reais.

**Figura 4** – Voltamogramas cíclicos ( $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ ) obtidos da comparação dos diferentes eletrodos estudados em solução de KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  contendo  $192 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  de DOP e  $192 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  de PAR.



Foram realizados os estudos quanto à concentração das dispersões de CB e soluções de BCM utilizadas para ambos analitos na ordem de concentração de  $192 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  em KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , utilizando VC.

As dispersões de CB utilizadas foram de  $1,0$  a  $3,0 \text{ mg mL}^{-1}$  em DMF, sendo que a dispersão de  $3,0 \text{ mg mL}^{-1}$  apresentou corpo de fundo, indicando que o CB não se dispersa totalmente nesta concentração. Desta forma, a dispersão de  $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$  foi a escolhida, pois apresentou boa dispersabilidade, repetibilidade e um

aumento na magnitude de corrente anódica de 146% para DOP e 46,2% para PAR em relação a dispersão de  $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$  de CB.

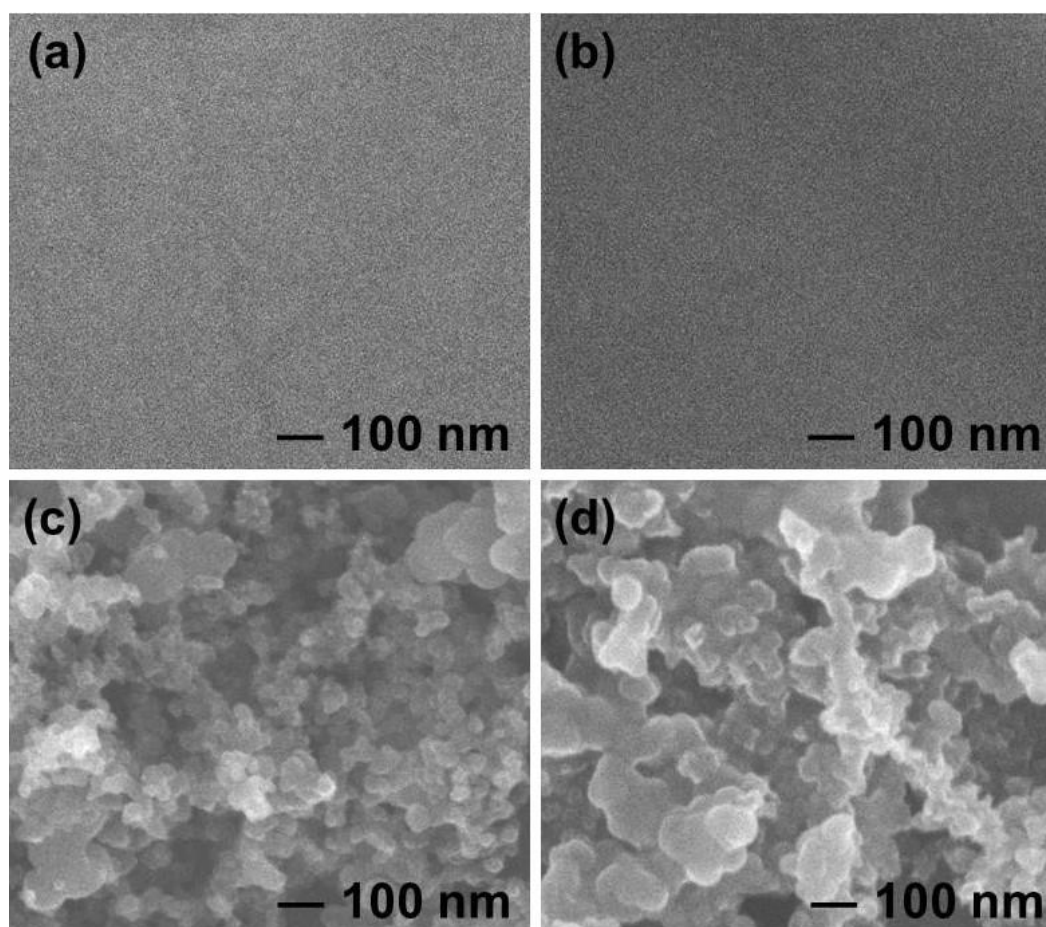
As soluções de BCM foram analisadas na faixa de concentração de  $1,0$  a  $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ . A solução de  $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$  de BCM foi escolhida pois apresentou, mesmo que discreto, um aumento na magnitude de corrente anódica de ambos analitos (5,7% para DOP e 16,8% para PAR) em relação a solução de  $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$  de BCM. A solução de  $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$  foi descartada pois não apresentou melhoria em relação a  $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ .

Adicionalmente, BCM com diferentes graus de carboximetilação foram comparadas, entretanto, não foi observada diferença significativa na resposta voltamétrica dos analitos, mesmo apresentando uma diferença de relativa expressão, 0,84 e 1,02. Desta forma, a BCM utilizada nos estudos iniciais (0,84) foi mantida para o restante dos experimentos, mesmo apresentando grau de carboximetilação menor do que a comparada.

#### 4.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

A Figura 5 mostra as imagens por microscopia eletrônica de varredura (MEV) obtidas para as diferentes modificações da superfície do ECV. Pode-se observar na Figura 5b, em que a superfície do ECV está modificada apenas com a solução de BCM, que não há diferença visual na imagem em relação à Figura 5a, que mostra a superfície do ECV sem nenhuma modificação, indicando a provável formação de uma película transparente de BCM sob a superfície do ECV. Na Figura 5c a superfície do ECV foi recoberta com a dispersão de CB nanoestruturado, observando-se a formação de uma estrutura porosa, como já relatada em outros trabalhos na literatura (VICENTINI *et al.*, 2015). A Figura 4d mostra a superfície do ECV com a modificação proposta e, quando comparada a superfície do ECV modificado apenas com CB esta apresenta estruturas com aglomerados em diferentes formatos, correspondendo a inserção da BCM ao filme.

**Figura 5** – MEV da superfície de (a) ECV, (b) BCM/ECV, (c) CB/ECV e (d) BCM-CB/ECV com ampliação de 50.000x.



#### 4.3 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA

Definidas as melhores condições na construção do sensor, foram realizados experimentos com o ECV, BCM/ECV, CB/ECV e BCM-CB/ECV em VC variando-se a velocidade de varredura de 5 a 100  $\text{mV s}^{-1}$  utilizando-se uma solução de 5,0  $\text{mmol L}^{-1}$  de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  em 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  de KCl. Nesse estudo, observou-se um aumento de corrente anódica e catódica conforme o aumento da velocidade de varredura (dados não mostrados). Utilizando a equação de Randles-Sevcik (Equação 1) a área eletroativa dos eletrodos foi estimada através de um gráfico da corrente de pico versus a raiz quadrada da taxa de varredura.

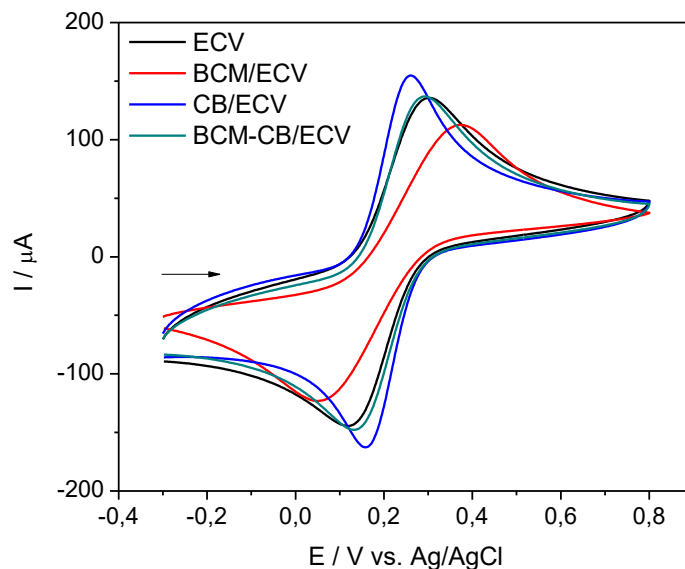
$$I_{pa} = 2,69 \times 10^5 ACD^{1/2} n^{3/2} v^{1/2} \quad (1)$$

em que  $I_{pa}$  é a corrente de pico anódico (A),  $A$  é a área eletroativa ( $\text{cm}^2$ ),  $C$  é a concentração de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  ( $\text{mol cm}^{-3}$ ),  $D$  é o coeficiente de difusão de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  ( $7,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ) (BARD; FAULKNER, 2001),  $n$  é o número de elétrons envolvidos na reação e  $v$  é a velocidade de varredura ( $\text{V s}^{-1}$ ).

Os valores obtidos foram  $0,126 \text{ cm}^2$ ,  $0,106 \text{ cm}^2$ ,  $0,136 \text{ cm}^2$  e  $0,129 \text{ cm}^2$  para ECV, BCM/ECV, CB/ECV e BCM-CB/ECV, respectivamente. Embora os valores obtidos tenham sido próximos, pode-se observar que o CB/ECV apresentou maior área eletroativa frente aos outros eletrodos, destacando as interessantes propriedades dos nanomateriais como aumento de condutividade e área eletroativa. Frente ao sensor proposto (BCM-CB/ECV), o CB/ECV pode ter apresentado melhor desempenho pois não possui uma macromolécula em sua superfície, contendo mais locais eletroativos expostos que facilitam a transferência de elétrons frente a uma molécula inorgânica, uma vez que não há interação da mesma com a BCM como ocorre com DOP e PAR.

Um gráfico de  $\log I_a$  versus  $\log v$  (dados não mostrados) foi construído e as inclinações obtidas foram próximas ao valor teórico para uma reação ideal (0,50), ECV (0,59), BCM/ECV (0,65), CB/ECV (0,53) e BCM-CB/ECV (0,63) indicando que o processo que ocorre na superfície dos eletrodos é controlado preferencialmente por difusão das espécies (BARD; FAULKNER, 2001). A separação de pico entre os potenciais anódico e catódico ( $\Delta E_p$ ) também foi calculada, utilizando uma velocidade de varredura de  $100 \text{ mV s}^{-1}$  para ECV (0,183 V), BCM/ECV (0,322 V), CB/ECV (0,107 V) e BCM-CB/ECV (0,165 V), observando-se novamente uma melhor resposta para o eletrodo modificado apenas com CB utilizando-se o  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  como observado na Figura 6.

**Figura 6** – Voltamogramas cíclicos ( $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ ) da comparação dos diferentes eletrodos estudados utilizando-se uma solução de  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  em  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl.

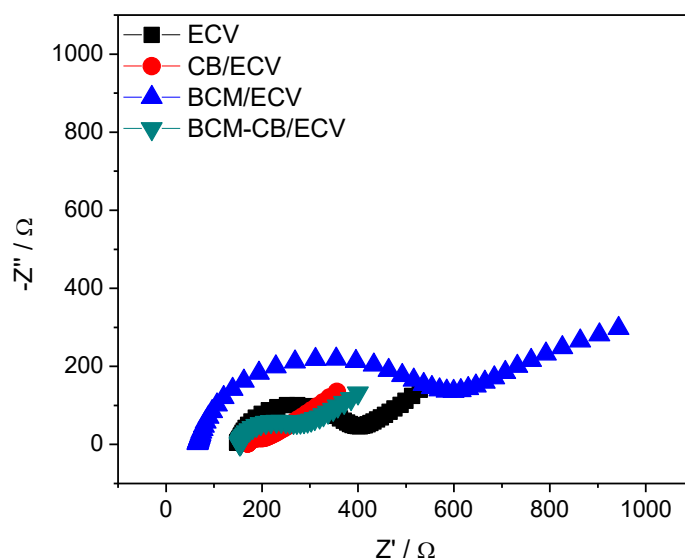


As análises por EIE foram realizadas para fornecer informações sobre propriedades interfaciais na superfície do ECV em relação à presença de diferentes modificadores. Os diagramas de Nyquist obtidos em um potencial aplicado de  $0,212 \text{ V}$  para ECV,  $0,213 \text{ V}$  para BCM/ECV,  $0,211 \text{ V}$  para CB/ECV e  $0,214 \text{ V}$  para BCM-CB/ECV em solução de  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  em  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl são mostrados na Figura 7. Nestes diagramas, o diâmetro do semicírculo está diretamente relacionado à resistência de transferência de elétrons ( $R_{et}$ ). A Tabela 1 mostra os valores de  $R_{et}$  de cada eletrodo. Pode-se observar que o BCM/ECV apresentou o maior semicírculo, indicando que possui maior resistência a transferência de elétrons frente aos outros sensores, por outro lado, o CB/ECV apresentou menor semicírculo. Esses resultados são concordantes com os obtidos no estudo da área eletroativa, indicando que as propriedades da BCM não se aplicam a moléculas inorgânicas. Além disso, a constante de taxa heterogênea aparente ( $k'$ ) para cada eletrodo foi calculada de acordo com a Equação 2:

$$k' = RT / n^2 F^2 R_{et} AC \quad (2)$$

em que  $R$  é a constante universal dos gases,  $T$  é a temperatura termodinâmica (298,15 K),  $n$  é o número de elétrons envolvidos na reação,  $F$  é a constante de Faraday (96,485 C mol<sup>-1</sup>),  $A$  é a área eletroativa de cada eletrodo em cm<sup>2</sup> e  $C$  é a concentração de K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] em mol cm<sup>-3</sup>. Comparando os resultados apresentados na Tabela 1, O eletrodo BCM/ECV obteve menor valor de  $k'$  como esperado, uma vez que a inserção de macromoléculas na superfície do eletrodo dificulta a transferência de elétrons, justificando a resposta obtida pelo eletrodo proposto frente ao CB/ECV.

**Figura 7** – Diagramas de EIE dos diferentes eletrodos estudados utilizando-se uma solução de 5,0 mmol L<sup>-1</sup> de K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] em 0,1 mol L<sup>-1</sup> de KCl.



**Tabela 1** – Valores de  $R_{et}$  e  $k'$  obtidos por EIE

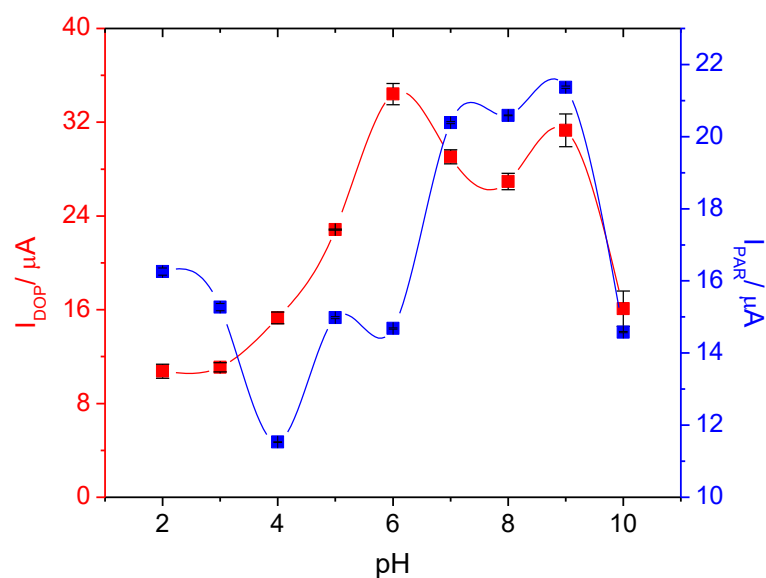
Sensor	$R_{et}$ ( $\Omega$ )	$k'$ (cm s <sup>-1</sup> )
ECV	252,8	$1,67 \times 10^{-3}$
BCM/ECV	523,3	$9,61 \times 10^{-4}$
CB/ECV	39,2	$9,99 \times 10^{-3}$
BCM-CB/ECV	126,4	$3,27 \times 10^{-3}$

#### 4.4 ESTUDO DO PH E ELETRÓLITO SUPORTE

O estudo do pH foi realizado em VC utilizando-se soluções tampão fosfato em uma faixa de pH de 2,0 a 10,0 a fim de se obter as melhores condições em termos de definição de pico, magnitude de corrente e repetibilidade. A Figura 8 apresenta os resultados obtidos para a corrente anódica, pois a mesma apresentou maior intensidade em relação a corrente catódica de DOP e PAR, sendo também escolhida para a quantificação dos mesmos. Levando em consideração os valores de  $pK_a$  de ambas as moléculas, 8,9 para DOP e 9,4 para PAR, é possível observar maiores intensidades de corrente em valores de pH maiores que 6,0 para DOP e maiores que 7,0 para PAR, indicando que além das prováveis ligações de hidrogênio formadas entre os grupos hidroxila da BCM e dos analitos, as interações eletrostáticas também podem contribuir na magnitude de sinal de DOP e PAR, uma vez que nestes valores de pH a BCM encontra-se predominantemente com cargas negativas ( $\text{COO}^-$ ) enquanto os analitos encontram-se em sua forma protonada.

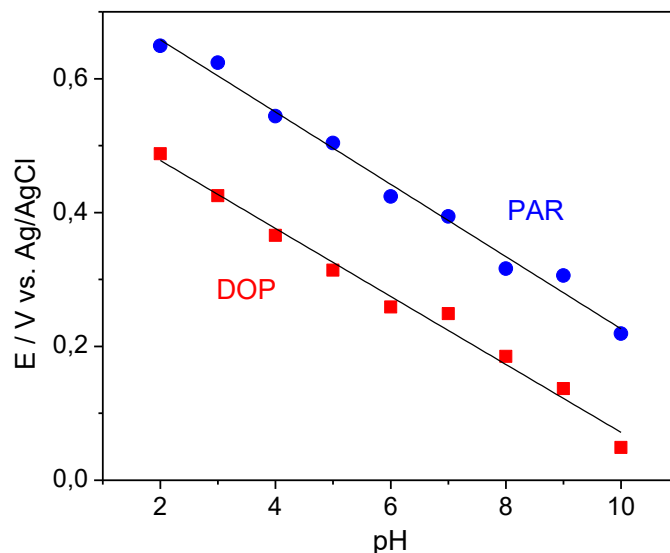
A maior intensidade de corrente para DOP foi obtida em pH 6,0, enquanto que para PAR a maior corrente obtida foi em pH 9,0. Embora o melhor resultado obtido para a DOP foi o pH 6,0, quando comparado ao PAR em pH 7,0 a DOP ainda possui uma corrente muito maior e, levando em consideração o objetivo de determinação simultânea destes analitos em fluidos biológicos, o pH 7,0 foi escolhido. Em seguida, uma comparação entre o tampão Britton-Robinson e fosfato em pH 7,0 foi realizada, obtendo melhor definição de pico e maior magnitude de corrente em tampão fosfato, sendo o escolhido para o decorrer do trabalho.

**Figura 8** – Estudo do pH em tampão fosfato contendo  $96 \mu\text{mol L}^{-1}$  de DOP e  $96 \mu\text{mol L}^{-1}$  de PAR em VC ( $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ ) utilizando o BCM-CB/ECV.



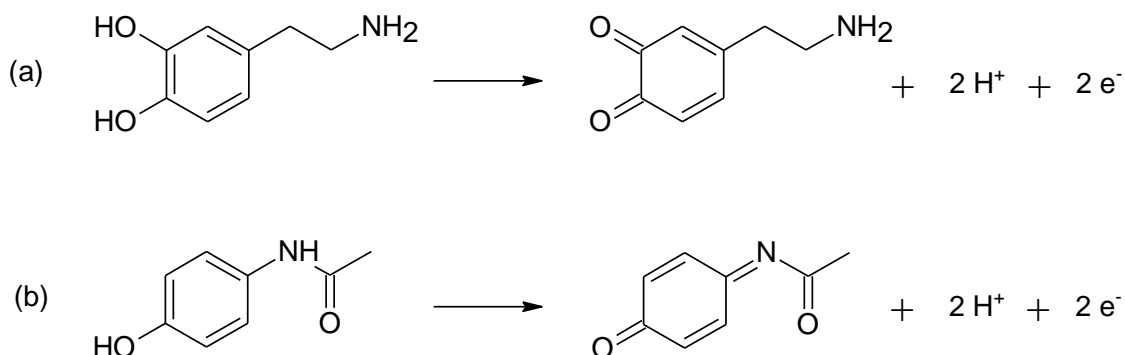
Foram construídos gráficos do potencial de pico anódico versus o pH da solução para ambos analitos (Figura 9). O coeficiente angular obtido de  $51 \text{ mV/pH}$  ( $r = 0,9848$ ) para DOP e  $54 \text{ mV/pH}$  ( $r = 0,9872$ ) para PAR estão próximos ao valor esperado para sistemas Nerstianos, indicando que na reação de oxidação de ambos analitos estão envolvidos o mesmo número de prótons e elétrons.

**Figura 9** – Estudo do pH em função do potencial de pico anódico em tampão fosfato contendo  $96 \mu\text{mol L}^{-1}$  de DOP e  $96 \mu\text{mol L}^{-1}$  de PAR em VC ( $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ ) utilizando o BCM-CB/ECV.



O mecanismo de oxidação de DOP e PAR envolve 2 prótons e 2 elétrons, como descrito em outros trabalhos na literatura (GHOLIVAND; AMIRI, 2012; EISELE *et al.*, 2013; KUTLUAY; ASLANOGLU, 2014). DOP é oxidada em dopamina-*o*-quinona e PAR em N-acetil-*p*-quinona imina, como pode ser observado na Figura 10.

**Figura 10** – Mecanismo proposto para a eletro-oxidação de (a) DOP e (b) PAR utilizando o BCM-CB/ECV.



#### 4.5 ESTUDO DA VELOCIDADE DE VARREDURA

O efeito da velocidade de varredura foi estudado para DOP e PAR em uma faixa de 5 a 200  $\text{mV s}^{-1}$ , como mostrado na Figura 11. Gráficos lineares do pico de corrente anódica versus a velocidade de varredura foram obtidos para ambos analitos como pode ser observado na Figura 12, sugerindo um mecanismo regido preferencialmente por adsorção (BARD; FAULKNER, 2001). As respectivas equações são  $i_{pa} = 15,0 + 0,90 v$  ( $r = 0,9877$ ) para DOP e  $i_{pa} = 10,4 + 0,72 v$  ( $r = 0,9880$ ) para PAR. Ademais, a dependência linear entre o logaritmo do pico de corrente anódica versus o logaritmo da velocidade de varredura indica que os processos que ocorrem na superfície do sensor não são controlados por difusão, uma vez que os coeficientes angulares obtidos são diferentes do valor teórico esperado (0,50), sendo as respectivas equações  $\log i_{pa} = 0,43 + 0,81 \log v$  ( $r = 0,9994$ ) para DOP e  $\log i_{pa} = 0,22 + 0,86 \log v$  ( $r = 0,9984$ ) para PAR (Figura 12) (BARD; FAULKNER, 2001).

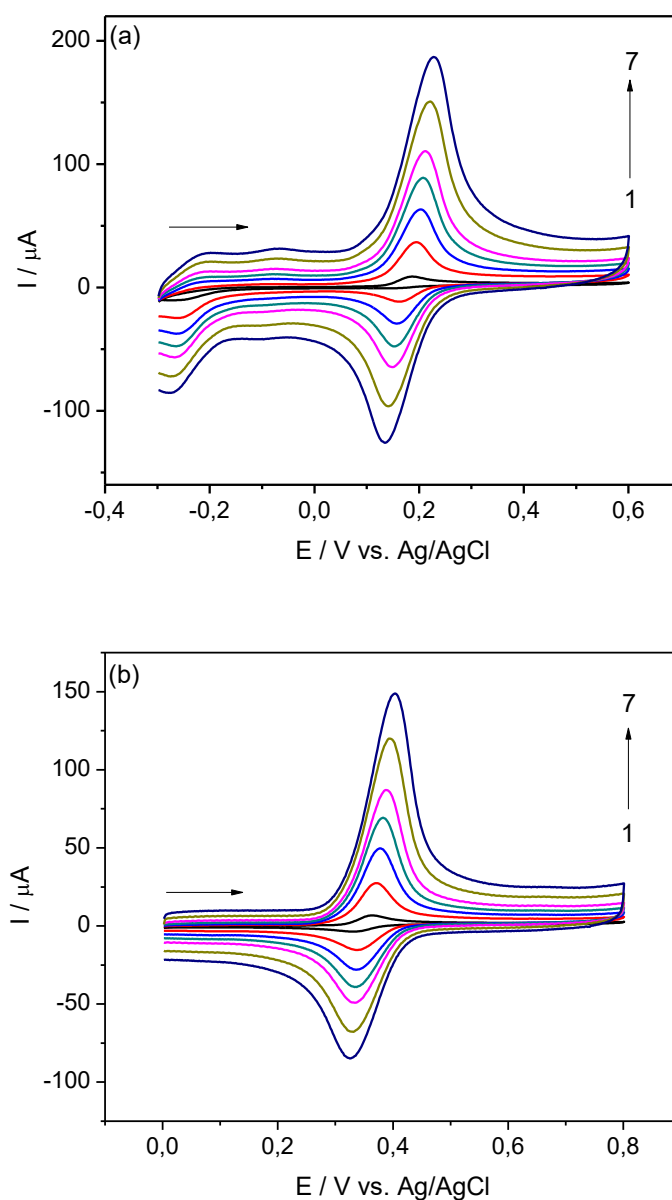
Os resultados sugerem que as propriedades da BCM promovem interações iônicas e ligação de hidrogênio entre a superfície eletrodica e as moléculas de DOP e PAR, sendo que tais interações podem resultar em um aumento da concentração superficial destas espécies no sensor proposto, justificando o resultado obtido utilizando DOP e PAR, visto que quando utilizado uma molécula inorgânica que não promove tais interações, como o  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , um comportamento inverso foi observado. Além disso, utilizando o estudo da velocidade de varredura foi possível estimar a concentração de espécie adsorvida na superfície do BCM-CB/ECV. O cálculo da concentração de espécies adsorvidas pode ser estimado utilizando o método de Sharp, Petersson e Edström (1979), por meio da seguinte equação (Equação 3) (SHARP; PETERSSON; EDSTRÖM, 1979):

$$i_{pa} = n^2 F^2 A \Gamma v / 4 RT \quad (3)$$

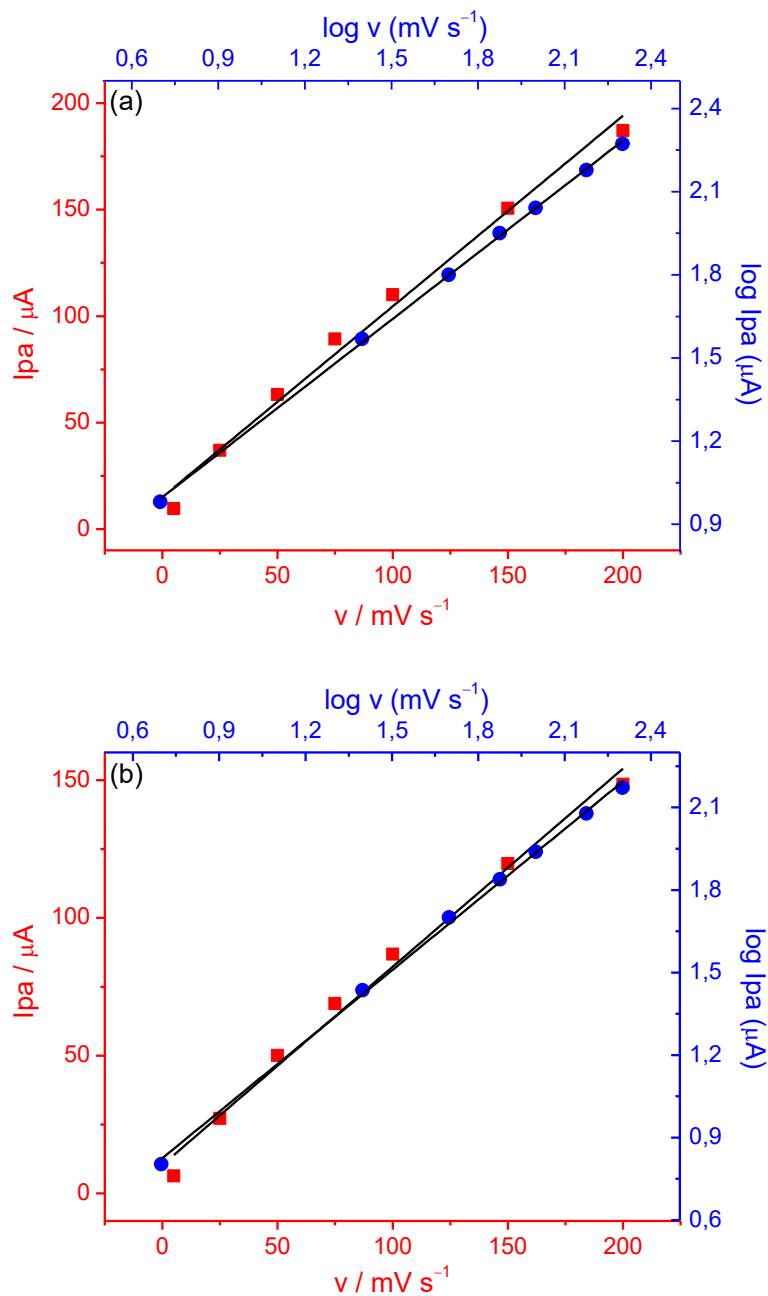
sendo,  $i_{pa}$  a corrente de pico anódico,  $A$  é a área eletroativa,  $n$  é o número de elétrons (2),  $F$  é a constante de Faraday,  $v$  é a velocidade de varredura ( $\text{V s}^{-1}$ ),  $R$  é a constante universal dos gases,  $T$  é a temperatura termodinâmica (298,15 K) e  $\Gamma$  é a concentração de espécie adsorvida. Com o gráfico da dependência da  $i_{pa}$  pela variação da  $v$ , pode-se obter os valores da concentração de DOP e PAR adsorvidos

na superfície do BCM-CB/ECV pelo coeficiente angular da reta obtida, que foram  $1,9 \text{ nmol cm}^{-2}$  e  $1,5 \text{ nmol cm}^{-2}$ , respectivamente. Os resultados obtidos indicam que a DOP adsorve pouco mais na superfície do sensor proposto em relação ao PAR, provavelmente em decorrência de interações mais efetivas entre DOP e BCM em relação ao PAR, como discutido na seção 4.1.

**Figura 11** – Voltamogramas cíclicos em solução tampão fosfato (pH 7,0) em diferentes velocidades de varredura: (1)  $5 \text{ mV s}^{-1}$ ; (2)  $25 \text{ mV s}^{-1}$ ; (3)  $50 \text{ mV s}^{-1}$ ; (4)  $75 \text{ mV s}^{-1}$ ; (5)  $100 \text{ mV s}^{-1}$ ; (6)  $150 \text{ mV s}^{-1}$ ; (7)  $200 \text{ mV s}^{-1}$  para (a)  $192 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  de DOP e (b)  $192 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  de PAR utilizando o BCM-CB/ECV.



**Figura 12** – Relação linear entre a corrente de pico anódica versus velocidade de varredura e do logaritmo da corrente de pico anódica versus o logaritmo da velocidade de varredura para os voltamogramas cíclicos de (a) DOP e (b) PAR utilizando o BCM-CB/ECV nas condições mencionadas na Figura 11.



#### 4.6 DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE DOP E PAR UTILIZANDO O BCM-CB/ECV

VPD e VOQ foram utilizadas para a construção das curvas analíticas simultâneas para DOP e PAR. Para isso, os parâmetros instrumentais das técnicas foram estudados com o objetivo de se obter melhor definição de pico, intensidade de corrente e repetibilidade entre as análises. Utilizando  $48 \mu\text{mol L}^{-1}$  de DOP e  $48 \mu\text{mol L}^{-1}$  de PAR em solução tampão fosfato (pH 7,0), foram avaliados para a VPD a amplitude de pulso ( $a$ ) em uma faixa de 10 – 100 mV, sendo escolhida a amplitude de 75 mV; a velocidade ( $v$ ) em uma faixa de 3 – 12,5  $\text{mV s}^{-1}$ , obtendo-se melhor resultado em 10  $\text{mV s}^{-1}$ ; e o tempo de modulação ( $t$ ) em uma faixa de 3 – 10 ms, tendo 5 ms apresentado melhor resultado.

Utilizando-se as mesmas concentrações de DOP e PAR em solução tampão fosfato (pH 7,0), foram avaliados para a VOQ a frequência ( $f$ ) em uma faixa de 10 – 40 Hz, sendo escolhida a frequência de 30 Hz; a amplitude ( $a$ ) em uma faixa de 10 – 70 mV, obtendo-se melhor resultado em 60 mV; e o incremento de varredura ( $\Delta E_s$ ) em uma faixa de 1 – 4 mV, tendo 3 mV apresentado melhor resultado.

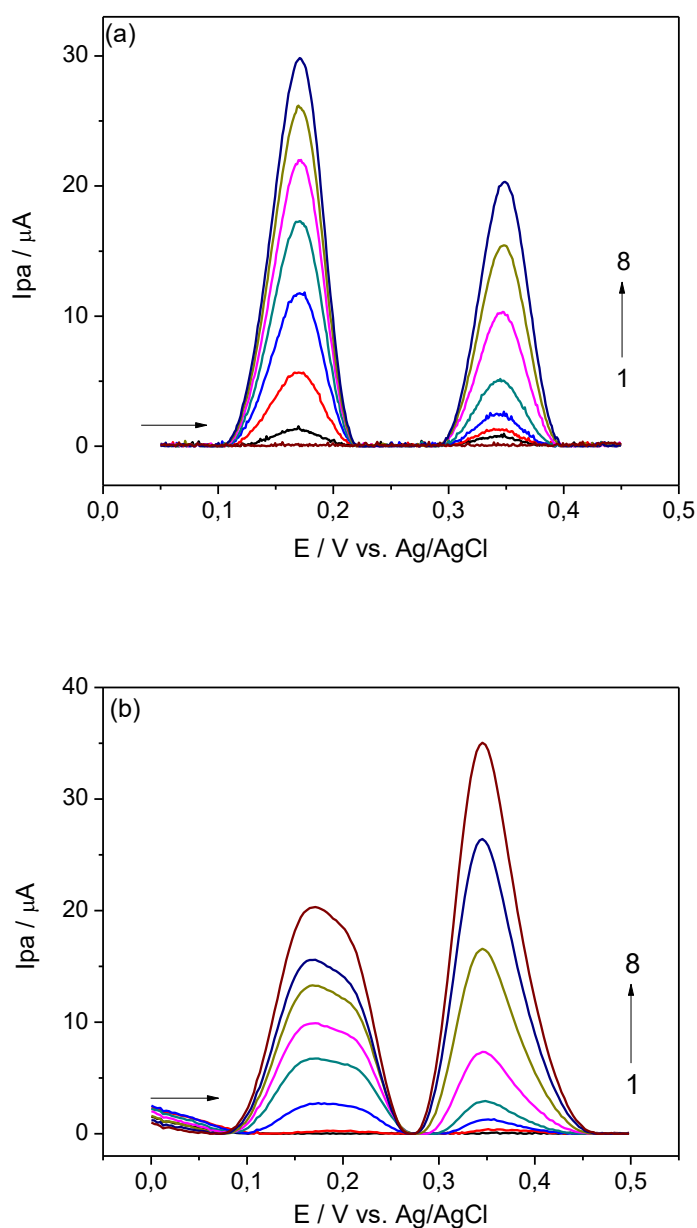
Após a otimização, as curvas analíticas para a determinação simultânea de DOP e PAR foram construídas em VPD e VOQ em uma faixa de concentração de 0,099 – 2,9  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para DOP e 0,70 – 19  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para PAR, como mostra a Figura 13, não sendo possível a construção das curvas analíticas em soluções contendo concentrações iguais de DOP e PAR, uma vez que a DOP em concentrações maiores possui intensidade de corrente anódica muito maior que PAR.

Em VPD foi obtida uma equação de regressão linear para DOP de  $I_{pa} / \mu\text{A} = 0,67 + 10,6 [c (\mu\text{mol L}^{-1})]$  ( $r = 0,9950$ ) e para PAR de  $I_{pa} / \mu\text{A} = -0,081 + 1,08 [c (\mu\text{mol L}^{-1})]$  ( $r = 0,9995$ ) como pode ser observado na Figura 14a. Em VOQ foi obtida uma equação de regressão linear para DOP de  $I_{pa} / \mu\text{A} = -0,41 + 6,86 [c (\mu\text{mol L}^{-1})]$  ( $r = 0,9927$ ) e para PAR de  $I_{pa} / \mu\text{A} = -1,2 + 1,83 [c (\mu\text{mol L}^{-1})]$  ( $r = 0,9851$ ) como observado na Figura 14b. Com base nos resultados obtidos, pode-se observar melhor sensibilidade para DOP em VPD e para PAR em VOQ, entretanto, a VPD foi a técnica escolhida para a determinação simultânea de DOP e PAR, pois apresentou melhor definição de pico e melhor repetibilidade entre as medidas.

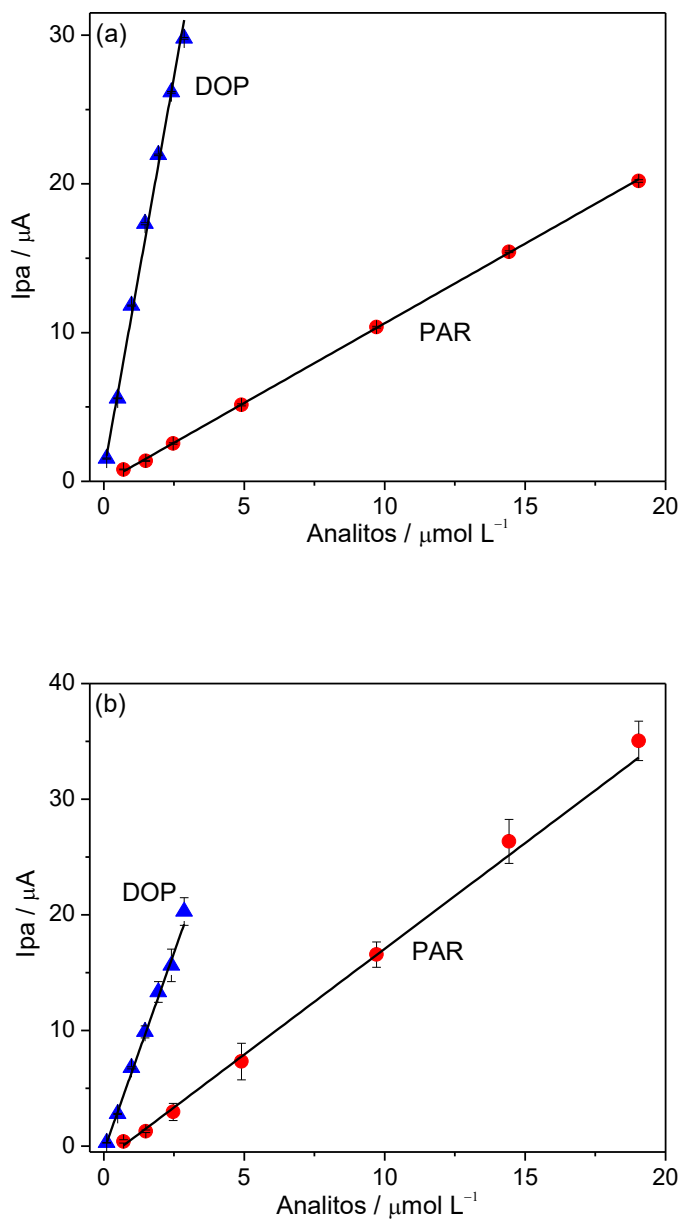
As repetibilidades intra- e inter-dia foram avaliadas por medidas sucessivas,  $N = 10$  e  $N = 3$  (durante três dias), respectivamente, de  $1,5 \mu\text{mol L}^{-1}$  de

DOP e  $9,7 \mu\text{mol L}^{-1}$  de PAR com baixos valores de desvio padrão relativo (DPR %), como pode ser observado na Tabela 2, juntamente com os demais parâmetros analíticos obtidos para a determinação simultânea.

**Figura 13** – Voltamogramas de (a) pulso diferencial e (b) de onda quadrada obtidos para  $0,099 - 2,9 \mu\text{mol L}^{-1}$  de DOP (2 – 8) e  $0,70 - 19 \mu\text{mol L}^{-1}$  de PAR (2 – 8) em tampão fosfato (pH 7,0) utilizando o BCM-CB/ECV. Parâmetros da VPD:  $a = 75 \text{ mV}$ ;  $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$ ;  $t = 5 \text{ ms}$ . Parâmetros da VOQ:  $f = 30 \text{ Hz}$ ;  $a = 60 \text{ mV}$ ;  $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$ .



**Figura 14** – Curvas analíticas obtidas para a determinação de DOP e PAR simultaneamente de (a) VPD e (b) VOQ em tampão fosfato (pH 7,0) utilizando o BCM-CB/ECV. Parâmetros da VPD:  $a = 75 \text{ mV}$ ;  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ ;  $t = 5 \text{ ms}$ . Parâmetros da VOQ:  $f = 30 \text{ Hz}$ ;  $a = 60 \text{ mV}$ ;  $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$ .



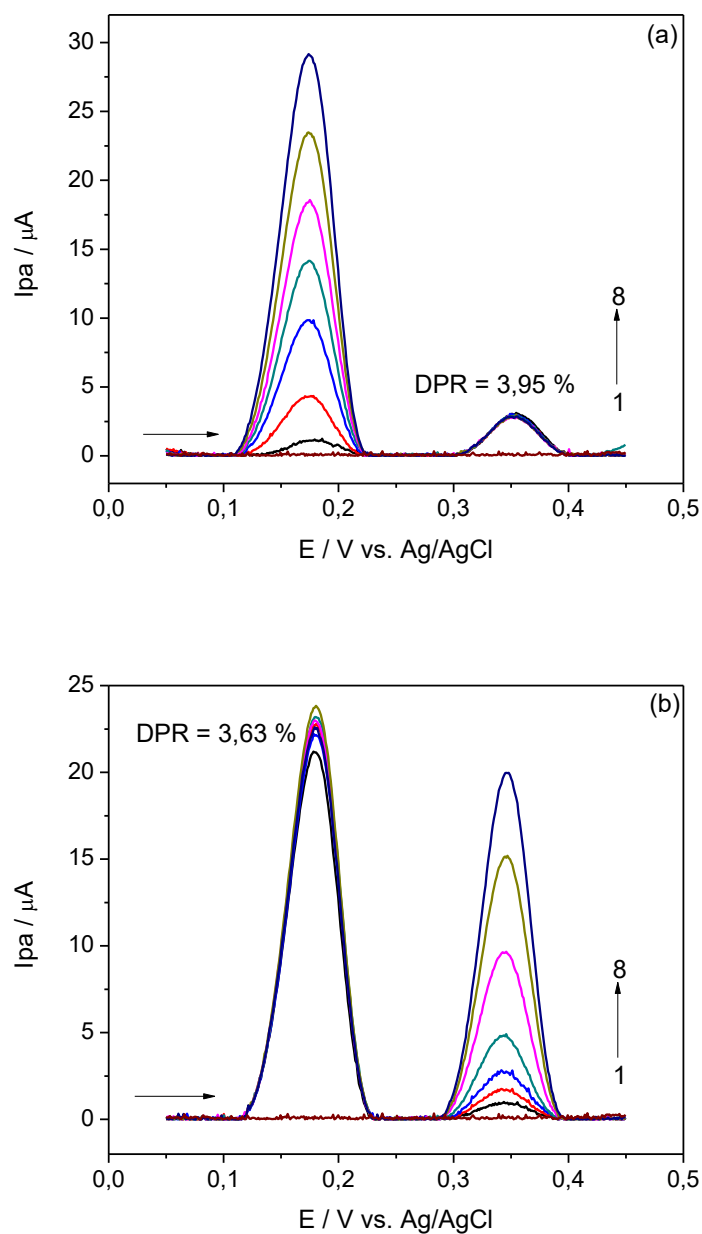
**Tabela 2** – Parâmetros analíticos para a determinação simultânea de DOP e PAR em solução tampão fosfato (pH 7,0) utilizando o BCM-CB/ECV em VPD ( $a = 75 \text{ mV}$ ;  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ ;  $t = 5 \text{ ms}$ )

	DOP	PAR
Potencial de pico anódico(V)	0,17	0,35
Faixa linear ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	0,099 – 2,9	0,70 – 19
Coeficiente de correlação (r)	0,9950	0,9995
Coeficiente angular ( $\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$ )	10,6	1,08
Coeficiente linear ( $\mu\text{A}$ )	0,67	-0,081
LD ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	0,013	0,11
LQ ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	0,043	0,36
Repetibilidade intra-dia (DPR (%)) (N = 10)	4,1	4,5
Repetibilidade inter-dia (DPR (%)) (N = 3)	5,3	6,9

Em seguida, as curvas analíticas de um analito na presença constante do outro foram construídas e indicam que não há interferência de um analito na determinação do outro, uma vez que os valores de DPR obtidos para o analito mantido em concentração constante foram menores que 3,95%, como observado na Figura 15.

As curvas individuais para DOP e PAR também foram construídas (dados não mostrados) e para fins comparativos, todos os resultados obtidos nas curvas simultâneas e individuais foram sumarizados na Tabela 3, destacando que não há diferença significativa entre os coeficientes angulares das curvas obtidas, indicando que um analito não interfere na determinação do outro.

**Figura 15** – Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para (a) 0,099 – 2,9  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de DOP (2 – 8) na presença de 2,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de PAR e (b) 0,68 – 19  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de PAR (2 – 8) na presença de 2,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de DOP em tampão fosfato (pH 7,0) utilizando o BCM-CB/ECV. Parâmetros da VPD:  $a = 75 \text{ mV}$ ;  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ ;  $t = 5 \text{ ms}$ .



**Tabela 3** – Parâmetros analíticos para a determinação de DOP e PAR utilizando VPD ( $a = 75 \text{ mV}$ ;  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ ;  $t = 5 \text{ ms}$ ) em solução tampão fosfato (pH 7,0) utilizando o BCM-CB/ECV

Analito	Faixa linear ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Equação de regressão linear	Coefficiente de correlação (r)
(a) Dados analíticos para a determinação de DOP e PAR individualmente			
1. DOP	0,099 – 2,9	$i_{pa} / \mu\text{A} = 0,50 + 10,3 [c (\mu\text{mol L}^{-1})]$	0,9994
2. PAR	0,70 – 19	$i_{pa} / \mu\text{A} = -0,15 + 1,07 [c (\mu\text{mol L}^{-1})]$	0,9990
(b) Dados analíticos para a determinação de um analito mantendo-se constante de $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ do outro			
3. DOP	0,099 – 2,9	$i_{pa} / \mu\text{A} = -0,16 + 9,81 [c (\mu\text{mol L}^{-1})]$	0,9984
4. PAR	0,68 – 19	$i_{pa} / \mu\text{A} = 0,20 + 1,04 [c (\mu\text{mol L}^{-1})]$	0,9988
(c) Dados analíticos para a determinação simultânea de DOP e PAR			
5. DOP	0,099 – 2,9	$i_{pa} / \mu\text{A} = 0,67 + 10,6 [c (\mu\text{mol L}^{-1})]$	0,9950
6. PAR	0,70 – 19	$i_{pa} / \mu\text{A} = -0,081 + 1,08 [c (\mu\text{mol L}^{-1})]$	0,9995

#### 4.7 EFEITO DOS INTERFERENTES, REPETIBILIDADE DO SENSOR E ESTABILIDADE

Os possíveis interferentes na determinação de DOP e PAR em fluidos biológicos e formulações farmacêuticas foram investigados como uréia, amido, estearato de magnésio, glicose, ácido ascórbico, ácido úrico, hidroquinona e epinefrina para uma solução contendo  $1,9 \mu\text{mol L}^{-1}$  de DOP e PAR nas proporções 1:10, 1:1 e 10:1 (analito:interferente) e ainda 1:1000 (DOP/PAR:ácido ascórbico). Todas as espécies investigadas, com exceção do ácido úrico e epinefrina, não apresentaram interferência significativa, isto é, menor que 5%. A epinefrina apresentou interferência no potencial de oxidação de DOP, entretanto, estes analitos apresentaram potenciais de redução distintos. O ácido úrico apresentou interferência no potencial de oxidação do PAR, desta forma foi inviabilizada a determinação simultânea destes analitos em amostras de urina utilizando a corrente anódica. Todavia, essa determinação pode ser possível ao empregar a corrente catódica, como pode ser visto mais adiante na seção 4.9.

A repetibilidade na fabricação do sensor proposto foi avaliada pela corrente obtida de  $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$  de DOP e PAR em três modificações diferentes utilizando solução tampão fosfato (pH 7,0). Um valor de DPR de 5,5% e 6,1% foram obtidos para DOP e PAR, respectivamente, confirmando a reprodutibilidade na preparação da modificação. Além disso, a estabilidade do sensor foi avaliada e o mesmo se mostrou estável em mais de 50 medidas, com uma diminuição de corrente menor que 5,0% para ambos analitos, indicando que a modificação proposta é viável para a determinação destes.

#### 4.8 COMPARAÇÃO ENTRE OS DIFERENTES SENSORES UTILIZADOS PARA A DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE DOP E PAR

O desempenho do sensor proposto foi comparado com outros sensores desenvolvidos para a determinação simultânea de DOP e PAR reportados na literatura, como mostra a Tabela 4. O sensor proposto neste trabalho se destaca dentre os demais quando comparado seu LD, especialmente para a DOP, apresentando um valor maior apenas do que o obtido por Devaraj e colaboradores (2016), por outro lado, o PAR obteve valor de LD maior do que o obtido por

Cheemalapati e colaboradores (2013), Kutluay e Aslanoglu (2014), Gholivand e Amiri (2012) e Baccarin e colaboradores (2017) (GHOLIVAND; AMIRI, 2012; CHEEMALAPATI *et al.*, 2013; KUTLUAY; ASLANOGLU, 2014; DEVARAJ *et al.*, 2016; BACCARIN *et al.*, 2017).

Cabe ressaltar, entretanto, que não há relato do uso de BCM na fabricação de sensores, sendo uma alternativa viável para a sua utilização na eletroanálise quando comparada com outros polissacarídeos naturais utilizados, uma vez que sua produção por via fermentativa é de relativo baixo custo e não necessita de grandes extensões de terra ou grande quantidade de crustáceos para sua produção, como no caso da celulose e quitosana. Ademais, o uso do CB se faz interessante frente aos trabalhos aqui relatados, visto que grande parte utiliza materiais carbonáceos de relativo alto custo, como OG, OGR e NTC. Deste modo, o uso de CB aliado a BCM se torna uma alternativa atrativa principalmente para a determinação de moléculas orgânicas, apresentando resultados satisfatórios quando comparado com literatura pertinente.

**Tabela 4** – Comparação entre diferentes sensores reportados na literatura para a determinação simultânea de DOP e PAR

Sensor	Faixa linear ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )		LD ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )		Referência
	DOP	PAR	DOP	PAR	
NTCMP/ECV	3,0 – 200	3,0 – 300	0,80	0,60	(ALOTHMAN <i>et al.</i> , 2010)
NTCMP-OG/ECV	0,20 – 400	0,50 – 400	0,022	0,047	(CHEEMALAPATI <i>et al.</i> , 2013)
FCPi	18 – 270	15 – 225	2,3	1,4	(KEELEY <i>et al.</i> , 2012)
NTCPS/ECC	0,40 – 150	0,20 – 100	0,22	0,12	(HABIBI; JAHANBAKHSI; POURNAGHI-AZAR, 2011)
NPs-Co-NTCMP/ECV	0,050 – 3,0	0,0052 – 0,45	0,015	0,0010	(KUTLUAY; ASLANOGLU, 2014)
PPO-AZ/EAu	0,10 – 30	0,20 – 100	0,050	0,080	(GHOLIVAND; AMIRI, 2012)
OGR-CB-Qui/ECV	3,2 – 32	2,8 – 19	0,20	0,053	(BACCARIN <i>et al.</i> , 2017)
Poli-AHM/ECV	2,5 – 25	2,0 – 25	0,20	0,15	(KANNAN; SEVELL, 2017)
Cu/Cu <sub>2</sub> O-AO/NTCMP/ECV	0,020 – 0,16	1,0 – 143	0,0033	1,51	(DEVARAJ <i>et al.</i> , 2016)
BCM-CB/ECV	0,099 – 2,9	0,70 – 19	0,013	0,11	Este trabalho

#### 4.9 DETERMINAÇÃO DE DOP E PAR EM FLUIDOS BIOLÓGICOS E FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS

O sensor desenvolvido foi aplicado na determinação de DOP e PAR em fluido cerebrospinal e formulações farmacêuticas por VPD utilizando corrente anódica. Os resultados obtidos são apresentados nas Tabelas 5 e 6.

Embora a interferência do ácido úrico tenha inviabilizado a determinação de DOP e PAR em urina, sua determinação pode ser realizada utilizando a corrente catódica, uma vez que os analitos possuem, ao contrário do ácido úrico, picos de redução. Deste modo, uma curva simultânea foi obtida para os picos de redução de DOP e PAR, em uma faixa linear de concentração de 0,099 – 2,9  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para DOP e 0,70 – 19  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para PAR em VPD nas mesmas condições utilizadas para a obtenção das curvas em corrente anódica. As equações de regressão linear obtidas foram  $i_{pc} / \mu\text{A} = 0,38 + 2,01 [c (\mu\text{mol L}^{-1})]$  ( $r = 0,9964$ ) para DOP e  $i_{pc} / \mu\text{A} = -0,042 + 0,288 [c (\mu\text{mol L}^{-1})]$  ( $r = 0,9996$ ) para PAR. Mesmo apresentando sensibilidade menor para ambos os analitos, pode-se determinar DOP e PAR simultaneamente em urina utilizando a corrente catódica, eliminando assim a interferência do ácido úrico no potencial de pico de PAR, como mostrado na Tabela 7.

Os resultados de recuperação obtidos na Tabela 5 e 7 indicam que o sensor proposto pode ser utilizado com sucesso na determinação de DOP e PAR em fluido cerebrospinal e urina, bem como, os resultados expressos na Tabela 6 indicam a viabilidade do sensor para a determinação de DOP e PAR em formulações farmacêuticas, com resultados satisfatórios quando comparados com o método de referência e  $F$  calculado menor que  $F$  crítico (19) (ANDERSON, 1987; BRITISH PHARMACOPOEIA COMMISSION, 2009).

**Tabela 5** – Determinação de DOP e PAR em fluido cefalorraquidiano por VPD ( $a = 75$  mV;  $v = 10$  mV s<sup>-1</sup>;  $t = 5$  ms)

Amostra	Analito	Adicionado ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Encontrado ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Recuperado (%)
A	DOP	0,99	$1,0 \pm 0,05$	101
	PAR	0,99	$0,95 \pm 0,03$	96,0
B	DOP	1,5	$1,4 \pm 0,05$	93,3
	PAR	2,5	$2,4 \pm 0,06$	96,0

**Tabela 6** – Determinação de DOP e PAR em formulações farmacêuticas utilizando o sensor proposto e o método oficial

Analito	Rotulado	VPD	Espectrofotométrico	$E$ (%) <sup>a</sup>	$F_{\text{calc}}$ <sup>b</sup>
DOP	$5,00^c$	$4,7 \pm 0,06$	$4,9 \pm 0,03$	-4,1	4,0
PAR	$750^d$	$742 \pm 0,09$	$755 \pm 0,05$	-1,7	3,2

<sup>a</sup> Média de erro (%) =  $[100 \times (\text{VPD} - \text{espectrofotométrico} / \text{espectrofotométrico})]$ .<sup>b</sup> Valor de  $F$  crítico = 19 (nível de confiança de 95 %).<sup>c</sup> mg mL<sup>-1</sup>.<sup>d</sup> mg/comprimido.

**Tabela 7** – Determinação de DOP e PAR em urina por VPD ( $a = 75$  mV;  $v = 10$  mV s<sup>-1</sup>;  $t = 5$  ms)

Amostra	Analito	Adicionado ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Encontrado ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Recuperado (%)
A	DOP	0,99	$0,99 \pm 0,04$	100
	PAR	0,99	$1,1 \pm 0,07$	111
B	DOP	1,5	$1,7 \pm 0,08$	113
	PAR	2,5	$2,4 \pm 0,1$	96,0

## 5 CONCLUSÕES

Um novo sensor eletroquímico para a determinação de DOP e PAR foi desenvolvido com sucesso utilizando pela primeira vez a BCM em conjunto com o CB, além disso, os resultados comprovam que esta combinação melhora significativamente a resposta dos analitos quando comparado com o ECV sem modificação. Os resultados obtidos demonstram a aplicabilidade do sensor e do método desenvolvido, visto que tanto a fabricação do sensor quanto a metodologia proposta é simples, rápida e sensível. Os analitos apresentaram potenciais distintos, permitindo sua determinação simultânea por VPD em solução tampão fosfato (pH 7,0). As curvas analíticas apresentaram boa correlação entre concentração e corrente, possibilitando a determinação simultânea de DOP e PAR em fluido cerebrospinal e a determinação dos mesmos individualmente em formulações farmacêuticas disponíveis no mercado utilizando a corrente anódica, além disso, a determinação simultânea de DOP e PAR em urina pode ser realizada utilizando a corrente catódica. O método aqui relatado representa um procedimento alternativo para o controle dos níveis de DOP e PAR em pacientes com a doença de Parkinson, assim como no controle de qualidade desses fármacos em medicamentos. Ademais, os resultados obtidos demonstram que as propriedades da BCM podem ser exploradas para fornecer uma interface seletiva a moléculas protonadas ou com grupos funcionais que promovem interações, como o caso dos compostos fenólicos. Deste modo, o sensor proposto torna-se ainda uma alternativa promissora para uma potencial determinação de uma mistura quaternária de DOP, PAR, epinefrina e hidroquinona, uma vez que não observou-se interferência entre estes compostos em corrente catódica, todos apresentando valores distintos de potenciais de redução.

## 6 REFERÊNCIAS

- ALCÁNTARA, R.; JIMÉNEZ-MATEOS, J. M.; LAVELA, P.; TIRADO, J. L. Carbon black: a promising electrode material for sodium-ion batteries. **Electrochemistry Communications**, v. 3, p. 639–642, 2001.
- ALOTHMAN, Z. A.; BURKHARIA, N.; WABAIDUR, S. M.; HAIDER, S. Simultaneous electrochemical determination of dopamine and acetaminophen using multiwall carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 146, p. 314–320, 2010.
- ANDERSON, R. L. **Practical Statistics for Analytical Chemists**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1987.
- ARDUINI, F.; FORCHIELLI, M.; AMINE, A.; NEAGU, D.; CACCIOTTI, I.; NANNI, F.; MOSCONE, D.; PALLESCHI, G. Screen-printed biosensor modified with carbon black nanoparticles for the determination of paraoxon based on the inhibition of butyrylcholinesterase. **Microchimica Acta**, v. 182, p. 643–651, 2015.
- ARENAS, C. B.; SÁNCHEZ-TIRADO, E.; OJEDA, I.; GÓMEZ-SUÁREZ, C. A.; GONZÁLEZ-CORTÉS, A.; VILLALONGA, R.; YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; PINGARRÓN, J. M. An electrochemical immunosensor for adiponectin using reduced graphene oxide–carboxymethylcellulose hybrid as electrode scaffold. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 223, p. 89–94, 2016.
- BACCARIN, M.; SANTOS, F. A.; VICENTINI, F. C.; ZUCOLOTTO, V.; JANEGITZ, B. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Electrochemical sensor based on reduced graphene oxide/carbon black/chitosan composite for the simultaneous determination of dopamine and paracetamol concentrations in urine samples. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 799, p. 436–443, 2017.
- BARBOSA, A. M.; STELUTI, R. M.; DEKKER, R. F. H.; CARDOSO, M. S.; SILVA, M. L. C. Structural characterization of Botryosphaeran: a (1→3;1→6)-β-d-glucan produced by the ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 1691–1698, 2003.
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2001.
- BAKIK, A.; SOLANKI, P. R.; KAUSHIK, A.; ALI, A.; PANDEY, M. K.; KIM, C. G.; MALHOTRA, B. D. Polyaniline–Carboxymethyl Cellulose Nanocomposite for Cholesterol Detection. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 10, p. 6479–6488, 2010.
- BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 5. ed. v. 2. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.
- BRITISH PHARMACOPOEIA COMMISSION. **British pharmacopoeia**. London: The Stationery Office, 2009.

CAO, X.; LUO, L.; DING, Y.; ZOU, X.; BIAN, R. Electrochemical methods for simultaneous determination of dopamine and ascorbic acid using cetylpyridine bromide/chitosan composite film-modified glassy carbon electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 129, p. 941–946, 2008.

CHANG, J.; XIAO, W.; LIU, P.; LIAO, X.; WEN, Y.; BAI, L.; LI, L.; LI, M. Carboxymethyl cellulose assisted preparation of water-processable halloysite nanotubular composites with carboxyl-functionalized multi-carbon nanotubes for simultaneous voltammetric detection of uric acid, guanine and adenine in biological samples. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 780, p. 103–113, 2016.

CHEEMALAPATI, S.; PALANISAMY, S.; MANI, V.; CHEN, S. M. Simultaneous electrochemical determination of dopamine and paracetamol on multiwalled carbon nanotubes/graphene oxide nanocomposite-modified glassy carbon electrode. **Talanta**, v. 117, p. 297–304, 2013.

CHEN, S.; DING, R.; MA, X.; XUE, L.; LIN, X.; FAN, X.; LUO, Z. Preparation of highly dispersed reduced graphene oxide modified with carboxymethyl chitosan for highly sensitive detection of trace Cu(II) in water. **Polymers**, v. 8, p. 78, 2016.

CINTI, S.; ARDUINI, F.; CARBONE, M.; SANSONE, L.; CACCIOTTI, I.; MOSCONE, D.; PALLESCHI, G. Screen-printed electrodes modified with carbon nanomaterials: a comparison among carbon black, carbon nanotubes and graphene. **Electroanalysis**, v. 27, p. 2230–2238, 2015.

CINTI, S.; NEAGU, D.; CARBONE, M.; CACCIOTTI, I.; MOSCONE, D.; ARDUINI, F. Novel carbon black-cobalt phthalocyanine nanocomposite as sensing platform to detect organophosphorus pollutants at screen-printed electrode. **Electrochimica Acta**, v. 188, p. 574–581, 2016a.

CINTI, S.; SANTELLA, F.; MOSCONE, D.; ARDUINI, F. Hg<sup>2+</sup> detection using a disposable and miniaturized screen-printed electrode modified with nanocomposite carbon black and gold nanoparticles. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, p. 8192–8199, 2016b.

CORTES, A. P. **Biossensores para dopamina: lacase imobilizada em polissacarídeo**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Londrina, 2008.

CROUZIER, T.; BOUDOU, T.; PICART, C. Polysaccharide-based polyelectrolyte multilayers. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 15, p. 417–426, 2010.

DEROCO, P. B.; LOURENCAO, B. C.; FATIBELLO-FILHO, O. The use of modified electrode with carbon black as sensor to the electrochemical studies and voltammetric determination of pesticide mesotrione. **Microchemical Journal**, v. 133, p. 188–194, 2017.

DESAI, P. B.; SRIVASTAVA, A. K. Determination of amiloride at Nafion–CNT-nanocomposite film sensor employing adsorptive stripping differential pulse voltammetry. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 169, p. 341–348, 2012.

DEVARAJ, M.; SARAVANAN, R.; DEIVASIGAMANI, R.; GUPTA, V. K.; GRACIA, F.; JAYADEVAN, S. Fabrication of novel shape Cu and Cu/Cu<sub>2</sub>O nanoparticles modified electrode for the determination of dopamine and paracetamol. **Journal of Molecular Liquids**, v. 221, p. 930–941, 2016.

DONNET, J. B.; BANSAL, R. C.; WANG, M. J. **Carbon black: science and technology**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1993.

EIRAS, C.; PASSOS, I. N. G.; BRITO, A. C. F.; SANTOS-JÚNIOR, J. R.; ZUCOLOTTI, V.; OLIVEIRA-JÚNIOR, O. N.; KITAGAWA, I. L.; CONSTANTINO, C. J. L.; CUNHA, H. N. Nanocompósitos eletroativos de poli-o-metoxianilina e polissacarídeos naturais. **Química Nova**, v. 30, p. 1158–1162, 2007.

EISELE, A. P. P.; CLAUSEN, D. N.; TARLEY, C. R. T.; DALL'ANTONIA, L. H.; SARTORI, E. R. Simultaneous square-wave voltammetric determination of paracetamol, caffeine and orphenadrine in pharmaceutical formulations using a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode. **Electroanalysis**, v. 25, p. 1734–1741, 2013.

FAN, Y.; LIU, J. H.; LU, H. T.; ZHANG, Q. Electrochemical behavior and voltammetric determination of paracetamol on Nafion/TiO<sub>2</sub>-graphene modified glassy carbon electrode. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 85, p. 289–292, 2011.

FLOROU, A. B.; PRODOMIDIS, M. I.; KARAYANNIS, M. I.; TZOUWARA-KARAYANNI, S. M. Flow electrochemical determination of ascorbic acid in real samples using a glassy carbon electrode modified with a cellulose acetate film bearing 2,6-dichlorophenolindophenol. **Analytica Chimica Acta**, v. 409, p. 113–121, 2000.

FOTOPOULOU, M. A.; IOANNOU, P. C. Post-column terbium complexation and sensitized fluorescence detection for the determination of norepinephrine, epinephrine and dopamine using high-performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 462, p. 179–185, 2002.

FRANÇA, E. **Produção de filmes automontados constituídos por polianilina associados ao polissacarídeo fúngico botriosferana**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Londrina, 2007.

GHOLIVAND, M. B.; AMIRI, M. Simultaneous detection of dopamine and acetaminophen by modified gold electrode with polypyrrole/azophloxine film. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 676, p. 53–59, 2012.

GIESE, E. C.; GASCON, J.; ANZELMO, G.; BARBOSA, A. M.; CUNHA, M. A. A.; DEKKER, R. F. H. Free-radical scavenging properties and antioxidant activities of botryosphaeran and some other  $\beta$ -D-glucans. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 125–130, 2015.

GILMARTIN, M. A. T.; HART, J. P. Novel, reagentless, amperometric biosensor for uric acid based on a chemically modified screen-printed carbon electrode coated with cellulose acetate and uricase. **Analyst**, v. 119, p. 833–840, 1994.

HABIBI, B.; JAHANBAKHSI, M.; POURNAGHI-AZAR, M. H. Simultaneous determination of acetaminophen and dopamine using SWCNT modified carbon-ceramic electrode by differential pulse voltammetry. **Electrochimica Acta**, v. 56, p. 2888–2894, 2011.

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

HASSAN, R. Y. A.; HABIB, I. H. I.; HASSAN, H. N. A. Voltammetric determination of lead (II) in medical lotion and biological samples using chitosan-carbon paste electrode. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 3, p. 935–945, 2008.

HEITMEIER, S.; BLASCHKE, G. Direct determination of paracetamol and its metabolites in urine and serum by capillary electrophoresis with ultraviolet and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 721, p. 93–108, 1999.

JANEGITZ, B. C.; BACCARIN, M.; RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.; DOS SANTOS, F. A.; OLIVEIRA, G. G.; MACHADO, S. A. S.; LANZA, M. R. V.; FATIBELLO-FILHO, O.; ZUCOLOTTI, V. The use of dihexadecylphosphate in sensing and biosensing. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 220, p. 805–813, 2015.

JANEGITZ, B. C.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H.; CAMPANA-FILHO, S. P.; FARIA, R. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Anodic stripping voltammetric determination of copper(II) using a functionalized carbon nanotubes paste electrode modified with crosslinked chitosan. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 142, p. 260–266, 2009.

JANEGITZ, B. C.; PAULIUKAITE, R.; GHICA, M. E.; BRETT, C. M. A.; FATIBELLO-FILHO, O. Direct electron transfer of glucose oxidase at glassy carbon electrode modified with functionalized carbon nanotubes within a dihexadecylphosphate film. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 158, p. 411–417, 2011.

KANNAN, A.; SEVVEL, R. A highly selective and simultaneous determination of paracetamol and dopamine using poly-4-amino-6-hydroxy-2-mercaptopyrimidine (Poly-AHMP) film modified glassy carbon electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 791, p. 8–16, 2017.

KEELEY, G. P.; MCEVOY, N.; NOLAN, H.; KUMAR, S.; REZVANI, E.; HOLZINGER, M.; COSNIER, S.; DUESBERG, G. S. Simultaneous electrochemical determination of dopamine and paracetamol based on thin pyrolytic carbon films. **Analytical Methods**, v. 4, p. 2048–2053, 2012.

KNOX, J. H.; JURAND, J. Determination of paracetamol and its metabolites in urine by high-performance liquid chromatography using reversed-phase bonded supports. **Journal of Chromatography A**, v. 142, p. 651–670, 1977.

KUTLUAY, A.; ASLANOGLU, M. An electrochemical sensor prepared by sonochemical one-pot synthesis of multi-walled carbon nanotube-supported cobalt nanoparticles for the simultaneous determination of paracetamol and dopamine. **Analytica Chimica Acta**, v. 839, p. 59–66, 2014.

LAUBE, N.; MOHR, B.; HESSE, A. Laser-probe-based investigation of the evolution of particle size distributions of calcium oxalate particles formed in artificial urines. **Journal of Crystal Growth**, v. 233, p. 367–374, 2001.

LIMA, D.; LOPES, L. C.; JESUS, C. G.; CALIXTO, C. M. F.; CALAÇA, G. N.; VIANA, A. G.; PESSÔA, C. A. Modificação de eletrodos de pasta de carbono com o polissacarídeo sulfatado porfirina: potenciais aplicações na determinação eletroanalítica de sulfonamidas. **Revista Virtual de Química**, v. 8, 2016.

LLORENT-MARTÍNEZ, E. J.; ŠATÍNSKÝ, D.; SOLICH, P.; ORTEGA-BARRALES, P.; MOLINA-DÍAZ, A. Fluorimetric SIA optosensing in pharmaceutical analysis: Determination of paracetamol. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, p. 318–321, 2007.

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

LU, S.; BAI, L.; WEN, Y.; LI, M.; YAN, D.; ZHANG, R.; CHEN, K. Water-dispersed carboxymethyl cellulose-montmorillonite-single walled carbon nanotube composite with enhanced sensing performance for simultaneous voltammetric determination of two trace phytohormones. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 19, p. 2023–2037, 2015.

MADRAKIAN, T.; HAGHSHENAS, E.; AFKHAMI, A. Simultaneous determination of tyrosine, acetaminophen and ascorbic acid using gold nanoparticles/multiwalled carbon nanotube/glassy carbon electrode by differential pulse voltammetric method. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 193, p. 451–460, 2014.

MALEKI, H.; COJOCARU, C. D.; BRETT, C. M. A.; JENKINS, G. M.; SELMAN, J. R. Changes in the electrochemical behavior of polymeric carbon induced by heat-treatment and doping with lithium ions. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 145, p. 721–730, 1998.

MIRANDA-NANTES, C. C. B. O.; FONSECA, E. A. I.; ZAIA, C. T. B. V.; DEKKER, R. F. H.; KHAPER, N.; CASTRO, I. A.; BARBOSA, A. M. Hypoglycemic and hypocholesterolemic effects of botryosphaeran from botryosphaeria rhodina MAMB-05 in diabetes-induced and hyperlipidemia conditions in rats. **Mycobiology**, v. 39, p. 187–193, 2011.

MUSAMEH, M.; WANG, J.; MERKOCI, A.; LIN, Y. Low-potential stable NADH detection at carbon-nanotube-modified glassy carbon electrodes. **Electrochemistry Communications**, v. 4, p. 743–746, 2002.

OLEFIROWICZ, T. M.; EWING, A. G. Dopamine concentration in the cytoplasmic compartment of single neurons determined by capillary electrophoresis. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 34, p. 11–15, 1990.

OLIVEIRA, G. G.; AZZI, D. C.; VICENTINI, F. C.; SARTORI, E. R.; FATIBELLO-FILHO, O. Voltammetric determination of verapamil and propranolol using a glassy carbon electrode modified with functionalized multiwalled carbon nanotubes within a

poly (allylamine hydrochloride) film. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 708, p. 73–79, 2013.

PIOVESAN, J. V.; LIMA, C. A.; SANTANA, E. R.; SPINELLI, A. Voltammetric determination of condensed tannins with a glassy carbon electrode chemically modified with gold nanoparticles stabilized in carboxymethylcellulose. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 240, p. 838–847, 2017.

PORTACCIO, M.; DI TUORO, D.; ARDUINI, F.; MOSCONE, D.; CAMMAROTA, M.; MITA, D. G.; LEPORE, M. Laccase biosensor based on screen-printed electrode modified with thionine–carbon black nanocomposite, for Bisphenol A detection. **Electrochimica Acta**, v. 109, p. 340–347, 2013.

PRETE, M. C.; OLIVEIRA, F. M.; TARLEY, C. R. T. Assessment on the performance of nano-carbon black as an alternative material for extraction of carbendazim, tebutiuron, hexazinone, diuron and ametryn. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 5, p. 93–102, 2017.

QUEIROZ, E. A. I. F.; FORTES, Z. B.; CUNHA, M. A. A.; BARBOSA, A. M.; KHAPER, N.; DEKKER, R. F. H. Antiproliferative and pro-apoptotic effects of three fungal exocellular  $\beta$ -glucans in MCF-7 breast cancer cells is mediated by oxidative stress, AMP-activated protein kinase (AMPK) and the Forkhead transcription factor, FOXO3a. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 67, p. 14–24, 2015.

SANGHAVI, B. J.; SRIVASTAVA, A. K. Adsorptive stripping differential pulse voltammetric determination of venlafaxine and desvenlafaxine employing Nafion–carbon nanotube composite glassy carbon electrode. **Electrochimica Acta**, v. 56, p. 4188–4196, 2011.

SARTORI, E. R.; VICENTINI, F. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Indirect determination of sulfite using a polyphenol oxidase biosensor based on a glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes and gold nanoparticles within a poly(allylamine hydrochloride) film. **Talanta**, v. 87, p. 235–242, 2011.

SHAHROKHIAN, S.; GHALKHANI, M. Glassy carbon electrodes modified with a film of nanodiamond–graphite/chitosan: Application to the highly sensitive electrochemical determination of Azathioprine. **Electrochimica Acta**, v. 55, p. 3621–3627, 2010.

SHAHROKHIAN, S.; GHALKHANI, M.; ADELI, M.; AMINI, M. K. Multi-walled carbon nanotubes with immobilised cobalt nanoparticle for modification of glassy carbon electrode: Application to sensitive voltammetric determination of thioridazine. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, p. 3235–3241, 2009.

SHARP, M.; PETERSSON, M.; EDSTRÖM, K. Preliminary determinations of electron transfer kinetics involving ferrocene covalently attached to a platinum surface. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 95, p. 123–130, 1979.

SILVA, T. A.; FATIBELLO-FILHO, O. Square-wave adsorptive anodic stripping voltammetric determination of ramipril using an electrochemical sensor based on nanostructured carbon black. **Analytical Methods**, v. 9, p. 4680–4687, 2017.

SILVA, T. R.; VIEIRA, I. C. A biosensor based on gold nanoparticles stabilized in poly(allylamine hydrochloride) and decorated with laccase for determination of dopamine. **Analyst**, v. 141, p. 216–224, 2016.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. **Princípios de Análise Instrumental**. 5ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SOUZA, D. M.; GARCIA-CRUZ, C. H. Produção fermentativa de polissacarídeos extracelulares por bactérias. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 25, p. 331–340, 2004.

SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Química Nova**, v. 26, p. 81–89, 2003.

SOUZA, M. F. B. Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise: uma breve abordagem. **Química Nova**, v. 20, p. 191–195, 1997.

SUPRUN, E. V.; ARDUINI, F.; MOSCONE, D.; PALLESCHI, G.; SHUMYANTSEVA, V. V.; ARCHAKOV, A. I. Direct electrochemistry of heme proteins on electrodes modified with didodecyldimethyl ammonium bromide and carbon black. **Electroanalysis**, v. 24, p. 1923–1931, 2012.

TALARICO, D.; ARDUINI, F.; AMINE, A.; MOSCONE, D.; PALLESCHI, G. Screen-printed electrode modified with carbon black nanoparticles for phosphate detection by measuring the electroactive phosphomolybdate complex. **Talanta**, v. 141, p. 267–272, 2015a.

TALARICO, D.; ARDUINI, F.; CONSTANTINO, A.; DEL CARLO, M.; COMPAGNONE, D.; MOSCONE, D.; PALLESCHIA, G. Carbon black as successful screen-printed electrode modifier for phenolic compound detection. **Electrochemistry Communications**, v. 60, p. 78–82, 2015b.

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, p. 377–384, 2010.

TOLEDO, R. A.; SANTOS, M. C.; CAVALHEIRO, E. T. G.; MAZO, L. H. Determination of dopamine in synthetic cerebrospinal fluid by SWV with a graphite-polyurethane composite electrode. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 381, p. 1161–1166, 2005.

UNITED STATES PHARMACOPOEIAL CONVENTION. **United States Pharmacopoeia**. Rockville, 2007.

VICENTINI, F. C.; RAVANINI, A. E.; FIGUEIREDO-FILHO, L. C. S.; INIESTA, J.; BANKS, C. E.; FATIBELLO-FILHO, O. Imparting improvements in electrochemical sensors: evaluation of different carbon blacks that give rise to significant improvement in the performance of electroanalytical sensing platforms. **Electrochimica Acta**, v. 157, p. 125–133, 2015.

WANG, H. Y.; SUN, Y.; TANG, B. Study on fluorescence property of dopamine and determination of dopamine by fluorimetry. **Talanta**, v. 57, p. 899–907, 2002.

WANG, J.; BONAKDAR, M.; PACK, M. M. Glassy carbon electrodes coated with cellulose acetate for adsorptive stripping voltammetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 192, p. 215–223, 1987.

WANG, Y.; LI, X.; CAO, W.; LI, Y.; LI, H.; DU, B.; WEI, Q. Ultrasensitive sandwich-type electrochemical immunosensor based on a novel signal amplification strategy using highly loaded toluidine blue/gold nanoparticles decorated KIT-6/carboxymethyl chitosan/ionic liquids as signal labels. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 61, p. 618–624, 2014.

WONG, A.; SANTOS, A. M.; FATIBELLO-FILHO, O. Simultaneous determination of paracetamol and levofloxacin using a glassy carbon electrode modified with carbon black, silver nanoparticles and PEDOT:PSS film. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 255, p. 2264–2273, 2018.

WU, K.; FEI, J.; HU, S. Simultaneous determination of dopamine and serotonin on a glassy carbon electrode coated with a film of carbon nanotubes. **Analytical Biochemistry**, v. 318, p. 100–106, 2003.

XIAO, F.; ZHAO, F.; LI, J.; YAN, R.; YU, J.; ZENG, B. Sensitive voltammetric determination of chloramphenicol by using single-wall carbon nanotube–gold nanoparticle–ionic liquid composite film modified glassy carbon electrodes. **Analytica Chimica Acta**, v. 596, p. 79–85, 2007.

XU, J.; LIU, W.; YAO, W.; PANG, X.; YIN, D.; GAO, X. Carboxymethylation of a polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* enhances its antioxidant activities in vitro. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, p. 227–234, 2009.

XU, Q.; MAO, C.; LIU, N. N.; ZHU, J. J.; SHENG, J. Direct electrochemistry of horseradish peroxidase based on biocompatible carboxymethyl chitosan–gold nanoparticle nanocomposite. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, p. 768–773, 2006.

YANG, G.; CAO, J.; LI, L.; RANA, R. K.; ZHU, J. J. Carboxymethyl chitosan-functionalized graphene for label-free electrochemical cytosensing. **Carbon**, v. 51, p. 124–133, 2013.

YIN, H.; MA, Q.; ZHOU, Y.; AI, S.; ZHU, L. Electrochemical behavior and voltammetric determination of 4-aminophenol based on graphene–chitosan composite film modified glassy carbon electrode. **Electrochimica Acta**, v. 55, p. 7102–7108, 2010.

ZANARDI, C.; FERRARI, E.; PIGANI, L.; ARDUINI, F.; SEEBER, R. Development of an Electrochemical Sensor for NADH Determination Based on a Caffeic Acid Redox Mediator Supported on Carbon Black. **Chemosensors**, v. 3, p. 118–128, 2015.