



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

ELETRODO QUIMICAMENTE MODIFICADO COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA ESTABILIZADAS EM HEPARINA APLICADO NA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO CLOROGÊNICO

ANA CRISTINA VALENÇA MORILLO

Profa Dra. IOLANDA CRUZ VIEIRA

Me. ALINE ALVES FREITAS

Florianópolis
Novembro/2017

Ana Cristina Valença Morillo

ELETRODO QUIMICAMENTE MODIFICADO COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA ESTABILIZADAS EM HEPARINA APLICADO NA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO CLOROGÊNICO

Iolanda Cruz Vieira

Aline Alves Freitas

Relatório apresentado ao Departamento de Química
da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial da disciplina de
Estágio II (QMC 5512)

Florianópolis
Novembro/2017

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a UFSC. Os momentos em que passei na universidade foram indescritíveis! Não tenho palavras para expressar o quanto foi vivido, aprendido e superado nestes últimos anos. Obrigada por todo apoio e suporte, sem isso a minha vinda para a universidade talvez teria sido inviável.

Aos meus pais Alfredo Morillo e Ana Valença, a minha imensa gratidão por vocês será eterna, não só por esse período de universidade, mas por toda a minha vida. Obrigada por acreditar em mim muitas vezes quando nem eu mesma acreditava. Grata pela paciência, pelo ombro amigo, pelos sermões, conselhos, comemorações e força. Eu amo vocês.

Aos meus irmãos Alfredo, Karina e Luiza, vocês são meus melhores amigos, saber que tenho vocês me faz nunca me sentir sozinha apesar da distância. Obrigada por todas as risadas, todas as brincadeiras, conselhos, preocupações, apoio e lealdade. Obrigada por ficarem chateados junto comigo quando eu estava triste, e por comemorarem juntos a minha felicidade. Vocês, assim como os nossos pais, são a minha base, a minha essência.

Ao meu namorado Lucas, obrigada por todo amor, paciência, dedicação e companheirismo. Obrigada pelos dias, tardes e noites de estudos. O que vivemos nesses últimos anos só nós sabemos, são momentos e sentimentos que não cabem em palavras.

A todos os meus antigos e novos amigos por todo o carinho, parcerias, loucuras, risadas e lágrimas. Mesmo em horas difíceis, vocês fizeram esses momentos parecerem mais fáceis e descontraídos. Gostaria de poder citar nomes, porém tenho certeza que cada um de vocês sabe o quanto foram importantes em cada momento da minha vida.

As meninas do laboratório: Rávila, Nicole, Aline e Taninha, somos uma verdadeira equipe. Obrigada por todo o apoio, suporte, amizade e desabafos. Obrigada por dividir frustrações e felicidades junto comigo, obrigada por cada uma de vocês serem tão especiais mesmo sendo todas tão diferentes. Só vocês entendem as dificuldades e as alegrias que passamos ali! Um obrigada especial a Aline pela coorientação, paciência, ensinamentos e amizade

A minha orientadora Iolanda Cruz Vieira, obrigada pela oportunidade, pelos ensinamentos e orientação. Você me ajudou mais do que imagina neste período me dando a oportunidade de bolsa e me oferecendo experiência em pesquisa.

A todos os professores que contribuíram com a minha formação acadêmica, não só me ensinando física, química e matemática, mas também me ensinando a me superar, acreditar e me descobrir. Todos têm uma importância e história nesses anos de departamento de química.

Finalmente, obrigada ao CNPq pela oportunidade de iniciação a pesquisa científica e ao suporte.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO LITERÁRIA	14
2.1 Eletrodos Quimicamente Modificados.....	14
2.2 Nanopartículas metálicas.....	15
2.2.1 Nanopartículas de Prata	15
2.3 Polímeros como estabilizadores de nanopartículas.....	16
2.3.1 Heparina.....	17
2.4 Compostos fenólicos.....	18
2.4.1 Ácido Clorogênico	19
2.5 Voltametria.....	20
3. OBJETIVOS	22
3.1 Objetivo geral.....	22
3.2 Objetivos específicos	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 Reagentes	23
4.2 Equipamentos.....	24
4.3 Síntese das AgNP-Hep.....	24
4.4 Preparação do eletrodo quimicamente modificado	25
4.5 Medidas eletroquímicas	25
4.6 Preparo da amostra e determinação do teor de ácido clorogênico.....	25
4.7 Método comparativo: Eletroforese Capilar	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1 Caracterização do nanomaterial	27
5.2 Resposta do eletrodo para quatro compostos diferentes.....	28
5.3 Princípio de funcionamento do sensor proposto.....	29
5.4 Estudo da contribuição da modificação na resposta do eletrodo.....	30
5.5 Caracterização eletroquímica	31
5.5.1 Estudos de impedância	31
5.5.2 Efeito da velocidade de varredura e área eletroativa	32
5.6 Otimização do método.....	34
5.6.1 Estudo da natureza e pH do eletrólito suporte	34

5.6.2 Escolha e otimização da técnica voltamétrica	38
5.6.3 Otimização dos parâmetros técnica voltamétrica	39
5.7 Desempenho analítico do eletrodo quimicamente modificado	41
5.7.1 Curva de calibração	41
5.7.2 Repetibilidade e reprodutibilidade	43
5.7.3 Estudo de recuperação	43
5.7.4 Determinação do teor de ácido clorogênico em amostra de café verde	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de aglomeração: (a) impedimento eletrostático, (b) impedimento estérico, (c) impedimento eletroestérico.	16
Figura 2. Estrutura química da heparina.	17
Figura 3. Reação química genérica de redução de espécies radicalares por compostos fenólicos.	18
Figura 4. Estrutura química do ácido clorogênico.	19
Figura 5. Representação de uma cela eletroquímica com três eletrodos.	20
Figura 6. Espectro de absorção no visível: (a) suspensão de AgNP-Hep e (b) solução de heparina (1,25% m/v).	27
Figura 7. Voltamogramas obtidos usando o AgNP-Hep-Nafion/GCE para diferentes compostos a partir da solução padrão de: (a) ácido ascórbico, (b) hidroquinona (c) ácido cafeico e (d) ácido clorogênico, na concentração de $1,47 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ em solução tampão Clark-Lubs (0,2 mol L ⁻¹ , pH2,2).	28
Figura 8. Representação esquemática da reação de oxi-redução do ácido clorogênico que ocorre na superfície do sensor proposto AgNP-Hep-Nafion/GCE.	29
Figura 9. Voltamogramas de onda quadrada para os eletrodos (a) GCE e (b) AgNP-Hep-Nafion/GCE, em solução tampão Clark-Lubs 0,2 mol L ⁻¹ contendo $1,47 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ de ácido clorogênico.	30
Figura 10. Curvas de EIS para GCE e AgNP-Hep-Nafion/GCE em solução KCl (1,0 mol L ⁻¹) contendo $5,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ de Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} , circuito aberto, 10 mV de amplitude e frequência entre 0,1 – 100000 Hz.	31
Figura 11. Gráficos de log ip vs log v, sendo ipa= corrente do pico anódico e ipc= corrente do pico catódico. Onde (A) AgNP-Hep-Nafion/GCE e (B) GCE obtidos em solução de Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} na concentração de $5,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹	32
Figura 12. Voltamogramas cíclicos e gráficos i vs v ^{1/2} obtidos a partir da solução de Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} na concentração de $5,0 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ , e nos intervalos de 10 a 100 mV s ⁻¹ onde (A) e (B) referem-se ao AgNP-Hep-Nafion/GCE e (C) e (D) referem-se ao GCE.	33
Figura 13. (A) Efeito do eletrólito suporte/pH sobre a resposta do AgNP-Hep-Nafion/GCE utilizando: (a) solução tampão fosfato (0,1 mol L ⁻¹ , pH 7) e (b) solução de ácido clorogênico $1,47 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ em solução tampão fosfato (0,1 mol L ⁻¹ , pH 7) por SWV. Inserido: resposta do GCE nas mesmas condições. (B) Resposta relativa.	35
Figura 14. (A) Efeito do eletrólito suporte/pH sobre a resposta do AgNP-Hep-Nafion/GCE utilizando: (a) solução tampão fosfato (0,1 mol L ⁻¹ , pH 8) e (b) solução de ácido clorogênico $1,47 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ em solução tampão fosfato (0,1 mol L ⁻¹ , pH 8) por SWV. Inserido: resposta do GCE nas mesmas condições. (B) Resposta relativa.	36
Figura 15. (A) Efeito do eletrólito suporte/pH sobre a resposta do AgNP-Hep-Nafion/GCE utilizando: (a) solução tampão acetato (0,1 mol L ⁻¹ , pH 5) e (b)	

solução de ácido clorogênico $1,47 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5) por SWV. Inserido: resposta do GCE nas mesmas condições. (B) Resposta relativa.....	37
Figura 16. (A) Efeito do eletrólito suporte/pH sobre a resposta do AgNP-Hep-Nafion/GCE utilizando: (a) solução Clark-Lubs ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 2,2) e (b) solução de ácido clorogênico $1,47 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em solução Clark-Lubs ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 2,2). Inserido: resposta do GCE nas mesmas condições. (B) Resposta relativa.....	38
Figura 17. Estudo das técnicas voltamétricas: (a) LSV; (b) DPV; (c) SWV para o AgNP-Hep-Nafion/GCE em ácido clorogênico na concentração de $1,47 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão Clark-Lubs ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 2,2).....	39
Figura 18. Estudo da otimização dos parâmetros da SWV: (A) amplitude, (B) incremento; (C) frequência para o AgNP-Hep-Nafion/GCE utilizando $1,47 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido clorogênico em tampão Clark-Lubs ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 2,2).....	40
Figura 19. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando o eletrodo proposto em solução tampão clark-lubs ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$; pH 2,2) contendo ácido clorogênico nas seguintes concentrações: (a) $1,99 \times 10^{-6}$; (b) $3,98 \times 10^{-6}$; (c) $7,94 \times 10^{-6}$; (d) $1,19 \times 10^{-5}$; (e) $1,57 \times 10^{-5}$; (f) $1,96 \times 10^{-5}$; (g) $2,34 \times 10^{-5}$ e (h) $2,72 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em frequência de 100 Hz, amplitude de 30 mV e incremento de 50 mV. (B) Curva de calibração para o ácido clorogênico.....	42
Figura 21. Curva de calibração por eletroforese capilar utilizando a solução padrão de CGA ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e PI (TBS, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$).....	45
Figura 22. (A) Eletroferograma obtido da amostra de café verde, onde: (a) TBS e (b) CGA. Condições experimentais: eletrólito constituído por TBS, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; injeção hidrodinâmica 50 mbar por 5s; tensão aplicada 30 kV com polaridade positiva e detecção direta do analito identificado pelo espectro UV/VIS em 340 nm.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros de otimização do método.....	41
Tabela 2. Comparação de diferentes CME aplicados na determinação de CGA.	43
Tabela 3. Parâmetros analíticos do método proposto para determinação de ácido clorogênico.	44
Tabela 4. Determinação de ácido clorogênico em amostra de café verde comercial usando método CE e o eletrodo quimicamente modificado proposto.	46

LISTA DE ACRÔNIMOS E ABREVIATURAS

A - Ampère

A - Área superficial do eletrodo

AgNP – Nanopartículas de prata (*silver nanoparticles*)

C - Concentração da espécie eletroativa

CE – Eletroforese capilar (*capillary electrophoresis*)

CGA – Ácido clorogênico (*chlorogenic acid*)

CME – Eletrodo quimicamente modificado (*chemically modified electrode*)

CV – Voltametria cíclica (*cyclic voltammetry*)

D - Coeficiente de difusão da espécie eletroativa

DPV – Voltametria de pulso diferencial (*differential pulse voltammetry*)

EIS – Espectroscopia de impedância eletroquímica (*electrochemical impedance spectroscopy*)

GCE – Eletrodo de carbono vítreo (*glassy carbon electrode*)

Hep - Heparina

i_p - Corrente de pico

i_{pa} - Corrente de pico anódica

i_{pc} - Corrente de pico catódica

LOD – Limite de detecção (*limit of detection*)

LOQ – Limite de quantificação (*limit of quantification*)

LSV – Voltametria de varredura linear (*linear sweep voltammetry*)

n – Número de elétrons transferidos na reação eletroquímica

NPs – Nanopartículas metálicas

RSD – Desvio-padrão relativo (*relative standard deviation*)

SWV – Voltametria de onda quadrada (*square-wave voltammetry*)

TBS – Tetraborato de sódio (*sodium tetraborate*)

UV-Vis – Espectroscopia de transmissão na região Ultravioleta-visível

Z' – Componente real da impedância

Z'' – Componente imaginária da impedância

RESUMO

Neste trabalho foi preparado um eletrodo quimicamente modificado, preparado pelo gotejamento de 2,0 μL de uma suspensão contendo nanopartículas de prata estabilizadas em heparina (AgNP-Hep) e nafion (75:25%, v/v) sobre a superfície de um eletrodo de carbono vítreo (GCE). O eletrodo proposto (AgNP-Hep-nafion/GCE) foi aplicado com sucesso na determinação do teor de ácido clorogênico em amostra de café verde. A voltametria de onda quadrada (SWV) foi utilizada como técnica eletroquímica, e para melhor desempenho, seus parâmetros foram otimizados em 100 Hz de frequência, 30 mV de amplitude e 5 mV de incremento. Também foi investigada a faixa de pH e a natureza do eletrólito suporte, sendo definido como eletrólito uma solução tampão Clark-Lubs ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$) em pH 2,2. Sob as condições otimizadas, construiu-se uma curva de calibração a partir da corrente de pico resultante vs. concentração de CGA, apresentando linearidade em um intervalo de concentração de $1,99 \times 10^{-6}$ a $2,72 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ($r^2 = 0,992$), com limite de detecção de $1,80 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e quantificação de $5,51 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. O eletrodo proposto foi aplicado na determinação de CGA em amostra de chá verde utilizando o método de adição de padrão e os resultados obtidos são concordantes com os encontrados usando a técnica de eletroforese capilar empregada como método comparativo. O estudo de recuperação variou de 98,0 a 102%, indicando boa exatidão do método. O AgNP-Hep-nafion/GCE demonstrou elevada sensibilidade e adequada repetibilidade, mostrando ser uma ferramenta útil para a detecção simples e rápida do teor de ácido clorogênico em amostra de café verde.

Palavras-chave: nanopartículas, eletrodo quimicamente modificado, ácido clorogênico.

1 INTRODUÇÃO

As técnicas voltamétricas são amplamente utilizadas para análises de diversos compostos presentes em amostras industriais, medicinais, alimentícias, ambientais, entre outros. As análises consistem em medidas amperométricas, realizadas em uma célula eletroquímica contendo um eletrólito suporte e três eletrodos (eletrodo de trabalho, eletrodo de referência e contra eletrodo) conectados a um potenciostato para a aquisição dos dados. Devido a características como baixo custo e alta sensibilidade, estas técnicas tornam-se de grande relevância industrial e econômica.

Um eletrodo bastante utilizado em técnicas voltamétricas é o de carbono vítreo, por sua facilidade de manejo e possibilidade de modificação química da sua superfície com diferentes materiais como, por exemplo, nanopartículas metálicas, enzimas e líquidos iônicos. Materiais nanoestruturados tem conquistado interesse entre pesquisadores, por apresentarem propriedades físicas e químicas únicas. Nanopartículas de prata, por exemplo, podem ser citadas como um nanomaterial muito utilizado para esta finalidade, pois apresentam excelente condutividade elétrica. Porém, nanopartículas metálicas tendem a sofrer coalescência devido a sua grande energia superficial, e, por isso, é necessário utilizar em sua síntese estabilizantes como, por exemplo, líquidos iônicos, surfactantes ou polímeros. Os polímeros podem estabilizar as partículas através de repulsão estérica, eletrostática, e eletroestérica como no caso de polieletrólitos como a heparina.

Eletrodos quimicamente modificados são empregados na análise de uma gama de compostos, desde princípios ativos de fármacos até antioxidantes em matrizes alimentícias, como os compostos fenólicos. Estes compostos encontram-se, em sua maioria, na natureza e podem exercer efeitos preventivos e/ou curativos em distúrbios fisiológicos. Um dos compostos fenólicos de grande abundância em alimentos é o ácido clorogênico que, por ter propriedades anticancerígenas e antibacterianas, sugere ser um composto relevante à pesquisa medicinal e nutricional. O café verde é um alimento capaz de trazer diversos benefícios para o corpo humano. Este possui altas quantidades de CGA, capaz de interagir com o organismo produzindo efeito

anti-hipertensivo, efeito inibitório na acumulação de gordura e peso corporal e modulação do metabolismo da glicose.

Assim, este trabalho tem como principal proposta o desenvolvimento de um eletrodo quimicamente modificado, a partir da modificação de um eletrodo de carbono vítreo com nanopartículas de prata estabilizadas em heparina, para a determinação de ácido clorogênico em amostra de café verde.

2. REVISÃO LITERÁRIA

2.1 Eletrodos Quimicamente Modificados

O eletrodo (conhecido comumente como polo) é um dispositivo utilizado para conectar um circuito elétrico em seu terminal. Este, deve ser constituído por um material condutor de eletricidade como, por exemplo, um metal, grafite ou outro. Seu objetivo é proporcionar uma transferência de elétrons entre o circuito e o meio no qual está inserido. Este dispositivo é utilizado na eletroquímica para análises de uma gama de compostos.¹

A sensibilidade e a seletividade dos eletrodos podem ser melhoradas a partir da modificação da sua superfície, possibilitando a aplicação em diversas áreas do conhecimento, tais como ambiental, alimentícia, clínica e industrial.^{1,2} O termo eletrodo quimicamente modificado (*chemically modified electrode* - CME), foi introduzido em 1975 por Murray e colaboradores³ para designar eletrodos com espécies quimicamente ativas (por exemplo: polímeros, nanopartículas metálicas, nanocompósitos, líquidos iônicos, entre outros) convenientemente imobilizadas em suas superfícies com o objetivo de pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo/solução.³ Além disso, os CMEs também apresentam características vantajosas como baixo custo, facilidade na construção e possibilidade de miniaturização o que os difere de instrumentos utilizados em outros métodos como os cromatográficos e espectrofotométricos, por exemplo.⁴

A escolha de um eletrodo-base é muito importante no processo de modificação, pois este deve apresentar características no qual a modificação seja favorecida. Nesse sentido, o eletrodo de carbono vítreo (*glassy carbon electrode* - GCE) é largamente empregado como material eletródico por sua boa condutividade elétrica, estabilidade térmica e robustez,⁵ tornando-o de grande interesse para modificações como, por exemplo, recobrimento da superfície com filmes de nanopartículas metálicas.

2.2 Nanopartículas metálicas

O estudo de materiais em nanoescala tem ganhado grande visibilidade, particularmente no que diz respeito às nanopartículas metálicas (especialmente ouro, prata e platina). Uma nanopartícula é um material que possui ao menos uma das dimensões em ordem nanométrica (10^{-9}). A aplicação destes compostos em eletroanálise é uma área de pesquisa em constante expansão, visto que estas possuem propriedades muito específicas, tais como propriedades ópticas, magnéticas, elétricas e atividade catalítica, que são dependentes do tamanho nanométrico.^{6,7} Por apresentarem estas propriedades, estes materiais vem sendo muito empregados na construção de sensores, pois melhoram a sensibilidade, a seletividade, a condutividade, a relação sinal/ruído e a transferência de elétrons nesses dispositivos.⁸

2.2.1 Nanopartículas de Prata

A prata é um metal utilizado desde os primórdios em alguns utensílios e ornamentos, e muito usada até hoje em jóias e outros objetos. A prata pode ser encontrada na natureza em rochas e geralmente de forma impura principalmente com a presença de chumbo e cobre. É considerada nobre devido à sua estabilidade, ou baixa reatividade, que é conferida pela energia de ionização deste elemento. Além disso, a prata é um metal de coloração branca que possui características de alta ductibilidade, boa estabilidade quando exposto ao ar e a água.¹¹

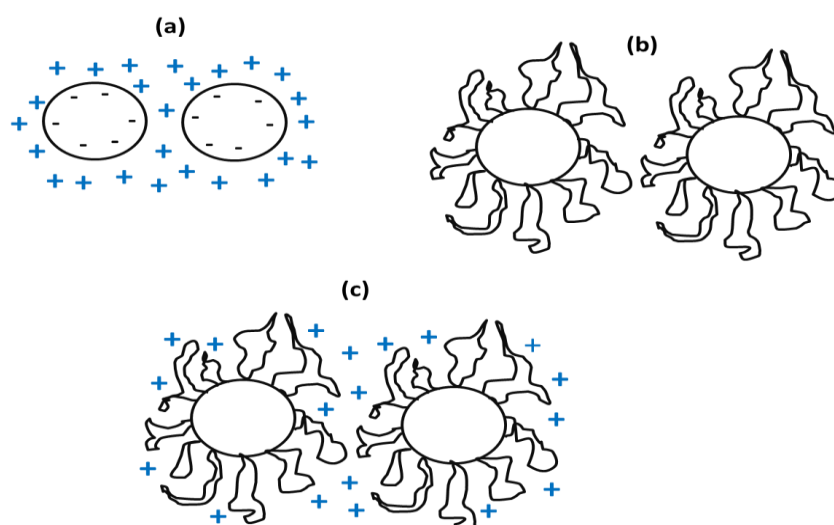
Nanopartículas de prata (AgNP), na maioria hidrossóis, são materiais inorgânicos atraentes não só por causa de suas aplicações em fotografia,⁹ diagnósticos de doenças a partir da detecção de tumor¹⁰ e sua potente atividade antimicrobiana,¹¹ mas também na utilização em catálise,¹² detecção biomolecular,¹³ e no desenvolvimento de novos sensores e biossensores.¹⁴ É conhecido também, que a prata é o melhor condutor elétrico e térmico entre os metais, com isso, as AgNPs podem ajudar mais eficientemente na transferência de elétrons de uma reação redox, do que outras nanopartículas metálicas.^{11,15}

2.3 Polímeros como estabilizadores de nanopartículas

Em solução, as NPs são termodinamicamente instáveis, uma vez que tendem a formar aglomerados durante o processo de preparação, devido as interações partícula-partícula, o que implicaria na perda das propriedades de interesse que estão relacionadas ao tamanho nanométrico. O controle para a obtenção de dispersões coloidais estáveis é crítico e requer cuidado para que não ocorra alteração nas propriedades físico-químicas das nanopartículas formadas. Uma forma eficaz para que as nanopartículas não sofram o processo da aglomeração, é a utilização de estabilizadores, que permitem minimizar ou evitar este processo.^{16,17}

Dentre os estabilizadores, podem ser destacados polímeros e biopolímeros, surfactantes, líquidos iônicos, dentre outros, que são moléculas capazes de evitar a aglomeração por impedimento estérico (devido a sua grande estrutura), impedimento eletrostático (devido à repulsão de cargas) ou ainda pela combinação dos dois casos, por impedimento eletroestérico (como os polieletrólitos, exemplo a heparina).¹⁸ Na Figura 1 pode ser visualizado os tipos de aglomeração citadas.

Figura 1. Tipos de aglomeração: (a) impedimento eletrostático, (b) impedimento estérico, (c) impedimento eletroestérico.

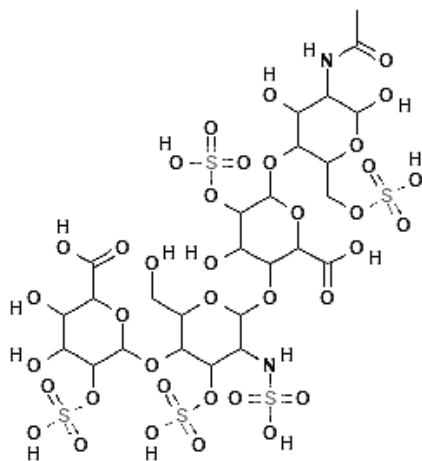


Além de estabilizadores de nanopartículas, os polímeros são utilizados em eletrodos quimicamente modificados, com o objetivo de fixar o filme da suspensão de por exemplo, nanopartículas metálicas, à sua superfície. O nafion é um fluoropolímero-copolímero que pode ser utilizado para esta função pois, durante a secagem do filme, esse copolímero sofre um processo de aglutinação, sendo portanto capaz de fixar a modificação na superfície do eletrodo.

2.3.1 Heparina

A heparina (Figura 2) é um polissacarídeo sulfatado de origem natural com caráter aniônico por conta das ressonâncias ocorridas no átomo de enxofre. É muito utilizado como um anticoagulante agindo através da formação de um complexo com ação antitrombina.¹⁹ A heparina também é usada na síntese de nanopartículas (especialmente ouro e prata), pois, por ser um polieletrólito (polímeros com grupos ionizáveis ao longo da cadeia, classificados em aniônicos e catiônicos de acordo com seu grupo funcional), atua no controle da nucleação, estabilização e no tamanho de NPs, por impedimento estérico e elétrico.²⁰ NPs estabilizadas em heparina são empregadas no desenvolvimento de sensores e biosensores, aplicado na detecção de compostos fenólicos.²¹

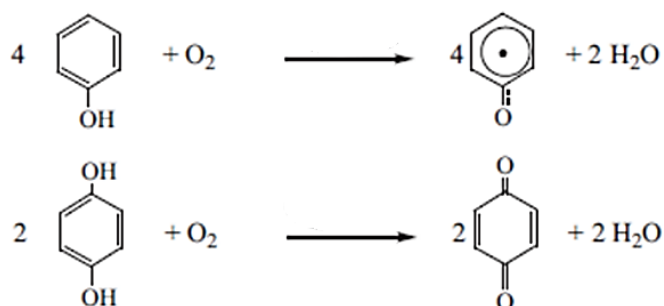
Figura 2. Estrutura química da heparina.



2.4 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são substâncias amplamente distribuídas na natureza (mais de 8000 compostos fenólicos já foram detectados em plantas). Esses compostos apresentam, em sua estrutura, vários grupos benzênicos, tendo como substituintes grupamentos hidroxilas. Uma das características mais importantes dos compostos fenólicos é sua inclusão na categoria de interruptores de radicais livres, sendo muito eficientes na prevenção da autoxidação. Os antioxidantes fenólicos interagem, preferencialmente, com o radical peroxil na etapa da autoxidação por possuir menor energia do que outros radicais, fato que favorece a abstração do seu hidrogênio.^{22,23} A Figura 3 mostra a reação antioxidante, de forma generalizada, para compostos fenólicos.

Figura 3. Reação química genérica de redução de espécies radicalares por compostos fenólicos.

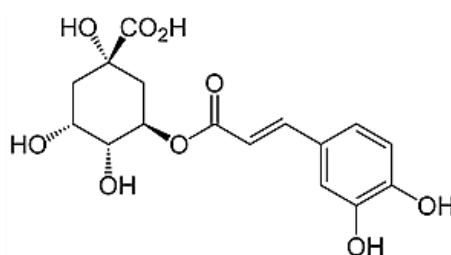


Os compostos fenólicos apresentam uma grande diversidade e dividem-se em flavonóides (polifenóis) e não-flavonóides (fenóis simples ou ácidos). Os ácidos fenólicos são divididos em dois grupos: o primeiro é composto pelos ácidos benzóicos, e o segundo é formado pelos ácidos cinâmicos. Neste último, pode-se exemplificar o ácido clorogênico, encontrado em grande quantidade e com significativa atividade antioxidante em alimentos.²⁴

2.4.1 Ácido Clorogênico

O ácido clorogênico (CGA) é um éster formado a partir de ácidos cinâmicos e ácido quínico e também é conhecido como ácido 5-O-cafeoilquínico (5-CQA), forma mais comum, ou 3-CQA, como pode ser visto na Figura 4.²⁵

Figura 4. Estrutura química do ácido clorogênico.



O ácido clorogênico é um dos mais abundantes polifenóis da dieta humana, é um grupo de metabólitos secundários fenólicos produzidos por certas espécies de plantas e em especial, um componente importante do café, especialmente do café verde. Evidências de acumulação demonstraram que o CGA exibe muitas propriedades biológicas, incluindo atividades antibacterianas, antioxidantes e anticancerígenas. Recentemente, as funções e aplicações da CGA, particularmente em relação ao metabolismo da glicose e dos lipídios, foram destacadas em campos biológicos e médicos.²⁶

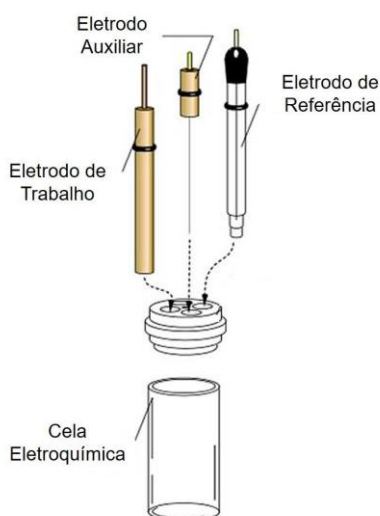
Um exemplo de alimento que contém ácido clorogênico em sua composição é o café e em especial, o café verde. Em forma de cápsulas, o café verde surgiu no mercado como uma ferramenta no auxílio da perda de peso. Por não ser um grão torrado, possui altas quantidades de ácido clorogênico (elemento que se perde no processo de torrefação). O CGA impede que o organismo utilize o açúcar dos alimentos ingeridos como fonte de energia. Assim, o corpo é obrigado a retirar essa energia do próprio estoque de gordura, tornando-o interessante para aplicações nutricionais.

Desta forma, desenvolver novos sensores, sensíveis, rápidos e de baixo custo, utilizando técnicas voltamétricas para detecção de CGA em diferentes tipos de amostras é de grande importância.

2.5 Voltametria

A voltametria é um método eletroanalítico, onde as informações qualitativas e quantitativas de uma espécie química são obtidas a partir do registro de curvas corrente-potencial, que se baseia nos fenômenos que ocorrem na interface entre a superfície do eletrodo de trabalho e a camada fina de solução adjacente a essa superfície.²⁷ Neste método, é utilizado geralmente uma cela eletroquímica composta por três eletrodos: eletrodo de trabalho, eletrodo de referência e eletrodo auxiliar, como mostra a Figura 5.

Figura 5. Representação de uma cela eletroquímica com três eletrodos.



Nessa técnica, as informações sobre o analito são obtidas por meio da medição da magnitude da corrente elétrica que surge entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar ao se aplicar uma diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência. O potencial é aplicado entre os dois eletrodos em forma de varredura, isto é, variando-o a uma velocidade constante em função do tempo. A curva corrente vs. potencial obtida é chamada de voltamograma.²⁷

A voltametria de onda quadrada (*square wave voltammetry* - SWV) é uma das técnicas de pulso mais rápidas e sensíveis. O limite de detecção pode ser comparado aos das técnicas cromatográficas e espectroscópicas. Além disto, por tratar-se de uma técnica de pulso, a corrente faradaica (que é a corrente de interesse) pode ser coletada em um intervalo de tempo adequado para que a contribuição da corrente capacitiva (corrente indesejada) seja minimizada.^{27,28} O uso de eletrodos quimicamente modificados associado a este tipo de técnica, pode tornar a metodologia proposta mais sensível.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo desenvolver um CME, a partir da modificação da superfície de um eletrodo de carbono vítreo (GCE) com um filme de nanopartículas de prata estabilizadas em heparina e nafion (AgNP-Hep-Nafion) e aplicar na determinação de ácido clorogênico em amostra de café verde.

3.2 Objetivos específicos

- Sintetizar nanopartículas de prata estabilizadas em heparina e nafion (AgNP-Hep-Nafion);
- Caracterizar as AgNP-Hep por espectroscopia UV-VIS;
- Estudar o efeito da velocidade de varredura e área eletroativa do eletrodo quimicamente modificado e comparar os resultados com o eletrodo sem modificação;
- Investigar a contribuição das AgNP-Hep-Nafion sobre o desempenho analítico do eletrodo, em comparação com o eletrodo sem modificação, através das técnicas voltamétricas e espectroscopia de impedância eletroquímica;
- Otimizar as condições experimentais do método de SWV, tais como: pH do eletrólito suporte, desempenho e otimização dos parâmetros das técnicas voltamétricas;
- Estudar o desempenho do eletrodo proposto e construir uma curva de calibração para o ácido clorogênico;
- Realizar estudos de repetibilidade entre medidas e entre eletrodos;
- Aplicar o eletrodo na determinação do teor de ácido clorogênico em amostra de café verde através de uma curva de adição de padrão e comparar os resultados com os obtidos com a técnica de eletroforese capilar.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes

Soluções tampão Clark-Lubs na concentração $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas utilizando cloreto de potássio (Vetec) e ácido clorídrico (Sigma-Aldrich) resultando em pH de 2,2.

Solução tampão acetato na concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada usando-se uma mistura de acetato de sódio (Sigma-Aldrich) e ácido acético (Vetec). O ajuste do pH 5,0 desta solução foi realizado a partir da adição de hidróxido de sódio ou ácido acético (Sigma-Aldrich).

Soluções tampão fosfato na concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas usando uma mistura de fosfato dibásico (Vetec) e fosfato monobásico (Vetec). O ajuste do pH (6,0 a 8,0) destas soluções foi realizado com ácido fosfórico ou hidróxido de sódio (Sigma-Aldrich).

As soluções das substâncias, ácido cafeico (Fluka), ácido ascórbico (Sigma-Aldrich), hidroquinona (Sigma-Aldrich) e ácido clorogênico (Sigma-Aldrich) na concentração $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, empregadas como padrão analítico na avaliação da resposta do eletrodo proposto, foram recém-preparadas antes de cada estudo.

Soluções de heparina (1,25%) foram feitas usando heparina sódica (Bioiberica). As soluções de nitrato de prata na concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas utilizando nitrato de prata - P.A - tipo ACS (Cennabras).

Soluções de borohidreto de sódio (Sigma-Aldrich) foram preparadas na concentração $0,02 \text{ mol L}^{-1}$.

As soluções de ferrocianeto e ferrocianato de potássio, na concentração $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas utilizando uma mistura de hexacianoferrato(III) de potássio (Sigma-Aldrich) e hexacianoferrato(II) de potássio (Sigma-Aldrich) que foi diluída em uma solução $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de cloreto de potássio (Vetec).

A amostra de café verde foi obtida em um mercado local de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

4.2 Equipamentos

As medidas eletroanalíticas foram realizadas em um Potenciostato/Galvanostato Autolab PGSTAT101 conectado a um computador contendo o *software* de processamento de dados NOVA, versão 1.10, e uma célula de vidro com capacidade aproximada de 15 mL, com tampa contendo orifícios circulares para encaixe dos eletrodos e adição das soluções.

Foi utilizado um agitador magnético da marca HI 190M (HANNA instruments) para auxiliar na homogeneização da solução antes das medidas.

As medidas de pH foram realizadas empregando um pHmetro da Micronal modelo B-475 com um eletrodo de vidro combinado.

Os experimentos de espectroscopia de impedância eletroquímica foram realizados em um potenciostato Autolab PGSTAT128N (Eco Chemie) sendo o *software* Nova 1.10 utilizado para coletar e tratar os dados obtidos.

Um espectrofotômetro Agilent Technologies modelo Cary 60 e cubeta de vidro (1,00 cm de caminho óptico) foram usados para a identificação das nanopartículas de prata.

As medidas analíticas para o método de comparação foram feitas no equipamento de eletroforese capilar, Agilent Technologies, modelo HCE^{3D}, utilizando uma coluna de sílica fundida.

4.3 Síntese das AgNP-Hep

A síntese das AgNP-Hep foi realizada com base na proposta de Huang H. *et. al.*¹⁸: primeiramente preparou-se uma solução de heparina 1,25% m/v e uma solução de nitrato de prata 0,1 mol L⁻¹. Em um béquer, foram adicionados 10 mL da solução do polímero e a esta solução foi adicionado 100 µL de AgNO₃. A mistura ficou sob agitação por 20 min. Na sequência, foi adicionado 200 µL de solução de NaBH₄ (0,02 mol L⁻¹) deixando sob agitação por 30 min.

Após a síntese, verificou-se uma alteração de coloração da solução de prata/heparina (incolor) para uma coloração amarela/marrom, logo após a adição do agente redutor (NaBH₄), consistindo em um indício da formação de nanopartículas.^{1,2}

4.4 Preparação do eletrodo quimicamente modificado

A primeira etapa da construção do eletrodo proposto consiste na limpeza manual da superfície do GCE com suspensão de alumina 0,3 μm (Arotec) em um feltro. Na sequência, o eletrodo foi lavado com água deionizada e preparado a partir do gotejamento de 2,0 μL de uma suspensão contendo AgNP-Hep e nafion (75:25%, v/v) na superfície do eletrodo. Esta suspensão foi preparada a partir de 100 μL de AgNP-Hep e 35 μL de nafion (0,1 mol L⁻¹) em um eppendorf. A solução de nafion foi adicionada para fixar as nanopartículas na superfície do eletrodo. Assim, o eletrodo proposto (AgNP-Hep-Nafion/GCE) foi colocado em dessecador a vácuo para a secagem do filme.

4.5 Medidas eletroquímicas

As medidas voltamétricas foram obtidas em uma cela eletroquímica contendo três eletrodos: o AgNP-Hep-Nafion/GCE como eletrodo de trabalho, um eletrodo Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) como referência e uma placa de platina como eletrodo auxiliar. Foram adicionados a célula eletroquímica, 10 mL do eletrólito suporte (tampão Clark-Lubs 0,2 mol L⁻¹, pH 2,2) juntamente com alíquotas da solução padrão dos compostos fenólicos escolhidos (ácido cafeico, ácido ascórbico, hidroquinona e ácido clorogênico). A célula foi submetida à agitação por 60 s para homogeneização da solução e em seguida os voltamogramas foram registrados.

O estudo de impedância eletroquímica foi realizado com um sistema de três eletrodos (como descrito anteriormente) em uma célula eletroquímica usando solução de Fe(CN)₆³⁻ (5,0 x 10⁻³ mol L⁻¹) como sonda eletroquímica em circuito aberto com 10 mV de amplitude e frequência entre 0,1 – 100000 Hz.

4.6 Preparo da amostra e determinação do teor de ácido clorogênico

Inicialmente, pesou-se em um béquer duas cápsulas de café verde (500 mg/cápsula), adquiridas comercialmente em uma farmácia localizada em Florianópolis (Santa Catarina, Brasil). Adicionou-se 25 mL de água destilada à amostra contida no béquer. Sob agitação e em temperatura de 35 °C, foi

deixado por duas horas para que a gelatina da cápsula estivesse completamente dissolvida, e a solução devidamente misturada. Após esse período, a solução foi colocada em tubos de ensaio e em seguida centrifugada até a devida separação do sólido/líquido. A solução foi armazenada em um frasco âmbar sob refrigeração, para ser utilizada na determinação do teor de ácido clorogênico. Foi empregado o método de adição de padrão para a quantificação do composto fenólico (CGA), onde uma alíquota de 5,0 μL da amostra de café verde foi adicionada na célula eletroquímica, contendo eletrólito suporte, solução tampão Clark-Lubs (0,2 mol L^{-1} ; pH 2,2), sendo feitas sucessivas adições de alíquotas de solução padrão de CGA $1,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} .

4.7 Método comparativo: Eletroforese Capilar

O método comparativo de eletroforese capilar²⁹, foi executado para a determinação de ácido clorogênico em comparação com os dados obtidos com o AgNP-Hep-Nafion/GCE. Primeiramente, foi construída uma curva de calibração externa, onde foram misturadas alíquotas de 150 μL a 1,2 mL de solução padrão de CGA $1,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} (totalizando 5 pontos de calibração), e 150 μL de padrão interno (TBS, 0,1 mol L^{-1}), em seguida avolumado em um vial de 750 μL com água deionizada. Para as medidas da amostra o mesmo procedimento foi realizado, adicionando 600 μL de amostra de café verde e 150 μL de padrão interno (TBS, 0,1 mol L^{-1}).

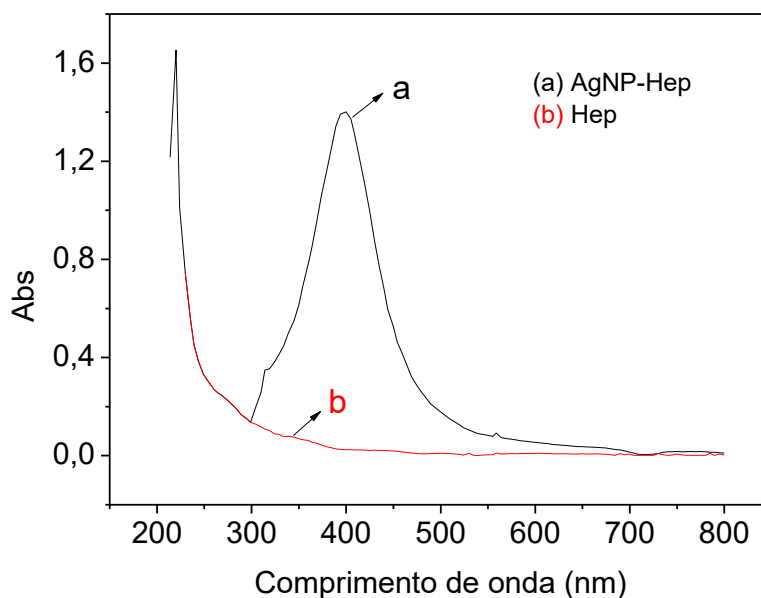
O método foi realizado da seguinte forma: as soluções padrão e amostra foram introduzidas a partir do “inlet” e injetadas hidrodinamicamente a 50 mbar por 5 s com pressão reversa. Foi aplicada uma tensão de separação de 30 kV, em polaridade positiva do lado da injeção. No começo de cada sessão de trabalho o capilar foi condicionado a 25 °C e lavado com uma solução de NaOH (1 mol L^{-1}) por 10 minutos, seguido de uma lavagem com água deionizada por mais 10 minutos e finalmente com o padrão interno (TBS, 0,1 mol L^{-1}) por 10 minutos. O comprimento de onda (λ) selecionado para a detecção no UV foi de 340 nm para o ácido clorogênico e 300 nm para o padrão interno.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do nanomaterial

Para confirmar a eficácia da síntese das nanopartículas e a sua presença no meio, foram realizadas análises, em duplicata, utilizando a técnica de espectroscopia UV-VIS³⁰. Essa técnica, permite a seleção de um comprimento de onda de radiação específico. Essa radiação atravessa o analito, e o aparelho mede o grau de absorção deste, no determinado comprimento de onda. O procedimento foi empregado com o objetivo de obter informações da absorção das nanopartículas de prata e comparar o comprimento de onda (λ) com o valor da literatura (400 nm) das AgNPs. Esse valor está associado a coloração das nanopartículas de prata, que foi observada durante sua síntese, uma solução inicialmente incolor, passou para uma coloração amarela/marrom após a reação de redução utilizando uma solução de borohidreto de sódio $0,02 \text{ mol L}^{-1}$. Também foi efetuado um estudo com o polímero estabilizador (heparina), para garantir que este não interfere na banda de absorção da nanopartícula. Para assegurar melhor resolução do espectro, as nanopartículas foram diluídas em 1:1. A Figura 6 mostra o espectro de absorção obtido a partir da técnica, as nanopartículas de prata revelaram-se em uma absorção em 401 nm, obtendo-se êxito no experimento, sendo a banda obtida um indicativo da formação de AgNPs através da metodologia proposta.

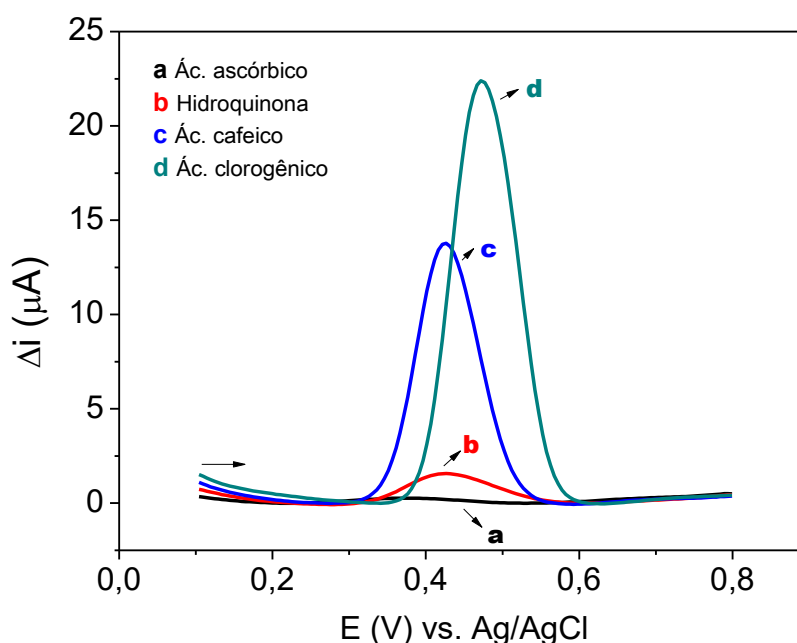
Figura 6. Espectro de absorção no visível: (a) suspensão de AgNP-Hep e (b) solução de heparina (1,25% m/v).



5.2 Resposta do eletrodo para quatro compostos diferentes

Com o objetivo de estudar o desempenho do AgNP-Hep-Nafion/GCE na análise de alguns compostos fenólicos, preparou-se soluções padrão das seguintes substâncias: ácido cafeico, ácido ascórbico, hidroquinona e ácido clorogênico ($1,47 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), que foram avaliados em solução tampão Clark-Lubs ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 2,2) utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada. Através dos voltamogramas representados na Figura 7 pode-se constatar que o eletrodo proposto apresentou pouca sensibilidade com relação aos analitos: ácido ascórbico e hidroquinona. Por outro lado, apresentou um expressivo aumento no sinal de corrente para o ácido clorogênico e, portanto, este composto foi selecionado como analito para o desenvolvimento e aplicação do método.

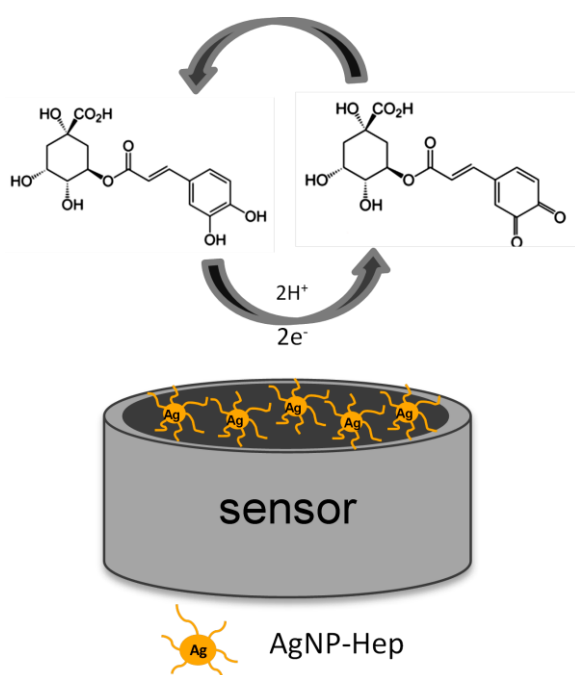
Figura 7. Voltamogramas obtidos usando o AgNP-Hep-Nafion/GCE para diferentes compostos a partir da solução padrão de: (a) ácido ascórbico, (b) hidroquinona (c) ácido cafeico e (d) ácido clorogênico, na concentração de $1,47 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão Clark-Lubs ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 2,2).



5.3 Princípio de funcionamento do sensor proposto

A Figura 8 mostra a representação esquemática da superfície do sensor proposto. Seu funcionamento ocorre a partir da modificação química da sua superfície com nanopartículas de prata, que contribui para a transferência de elétrons mais eficientemente. A reação redox do ácido clorogênico ocorre pela oxidação dos grupamentos hidroxilas do anel aromático à sua respectiva o-quinona, envolvendo a transferência de dois prótons e dois elétrons.³¹ A corrente obtida no final do processo é proporcional a concentração de ácido clorogênico, sendo usada para a quantificação do analito. O mesmo processo pode ser estendido para os outros compostos fenólicos estudados a seguir (ácido ascórbico, hidroquinona e ácido cafeico).

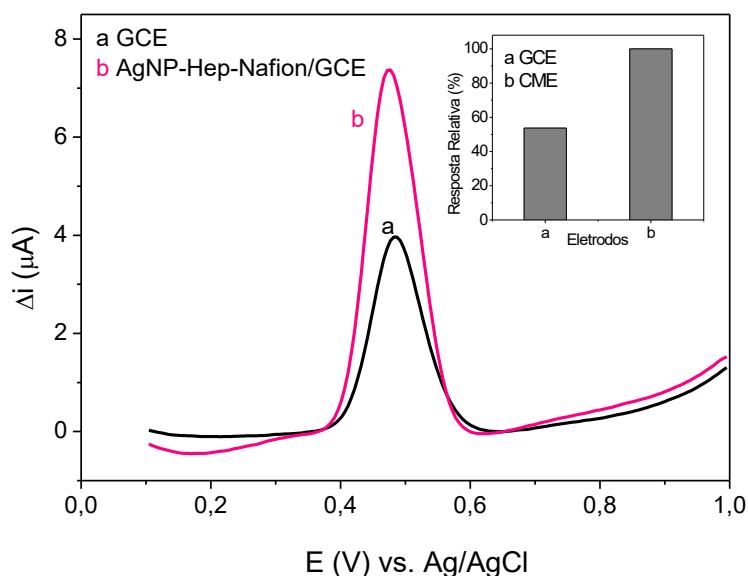
Figura 8. Representação esquemática da reação de oxi-redução do ácido clorogênico que ocorre na superfície do sensor proposto AgNP-Hep-Nafion/GCE.



5.4 Estudo da contribuição da modificação na resposta do eletrodo

A contribuição do modificador (AgNP-Hep-Nafion) na resposta analítica do ácido clorogênico foi avaliada com o GCE sem modificação e o eletrodo proposto. Os eletrodos foram testados por SWV na faixa de potencial de 0,1 a 1,0 V vs. Ag/AgCl empregando uma solução tampão Clark-Lubs (0,2 mol L⁻¹, pH 2,2) contendo 1,47 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ de ácido clorogênico. A Figura 9 mostra os voltamogramas de onda quadrada obtidos. Como pode ser observado, a presença da suspensão (AgNP-Hep) no eletrodo modificado representou um ganho de resposta para o ácido clorogênico de 1,8 vezes com relação ao GCE. Este ganho de corrente está relacionado ao fato de as AgNP, presentes como modificador, contribuírem na transferência de elétrons devido seu caráter condutor, e, devido sua grande área superficial, também atuarem como sítios ativos favorecendo a interação do ácido clorogênico com a superfície do eletrodo, facilitando o processo redox.

Figura 9. Voltamogramas de onda quadrada para os eletrodos (a) GCE e (b) AgNP-Hep-Nafion/GCE, em solução tampão Clark-Lubs 0,2 mol L⁻¹ contendo 1,47 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ de ácido clorogênico.

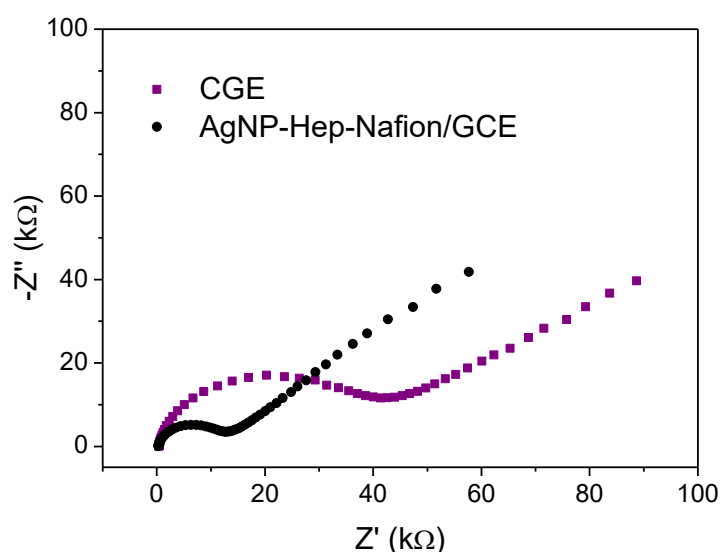


5.5 Caracterização eletroquímica

5.5.1 Estudos de impedância

Para confirmar a eficácia do eletrodo proposto, foram realizados ensaios de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS). O estudo foi empregado afim de verificar a capacidade da superfície do eletrodo de resistir ao fluxo da corrente elétrica (impedância. Foi utilizado o eletrodo sem modificação (GCE) e com a modificação química (AgNP-Hep-Nafion/GCE), com o objetivo de comparar os resultados. Os estudos foram realizados em uma célula eletroquímica usando solução $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ como sonda eletroquímica em circuito aberto com 10 mV de amplitude e frequência entre 0,1 – 100000 Hz. A Figura 10 mostra o gráfico de Nyquist para ambos os eletrodos testados.

Figura 10. Curvas de EIS para CGE e AgNP-Hep-Nafion/GCE em solução KCl ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$) contendo $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, circuito aberto, 10 mV de amplitude e frequência entre 0,1 – 100000 Hz.



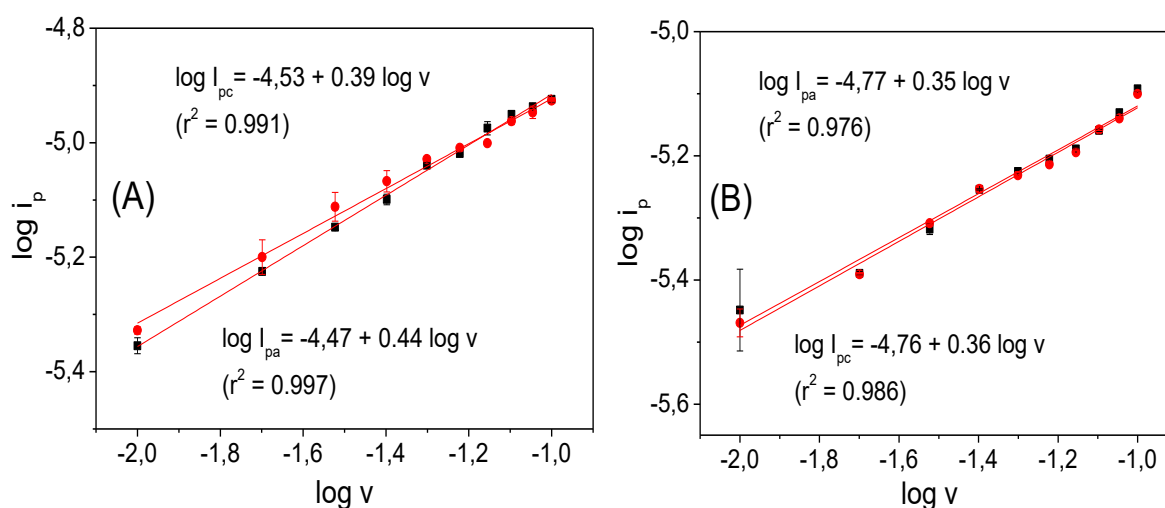
Como é possível observar, em relação ao GCE existe uma maior resistência ao fluxo eletroquímico de $R_p = 49,13 \text{ k}\Omega$ quando comparado ao AgNP-Hep-Nafion/GCE, onde essa resistência diminui à $R_p = 13,80 \text{ k}\Omega$. Assim, a modificação química no eletrodo proporcionou uma diminuição da resistência elétrica no sistema, de cerca de 3,5 vezes menor que a apresentada pelo GCE, comprovando mais uma vez a eficácia do eletrodo proposto.

5.5.2 Efeito da velocidade de varredura e área eletroativa

Com a finalidade de determinar a área eletroativa do eletrodo proposto e verificar se a difusão é o transporte de massa que rege o sistema, foi feito um estudo usando a técnica de voltametria cíclica (CV). O parâmetro de velocidade de varredura foi avaliado na faixa de 10 a 100 mV s^{-1} . Para esta análise foram utilizados 10 mL de solução de ferrocianeto ferrocianato de potássio ($5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), avaliando-se individualmente os eletrodos AgNP-Hep-Nafion/GCE e GCE.

Uma evidência em relação ao transporte de massa pode ser obtida pelo gráfico de $\log i_p$ vs $\log v$. As Figuras 11(A) e 11(B) mostram os gráficos comparativos com valores obtidos dos coeficientes angulares retirados da equação da reta de cada gráfico, sendo que os valores de coeficiente angular próximos a 0,5 indicam que o transporte de massa predominante é a difusão, enquanto valores próximos a 1 indicam contribuição da adsorção.³¹

Figura 11. Gráficos de $\log i_p$ vs $\log v$, sendo i_{pa} = corrente do pico anódico e i_{pc} = corrente do pico catódico. Onde (A) AgNP-Hep-Nafion/GCE e (B) GCE obtidos em solução de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ na concentração de $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.



Como pode ser observado, ambos os eletrodos (AgNP-Hep-Nafion/GCE e GCE) possuem coeficientes angulares próximos do valor encontrado na literatura para um sistema regido pela difusão.

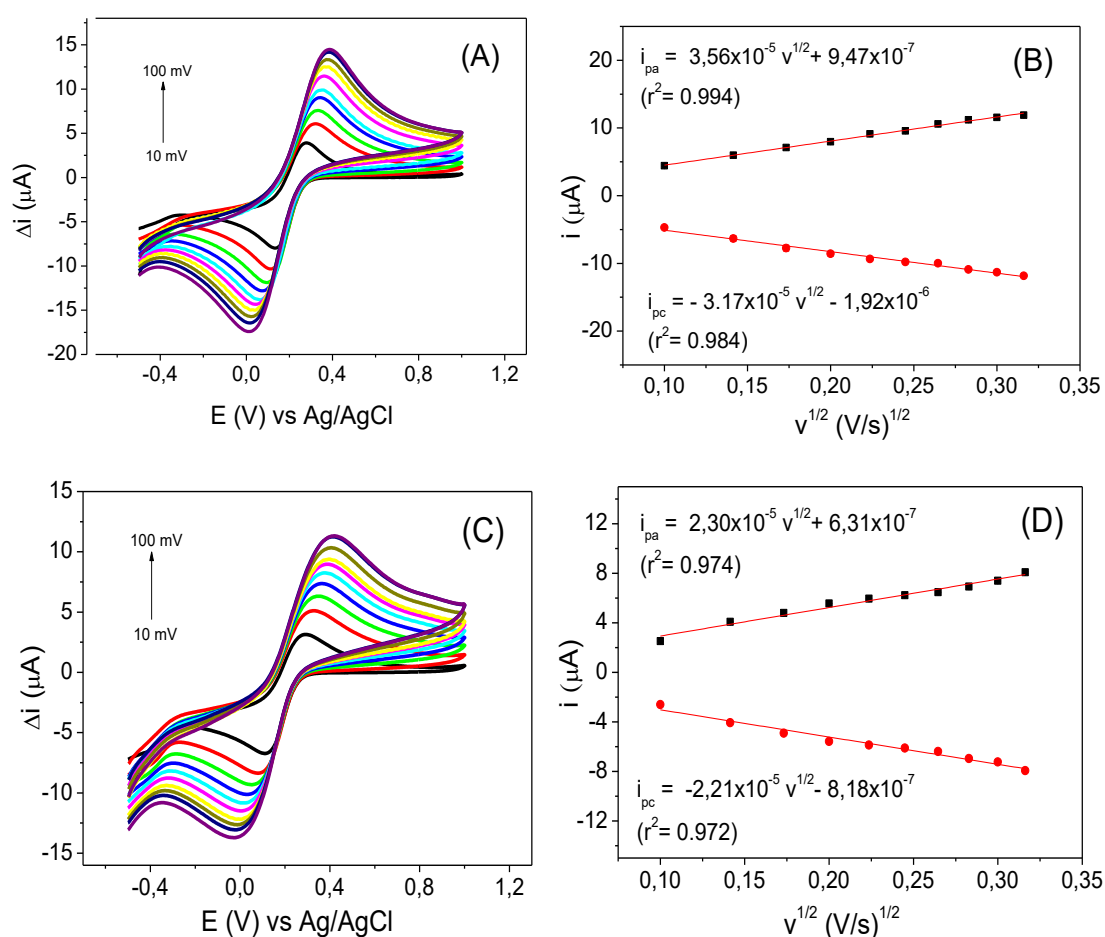
Também foram construídos gráficos i_p vs $v^{1/2}$ com a finalidade de avaliar a linearidade conforme a equação de Randles-Sevcik (Eq 1) onde i_p é a

corrente do pico resultante, o n refere-se ao número de elétrons transferidos na reação ($n=2$), o A é a área superficial do eletrodo, o D diz respeito ao coeficiente de difusão, C é a concentração da espécie ($5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e v é a velocidade de varredura da reação.

$$i_p = 2,69 \times 10^{-5} A D^{1/2} n^{3/2} C v^{1/2} \quad (1)$$

Os voltamogramas obtidos para o GCE e para o AgNP-Hep-Nafion/GCE podem ser visualizados na Figuras 12(A) e (C) bem como o gráficos i_p vs $v^{1/2}$ (Figuras 12(B) e (D)) plotados a partir destes voltamogramas. A partir das linearidades obtidas, pode-se concluir novamente que a reação eletroquímica é controlada pela difusão nos dois casos e através da Equação 1 é possível calcular a área eletroativa dos eletrodos (AgNP-Hep-Nafion/GCE e GCE), substituindo $D = 1,60 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, coeficiente de difusão referente a solução de ferrocianeto, ferrocianato de potássio segundo a literatura.

Figura 12. Voltamogramas cíclicos e gráficos i vs $v^{1/2}$ obtidos a partir da solução de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ na concentração de $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, e nos intervalos de 10 a 100 mV s^{-1} onde (A) e (B) referem-se ao AgNP-Hep-Nafion/GCE e (C) e (D) referem-se ao GCE.



Os valores de área superficial para o AgNP-Hep-Nafion/GCE foram de $76,992 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$ e para o GCE foi de $47,804 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$. Dessa forma, o eletrodo proposto possui uma maior área superficial eletroativa que o GCE demonstrando mais uma vantagem do uso do modificador para melhoramento da sensibilidade do eletrodo proposto.

5.6 Otimização do método

5.6.1 Estudo da natureza e pH do eletrólito suporte

Após a escolha do analito, estudos relacionados à natureza do eletrólito suporte e pH foram investigados afim de melhorar o desempenho analítico do método proposto. Para isso, de início foram analisadas em duplicata, por SWV, as respostas do AgNP-Hep-Nafion/GCE e do GCE nas soluções tampão sob influência de meios básicos, ácidos e neutro. Desta forma, foram preparadas soluções tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 7 e 8), solução tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 5) e solução Clark-Lubs ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$; pH 2,2) e feitas análises na presença de solução de ácido clorogênico ($1,47 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).

Nos eletrólitos de faixa neutra e básica (Figura 13 e 14), não foram obtidos ganhos significativos de corrente quando comparado a faixa mais ácida, especialmente no tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8) que, além da baixa intensidade de corrente adquirida, o perfil do pico revelou-se insatisfatório. Além disso, se observou uma mudança de coloração na solução contida na célula eletroquímica, inicialmente incolor, passando para uma cor amarelada indicando, portanto, uma reação entre o eletrólito e o ácido clorogênico. Nos voltamogramas referentes a Figura 13, 14, 15 e 16, pode ser observado um pico de oxidação referente as nanopartículas prata. Esse pico se sobrepôs com o pico do ácido clorogênico nas soluções tampão em pH 7 e 8, dificultando a análise do CGA pela interferência das nanopartículas.

Figura 13. (A) Efeito do eletrólito suporte/pH sobre a resposta do AgNP-Hep-Nafion/GCE utilizando: (a) solução tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7) e (b) solução de ácido clorogênico $1,47 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7) por SWV. Inserido: resposta do GCE nas mesmas condições. (B) Resposta relativa.

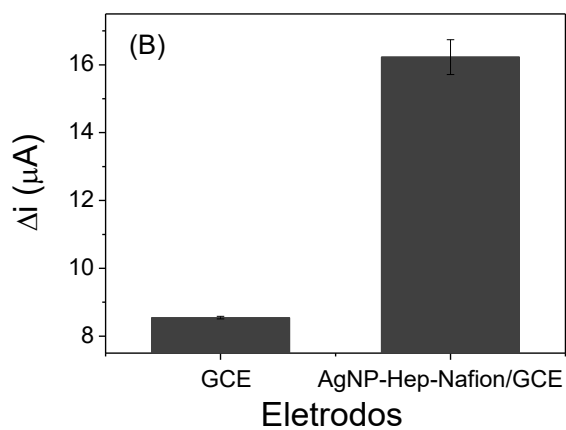
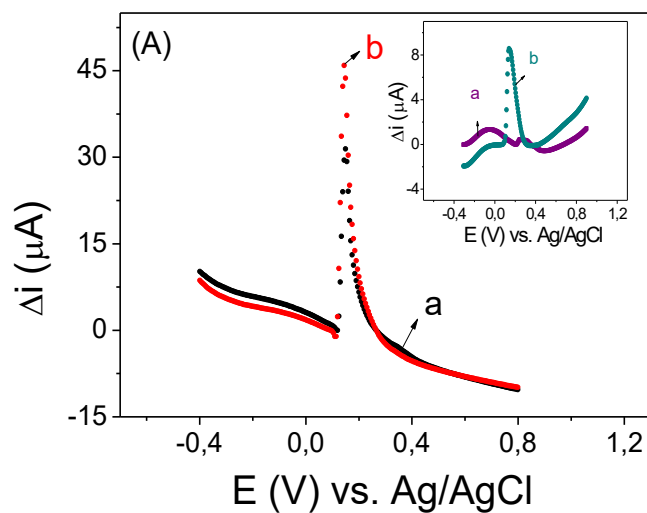
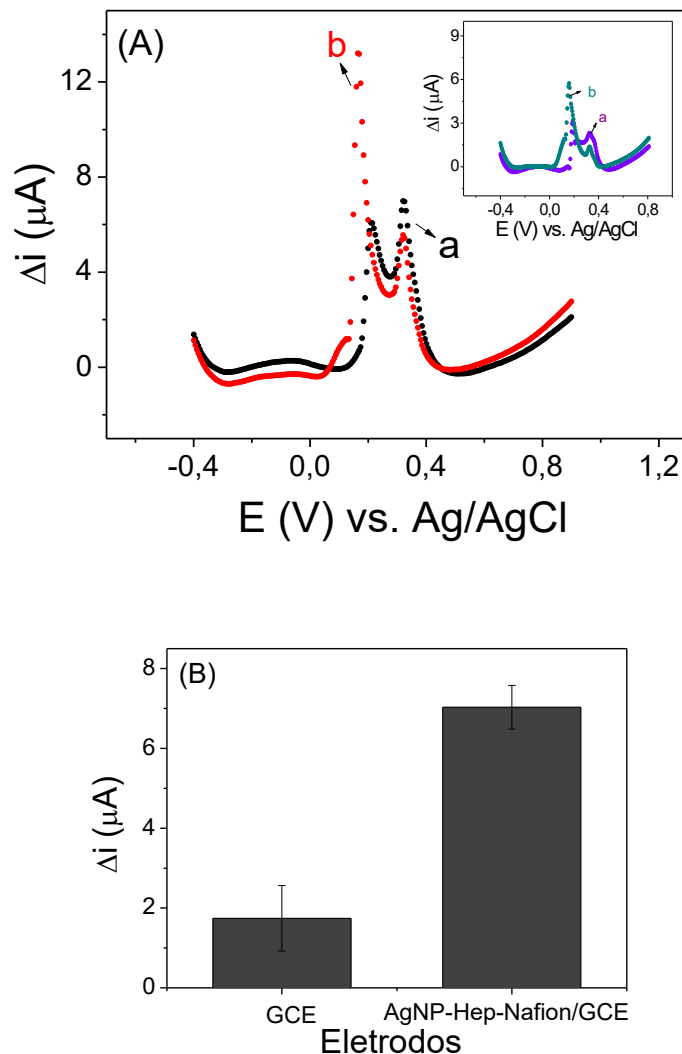


Figura 14. (A) Efeito do eletrólito suporte/pH sobre a resposta do AgNP-Hep-Nafion/GCE utilizando: (a) solução tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8) e (b) solução de ácido clorogênico $1,47 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8) por SWV. Inserido: resposta do GCE nas mesmas condições. (B) Resposta relativa.



Os eletrólitos em faixa mais ácida se mostraram promissores em relação ao ganho de sinal e ao perfil do pico do ácido clorogênico. Também é possível observar nos voltamogramas das Figuras 15 e 16 que, em soluções de pH mais ácidos os sinais apresentam bons perfis. Porém, o pico do ácido clorogênico estudado no tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) em pH 5 (Figura 15 (A)) resultou em um ganho de corrente pouco significativo (Figura 15 (B)). Em contrapartida, quando comparado ao tampão Clark-Lubs ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$; pH 2,2, (Figura 16 (A)) o valor de corrente é maior (Figura 16 (B)). Também pode ser observado uma perda de sinal da oxidação das nanopartículas de prata nos

voltamogramas das Figuras 13, 14, 15 e 16, porém, não foi observado um decaimento de sinal de corrente para o ácido clorogênico. Para confirmar que a oxidação da prata não interfere no ganho de corrente do ácido clorogênico, foram realizadas análises em duplicata para todos os testes, evidenciando confiança nos resultados. Sendo assim, o tampão Clark-Lubs foi selecionado como eletrólito suporte para os demais testes.

Figura 15. (A) Efeito do eletrólito suporte/pH sobre a resposta do AgNP-Hep-Nafion/GCE utilizando: (a) solução tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5) e (b) solução de ácido clorogênico $1,47 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5) por SWV. Inserido: resposta do GCE nas mesmas condições. (B) Resposta relativa.

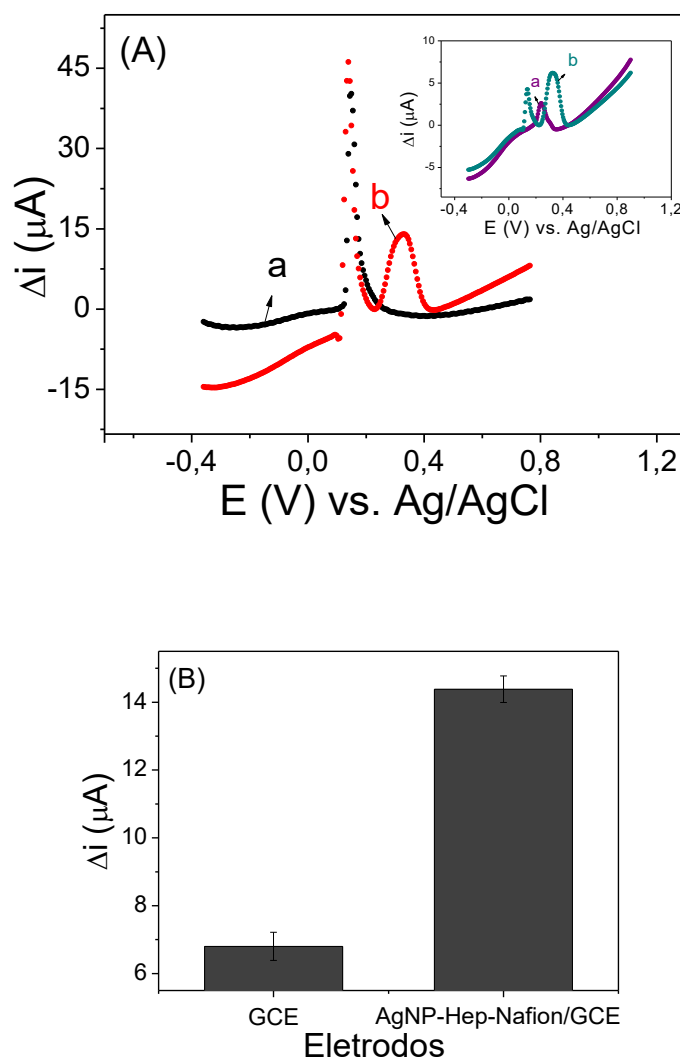
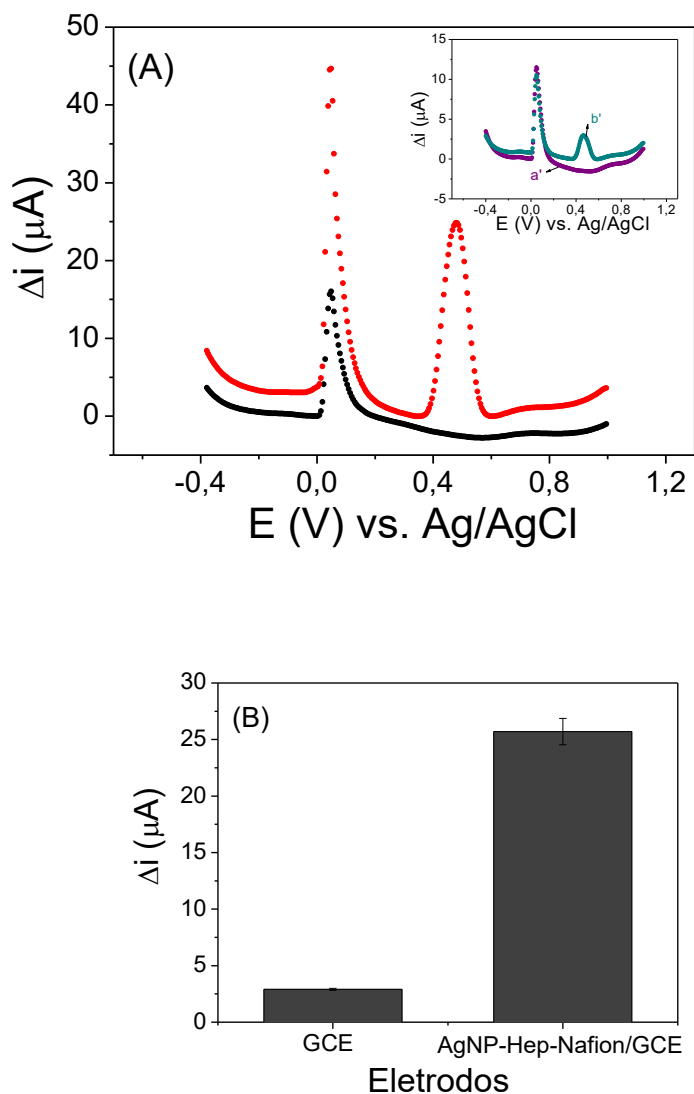


Figura 16. (A) Efeito do eletrólito suporte/pH sobre a resposta do AgNP-Hep-Nafion/GCE utilizando: (a) solução Clark-Lubs ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 2,2) e (b) solução de ácido clorogênico $1,47 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em solução Clark-Lubs ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 2,2). Inseto: resposta do GCE nas mesmas condições. (B) Resposta relativa.

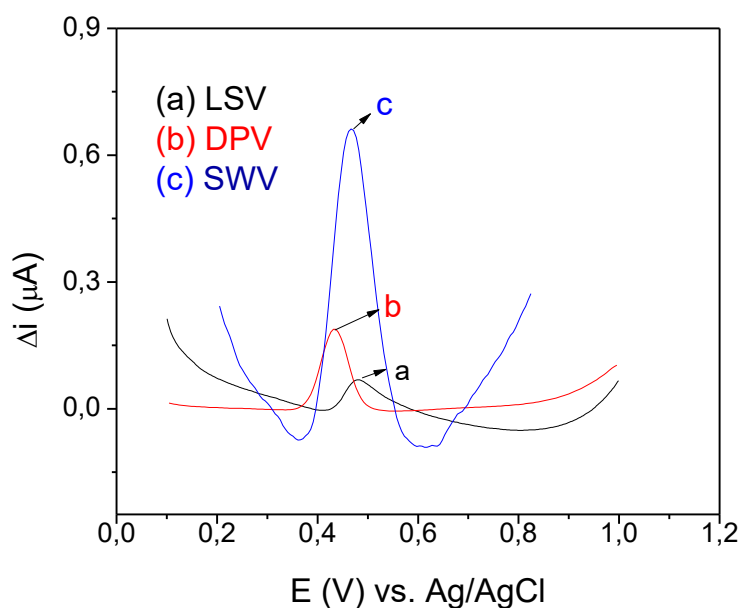


5.6.2 Escolha e otimização da técnica voltamétrica

Após a escolha do eletrólito suporte e pH realizou-se estudos para a escolha da técnica voltamétrica mais adequada, ou seja, a que apresenta a melhor resposta analítica para o analito de interesse em termos de corrente e resolução de pico. Na Figura 17, estão representados os voltamogramas obtidos para as técnicas voltametria linear (LSV- *linear scan voltammetry*), voltametria de pulso diferencial (DPV- *differential pulse voltammetry*) e

voltametria de onda quadrada (SWV) para o eletrodo AgNP-Hep-Nafion/GCE. Observa-se que a técnica de SWV apresentou o melhor resultado gerando um valor de corrente maior que as outras técnicas empregadas e, demonstrando também boa resolução de pico sendo, portanto, a técnica selecionada para ser empregada nos demais testes deste trabalho. A melhor resposta de corrente para o ácido clorogênico apresentada na SWV pode ser explicada pelo tipo de aplicação de potencial usada nesta técnica. Como a medida é feita nos dois sentidos da varredura (redução e oxidação) a corrente total é a diferença entre a corrente direta (+i) e a corrente reversa (-i): $\Delta i = i - (-i)$ de cada medida, que devido a diferença de sinais, torna-se uma soma. Sendo assim, esta técnica é favorecida no caso de sistemas reversíveis ou quase-reversíveis.

Figura 17. Estudo das técnicas voltamétricas: (a) LSV; (b) DPV; (c) SWV para o AgNP-Hep-Nafion/GCE em ácido clorogênico na concentração de $1,47 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em tampão Clark-Lubs (0,2 mol L⁻¹, pH 2,2).

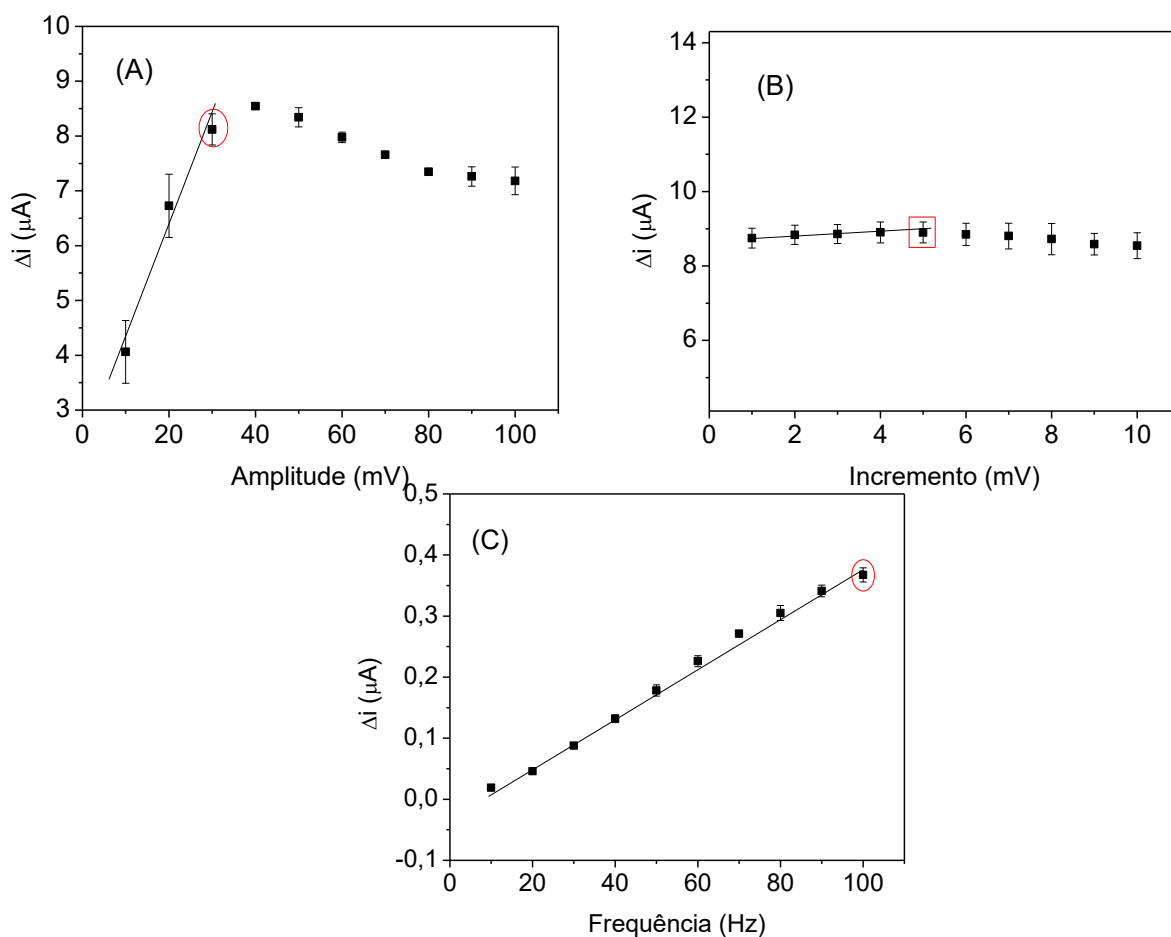


5.6.3 Otimização dos parâmetros técnica voltamétrica

Para melhor desempenho da técnica escolhida, foi realizada a otimização dos três parâmetros da SWV: amplitude, incremento e frequência. Primeiramente foi feita a otimização da amplitude onde os estudos foram realizados na faixa de 10 a 100 mV, fixando os outros parâmetros em valores intermediários (frequência 50 Hz e incremento 5 mV). O valor escolhido foi de

30 mV onde se obteve uma relação linear crescente corrente-parâmetro, garantindo a difusão da espécie e boa resolução do pico (Figura 18 (A)). Este valor foi fixado para realizar a otimização dos demais parâmetros. Em seguida, foi feita a otimização do incremento na faixa de 1 a 10 mV e o melhor valor encontrado foi de 5 mV (Figura 18(B)), sendo este valor novamente fixado para estudar o parâmetro seguinte. Finalmente, foi feito a otimização da frequência na faixa de 10 a 100 Hz, onde desta vez, obteve-se uma linearidade do começo ao fim da faixa estudada, conseqüentemente o valor escolhido foi de 100 Hz também pela sua relação linear crescente, apontando o melhor valor de corrente (Figura 18 (C)).

Figura 18. Estudo da otimização dos parâmetros da SWV: (A) amplitude, (B) incremento; (C) frequência para o AgNP-Hep-Nafion/GCE utilizando $1,47 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de ácido clorogênico em tampão Clark-Lubs (0,2 mol L⁻¹, pH 2,2).



A Tabela 1 resume os parâmetros investigados e também os melhores resultados obtidos na otimização do método para o eletrodo AgNP-Hep-Nafion/GCE.

Tabela 1. Parâmetros de otimização do método.

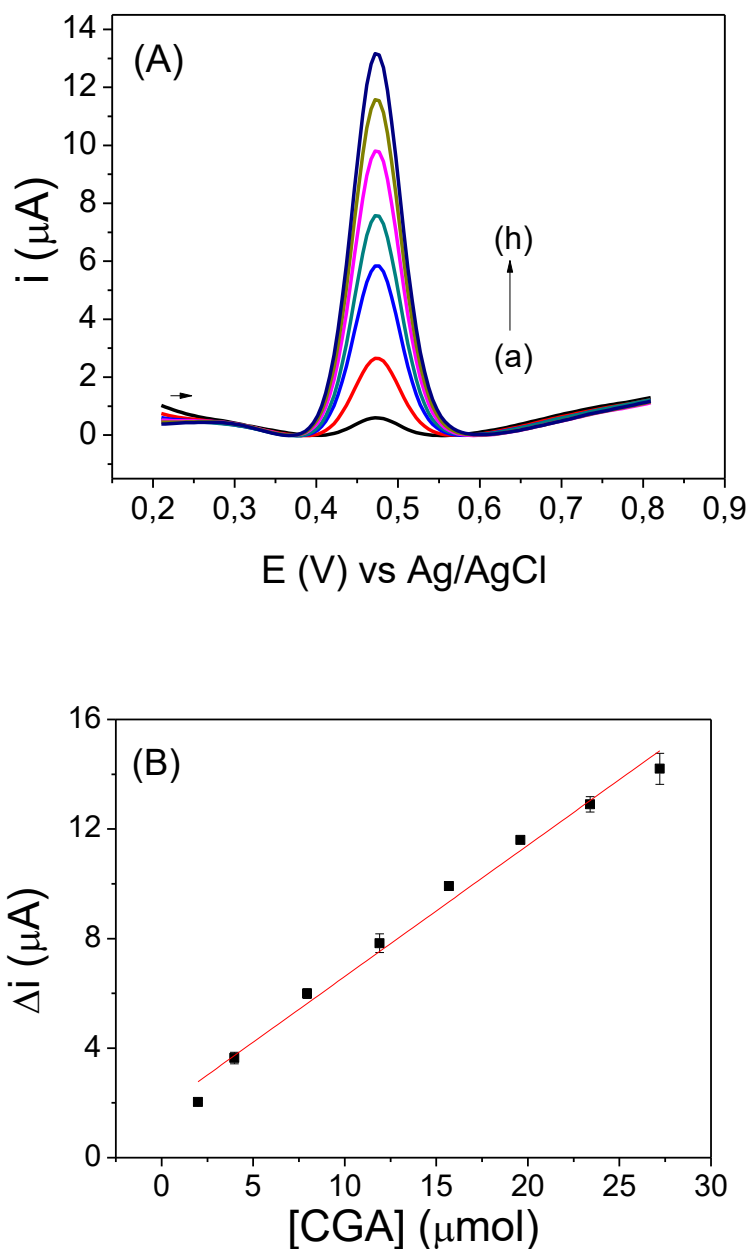
Parâmetro	Faixa investigada	Valor escolhido
Natureza do eletrólito suporte	Soluções tampão: Acetato, Fosfato, Clark-Lubs,	Clark-Lubs
Faixa de pH	2,2 – 8,0	2,2
Escolha da técnica	LSV, DPV, SWV	SWV
Amplitude de pulso	10 – 100 (mV)	30
Incremento de potencial	1 – 10 (mV)	5
Frequência	10 – 100 (Hz)	100

5.7 Desempenho analítico do eletrodo quimicamente modificado

5.7.1 Curva de calibração

Com os parâmetros otimizados, construiu-se uma curva de calibração (Figuras 19(A) e 19(B)) usando uma solução padrão de ácido clorogênico ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e foi obtida uma faixa linear de $1,99 \times 10^{-6}$ a $2,72 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de CGA, expressa de acordo com a seguinte equação de regressão: $-\Delta i = 0,490 + 1,715 \times 10^{-6} [\text{CGA}]$, com um coeficiente de correlação (R^2) de 0,993, onde Δi é a corrente resultante (10^{-6} A) e [CGA] refere-se a concentração de ácido clorogênico ($\mu\text{mol L}^{-1}$). O LOD (3 x desvio padrão do intercepto/ coeficiente angular) e o LOQ (10 x desvio padrão do intercepto/ coeficiente angular) foram calculados como $1,801 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $5,512 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. A oxidação eletroquímica do ácido clorogênico foi obtida a um potencial de aproximadamente +0,47 V vs. Ag/AgCl.

Figura 19. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando o eletrodo proposto em solução tampão clark-lubs ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$; pH 2,2) contendo ácido clorogênico nas seguintes concentrações: (a) $1,99 \times 10^{-6}$; (b) $3,98 \times 10^{-6}$; (c) $7,94 \times 10^{-6}$; (d) $1,19 \times 10^{-5}$; (e) $1,57 \times 10^{-5}$; (f) $1,96 \times 10^{-5}$; (g) $2,34 \times 10^{-5}$ e (h) $2,72 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em frequência de 100 Hz, amplitude de 30 mV e incremento de 50 mV. (B) Curva de calibração para o ácido clorogênico.



Na Tabela 2 é possível observar os resultados, descritos na literatura, da determinação de amostras contendo de ácido clorogênico utilizando outros eletrodos quimicamente modificados com diferentes materiais. Como é possível notar, o eletrodo proposto alcança resultados parecidos de LOD, evidenciando sucesso na detectabilidade do analito bem como boa sensibilidade de análise.

Tabela 2. Comparação de diferentes CME aplicados na determinação de CGA.

Eletrodo	Modificador ^a	Técnica	Faixa linear (μmolL^{-1})	LOD (μmolL^{-1})	Ref.
SPE	Au-SPE-Lacc-Nafion	Amperometria	3,0 - 15	2,8	32
SPE	C-SPE/Pt-NPs/RGO/lac c-array	Amperometria	2,9 – 26,4	2,67	33
BDD	BDD	SWV	2,0 - 52	1,26	34
GCE	AgNP-Hep-Nafion/GCE	SWV	1,9 – 27,2	1,80	Este trabalho

^a Lacc: lacase; Au-SPE: eletrodo quimicamente impresso de ouro; C-SPE: eletrodo quimicamente impresso de carbono; Pt-NPs: nanopartículas de platina; BDD: eletrodo de diamante dopado com boro.

5.7.2 Repetibilidade e reprodutibilidade

O estudo de repetibilidade foi realizado a partir de 10 medidas consecutivas utilizando o mesmo eletrodo em tampão clark-lubs $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,2) contendo $1,47 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido clorogênico. Neste estudo, o desvio padrão relativo entre as medidas (*relative standard deviation* – RSD) foi de, aproximadamente, 1,24% comprovando a boa precisão do eletrodo proposto. O estudo de reprodutibilidade entre eletrodos procedeu-se da seguinte forma: dois eletrodos foram preparados, independentemente, com a mesma composição. As medidas foram realizadas em duplicata para cada eletrodo utilizando $1,47 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido clorogênico em tampão acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 2,2). O valor de RSD foi de, aproximadamente, 4,90%, comprovando a eficiência do processo de construção do eletrodo.

5.7.3 Estudo de recuperação

O estudo de recuperação foi realizado através do método de adição de padrão, em duplicata, onde foram feitas duas medidas adicionando-se diferentes valores de concentração ($1,99 \times 10^{-6}$ e $2,49 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) do padrão de ácido clorogênico. O cálculo foi efetuado comparando os valores de

concentração adicionados com os valores de obtidos pela equação da reta (recuperados). A Tabela 3 mostra as percentagens de recuperação obtidas que variaram de 98,0 a 102,0% indicando a matriz não oferece uma interferência significativa na determinação da amostra, mostrando uma boa eficiência e exatidão do método.

Tabela 3. Parâmetros analíticos do método proposto para determinação de ácido clorogênico.

Amostra	CGA Adicionado (mol L ⁻¹)	CGA Recuperado (mol L ⁻¹)	Recuperação ^a (%)
Café verde	1,99 x 10 ⁻⁶	2,044x10 ⁻⁶ ± 0,0	102
	2,49 x 10 ⁻⁶	2,416x10 ⁻⁶ ± 0,14	98

^aRecuperação = (média valores recuperados/valor adicionado) x 100.

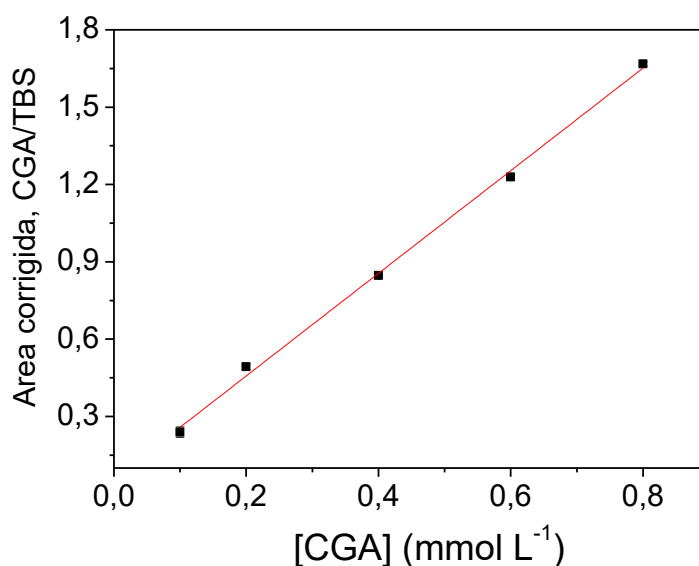
5.7.4 Determinação do teor de ácido clorogênico em amostra de café verde

Foi analisada uma amostra de café verde comercial obtida em Florianópolis (Santa Catarina, Brasil). O café verde possui uma gama de minerais e aminoácidos, além de vitamina B3 e ácidos cafeioquínicos, no qual o ácido clorogênico está presente em maior proporção. A amostra foi analisada com o eletrodo proposto pelo método de adição de padrão por SWV e com um método comparativo por eletroforese capilar.

A princípio, realizou-se a determinação da amostra pelo método eletroquímico, empregando o AgNP-Hep-Nafion/GCE, através da construção de uma curva de calibração por adição de padrão (Figura 20). Foi obtida uma equação da reta igual a $\Delta i = 1,479x + 9,674 \times 10^{-6}$ [CGA] com um coeficiente de correlação (r^2) de 0,992, onde Δi é a corrente resultante (μA) e [CGA] refere-se a concentração de ácido clorogênico (mmol L⁻¹). A concentração de CGA determinada na amostra de café verde foi igual a 3,52 mg.

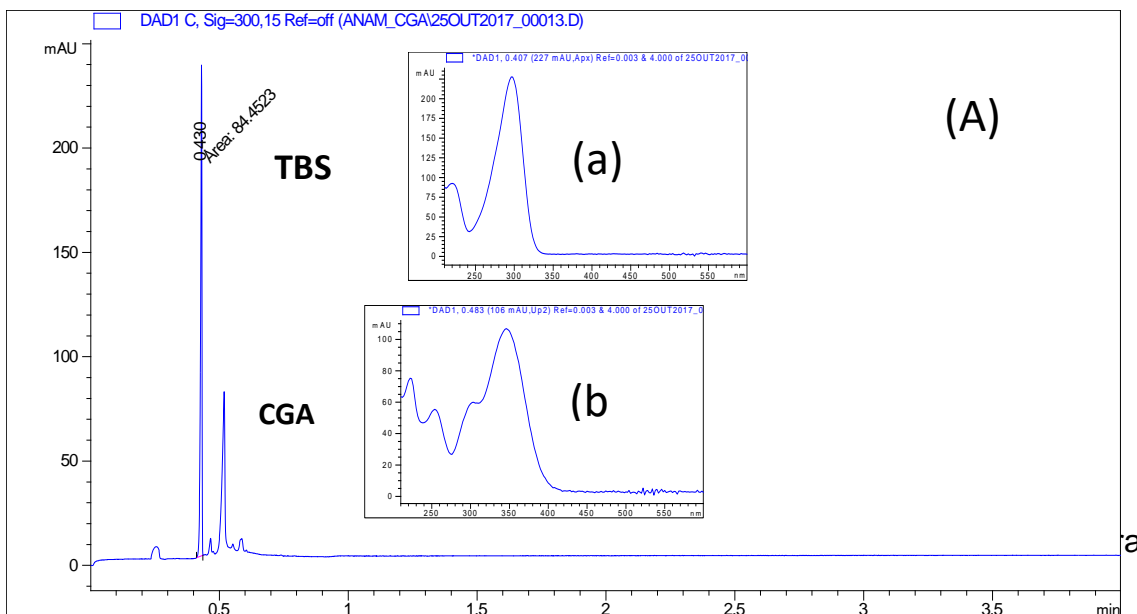
Para avaliar a exatidão do método eletroanalítico a amostra foi quantificada pelo método de eletroforese capilar²⁹ (CE). Para este método foi utilizado uma solução de tetraborato de sódio (TBS) de concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como padrão interno para compensar possíveis erros do sistema de injeção das soluções padrão (ácido clorogênico, $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e melhorar a repetibilidade do método. A curva de calibração (Figura 21) construída mostrou boa linearidade e a seguinte equação de reta: $A = 3013,3 x + 0,0454[\text{CGA}]$, com um coeficiente de correlação de $r^2=0,997$.

Figura 20. Curva de calibração por eletroforese capilar utilizando a solução padrão de CGA ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e PI (TBS, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$).



Ao realizar a curva de calibração, a amostra foi inserida no equipamento. O pico de ácido clorogênico pode ser visualizado no eletroferograma (Figura 22), onde o valor de área corrigida obtida para a amostra, foi substituído em duplicata na equação da reta. O valor de ácido clorogênico presente na amostra de café verde segundo esta técnica foi de 3,79mg.

Figura 21. (A) Eletroferograma obtido da amostra de café verde, onde: (a) TBS e (b) CGA. Condições experimentais: eletrólito constituído por TBS, 0,1 mol L⁻¹; injeção hidrodinâmica 50 mbar por 5s; tensão aplicada 30 kV com polaridade positiva e detecção direta do analito identificado pelo espectro UV/VIS em 340 nm.



A partir do eletroferograma (Figura 22) é possível notar a presença de possíveis outros ácidos cafeoilquínicos presentes na amostra, além do CGA, embora evidenciado por picos menos intensos. Os teores de CGA (expresso em mgCGA) obtidos utilizando-se o eletrodo proposto e o método comparativo estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Determinação de ácido clorogênico em amostra de café verde comercial usando método CE e o eletrodo quimicamente modificado proposto.

Amostra	Eletroforese		Erro Relativo (%)
	Capilar (mg/cápsula)	CME ^a (mg/cápsula)	
Café verde	3,79 ± 0,02	3,52 ± 1,84 x 10 ⁻⁷	-7,12

^aMédia ± desvio padrão.

Como pode ser visto na Tabela 3 os resultados obtidos possuem aproximadamente -7,12% de erro relativo, ficando dentro de um erro analítico aceitável. Os resultados demonstram que o método proposto apresenta uma excelente relação com o método comparativo para a determinação de ácido clorogênico em amostra de café verde. Isto indica que o método desenvolvido é ideal para esta aplicação.

6 CONCLUSÕES

O trabalho foi realizado com o objetivo de realizar a determinação de ácido clorogênico a partir da técnica de voltametria de onda quadrada, utilizando um eletrodo quimicamente modificado com nanopartículas de prata. O método proposto se revelou de fácil execução, e foi otimizado com intuito de se obter uma melhor resposta analítica em termos de resolução de pico, bem como em sinal de corrente. O eletrodo proposto apresentou um desempenho superior quando comparado ao eletrodo sem modificação. Esta melhora pôde ser comprovada pelos testes de impedância e estudo da área eletroativa do sensor que demonstraram que o AgNP-Hep-Nafion/GCE além de aumentar a área superficial do eletrodo também diminui a resistência a passagem de corrente em sua superfície, facilitando a transferência de elétrons da reação redox. O eletrodo proposto também apresentou uma boa repetibilidade e reprodutibilidade, e foi utilizado na determinação de ácido clorogênico em amostra de café verde comercial, apresentando adequada sensibilidade e seletividade. Foi realizado como método comparativo a técnica de eletroforese capilar, apresentando um erro relativo de -7,12% com relação ao CME, demonstrando uma adequada detectabilidade da amostra pelo AgNP-Hep-Nafion/GCE.

O método proposto também oferece vantagens como a facilidade na modificação do eletrodo, baixo custo e rápido tempo de análise que, aliado a boa sensibilidade e detectabilidade apresentadas, faz deste método uma excelente alternativa para determinação de ácido clorogênico presente em amostras alimentícias. Neste estudo, ainda pode ser realizado como perspectivas futuras, o estudo de interferentes, a caracterização das nanopartículas por microscopia, o estudo da reversibilidade do ácido clorogênico e a análise de mais amostras que contenham ácido clorogênico com o objetivo de enriquecer o trabalho e validar ainda mais o método proposto.

7 REFERÊNCIAS

- ¹PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. S.; KUBOTA, L. T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. **Quim. Nova**, 25, 121-123, 2002.
- ²SOUZA, M.F.B. Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise: uma breve abordagem. **Quim. Nova**, 8, 191-195, 1996.
- ³Murray, R. W. *et al.* Modified electrodes: chemically modified electrodes for electrocatalysis and discussion. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 302, 253-265, 1981.
- ⁴SAJID, M. *et al.* Chemically modified electrodes for electrochemical detection of dopamine in the presence of uric acid and ascorbic acid: A review. **Trends Anal. Chem.** 76, 15-29, 2016.
- ⁵CARVALHO, S.E.Q. **Desenvolvimento e aplicação de eletrodos quimicamente modificados com Hexacianosferratos dos metais Fe, Ni e Co.** 2011. 90 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP.
- ⁶CAMPBELL, F. W. COMPTON, R. G. The use of nanoparticles in electroanalysis: an updated review. **Anal. Bioanal. Chem**, 396, 241-259, 2009.
- ⁷WILLNER, I; WILLNER. B; TEL-VERED. R; Electroanalytical applications of metallic nanoparticles and supramolecular nanostructures. **Electroanalysis**, 23, 13-28, 2010.
- ⁸ALBRECHT, M. A.; EVANS C. W.; RASTON, C. L. Green chemistry and the health implications of nanoparticles. **Green Chem.** 8, 417-432, 2006.
- ⁹BASU, S. *et al.* Interaction of DNA bases with silver nanoparticles: Assembly quantified through SPRS and SERS. *J. Colloid Interface Sci.* 321, 288-293, 2008.
- ¹⁰SUN, T; SEFF, K. Silver Clusters and Chemistry in Zeolites. **Chem. Rev** 94, 857-870, 1994.

¹¹HUSSAIN, J. I. *et al.* Silver nanoparticles: preparation, characterization, and kinetics. **Adv. Mat. Lett.** 2, 188-194, 2011.

¹²DURÁN, N. *et al.* Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. **J Nanobiotechnol.** 3, 1-7, 2005.

¹³LIMA, R ; SEABRAC, A. B.; DURÁND, N. Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. **J Appl Toxicol.** 32, 867-879, 2012.

¹⁴LUO, X. *et al.* Application of nanoparticles in electrochemical sensors and biosensors. **Anal. Chem.** 87, 319-326, 2005.

¹⁵RAD, A. S. *et al.* A Review on glucose and hydrogen peroxide biosensor based on modified electrode included silver nanoparticles. *Int. J. Electrochem. Sci.* 6, 3671-3683, 2011.

¹⁶WUELFING, W. P. *et al.* Nanometer gold clusters protected by surface-bound monolayers of thiolated poly(ethylene glycol) polymer electrolyte. **J. Am. Chem. Soc.** 48, 12696-12697, 1998.

¹⁷L. CARLINI *et al.* Comparison between silver and gold nanoparticles stabilized with negatively charged hydrophilic thiols: SR-XPS and SERS as probes for structural differences and similarities **Colloids Surf., A**, 2017.

¹⁸HUANG, H.; YANG X. Synthesis of polysaccharide-stabilized gold and silver nanoparticles: a green method. **Carbohydr. Res.** 27, 2627-2631, 2004.

¹⁹LUNELLI, C. E. **Síntese e caracterização de formas encapsuladas de heparina e derivados em poli(ácido láctico)** . 2013. 62 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Departamento de Química. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

²⁰J. WANG *et al.* One-step electropolymeric co-immobilization of glucose oxidase and heparin for amperometric biosensing of glucose. **Analyst.** 125, 1431–1434, 2000.

- ²¹SILVA, M. L. C. *et al.* Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity in plant products. **Semin: Cien. Agrar.** 31, 669-682, 2010.
- ²²SANTOS M. R. V. S. *et al.* Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Rev. Bras. Farmacogn. Braz.** 21, 764-771, 2004.
- ²³NEGASH, N. Electrochemical Characterization and Determination of Phenol and Chlorophenols by Voltammetry at Single Wall Carbon Nanotube/Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) Modified Screen Printed Carbon Electrode. **ISRN.** 1, 1-11, 2015.
- ²⁴CLIFFORD M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates— nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism, **J. Sci. Food Agric**, 80, 1033–1043, 2000.
- ²⁵MENG, S. *et al.* Roles of chlorogenic acid on regulating glucose and lipids metabolism: a review. **Hindawi Publis. Corp.** 2013, 1-11, 2013.
- ²⁶PACHECO, W. F. *et al.* Voltametrias: uma breve revisão sobre os conceitos. **Rev. Virtual Quim**, 5, 516-537, 2013.
- ²⁷Silveira. M. S. *et al.* Desenvolvimento de metodologia analítica baseada em eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de bismuto: Aplicação em águas de chuva de regiões de Santa Catarina. **Ecl. Quím.**, 36, 158-181, 2011.
- ²⁸SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada, primeira parte: aspectos teóricos. **Quim. Nova**, .26, 81-89, 2002.
- ²⁹CARVALHO, M. L. *et al.* Determination of chlorogenic acid in coffee using a biomimetic sensor based on a new tetranuclear copper(II) complex. **Talanta**, 77, 394-399, 2008.

- ³⁰ SOLOMON S. D. *ET AL.* synthesis and study of silver nanoparticles. **J. Chem. Educ.** 84, 322, 2007.
- ³¹ SILVA T. R. *et al.* Electrochemical Sensor Based on Gold Nanoparticules Stabilized in Poly(Allyamine hydrochloride) for determination of Vanillin. **Electroanalysis**, 37, 265-272, 2015
- ³² YARDIM Y.; KESKIN E.; ŞENTÜRK Z. Voltammetric determination of mixtures of caffeine and chlorogenic acid in beverage samples using a boron-doped diamond electrode. **Talanta**, 16, 1010-1017, 2013.
- ³³ VASILESCU I.; *et al.* Disposable dual sensor array for simultaneous determination of chlorogenic acid and caffeine from coffee. **RSC Adv**, 5, 261–268, 2015.
- ³⁴ LITESCU S. I *et al.* Laccase-Nafion Based Biosensor for the Determination of Polyphenolic Secondary Metabolites, 43, 1089-1099, **Analytical Letters**, 43 1089–1099, 2010.