



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

**Biossensor à base de nanopartículas de ouro estabilizadas em
ciclodextrina e imobilizadas com lacase para determinação de
rutina**

PATRICIA BRUGNEROTTO

Florianópolis
Novembro/2015

PATRICIA BRUGNEROTTO

**Biossensor à base de nanopartículas de ouro estabilizadas em
ciclodextrina e imobilizadas com lacase para determinação de
rutina**

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

Orientadora: Prof.^a Dr^a Iolanda da Cruz Vieira

Florianópolis
Novembro/2015

PATRICIA BRUGNEROTTO

**Biossensor à base de nanopartículas de ouro estabilizadas em
ciclodextrina e imobilizadas com lacase para determinação de
rutina**

Prof. Dr. Alexandre Luís Parize
Coordenador de Estágio do Curso de Química-Bacharelado

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Iolanda da Cruz Vieira

Prof. Dr. Luciano Vitali

Prof.^a Dr.^a Tatiane de Andrade Maranhão

Florianópolis
Novembro/2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por estar comigo em todos os momentos, guiando-me e ajudando a superar todas as dificuldades encontradas ao longo do caminho.

Aos meus pais, Aldecir e Nilva, minha eterna gratidão por nunca medirem esforços em ajudar e apoiar-me em todas as minhas decisões. Vocês são os grandes incentivadores e responsáveis pelas minhas conquistas e realização dos meus sonhos.

Ao meu irmão Rodrigo, minha cunhada Lenita e meu sobrinho encantador, Leonardo pelo apoio e carinho sempre.

Ao meu namorado Bernardo, pela imensa compreensão, paciência e apoio, pelas palavras de conforto dando segurança para enfrentar momentos difíceis e por todos os momentos alegres e tristes que passou ao meu lado.

À Prof^a. Dr^a. Iolanda da Cruz Vieira pela orientação e dedicação durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas e ex-colegas do LaBios – Aline, Eduardo, Alessandra, Michelle, Larissa, Lucas, Nicole, Nicolas e Paulo pelos momentos de aprendizado e descontração.

À Tânia um agradecimento especial pela importante contribuição e dedicação durante o desenvolvimento desse trabalho.

À Daniela Brondani pela atenção e auxílio na execução desse trabalho.

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1.	Biossensores.....	13
2.2.	Enzimas	14
2.2.1.	<i>Enzima lacase</i>	15
2.2.2.	<i>Imobilização enzimática</i>	16
2.3.	Compostos fenólicos	18
2.3.1.	<i>Rutina</i>	19
2.4.	Nanomateriais	20
2.5.	Técnicas Voltamétricas	21
2.5.1.	<i>Voltametria de Onda Quadrada</i>	21
3.	OBJETIVOS	23
3.1.	Objetivo geral	23
3.2.	Objetivos específicos.....	23
4.	METODOLOGIA.....	24
4.1.	Reagentes e soluções	24
4.2.	Equipamentos e medidas eletroquímicas	25
4.3.	Obtenção da solução enzimática.....	25
4.4.	Determinação da atividade enzimática	26
4.5.	Síntese e caracterização das AuNP-CD e AuNP-CD-LAC	26
4.6.	Construção do Biossensor	27
4.7.	Preparo das amostras e determinação de rutina	27
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
5.1.	Estudo da atividade e Estabilidade da Lacase	29
5.2.	Caracterização das AuNP-CD e AuNP-CD-LAC.....	31
5.3.	Estudo da contribuição dos modificadores utilizados na construção do biossensor	32

5.4.	Princípio de funcionamento do biossensor proposto	33
5.5.	Estudo de Impedância Eletroquímica	34
5.6.	Otimização do Método.....	35
5.6.1.	<i>Proporção dos modificadores</i>	35
5.6.2.	<i>Estudo da natureza e pH do eletrólito suporte</i>	36
5.6.3.	<i>Parâmetros da SWV</i>	37
5.7.	Avaliação de Alguns Parâmetros de Validação do Método para Análise de Rutina utilizando o Biossensor Proposto.....	39
5.7.1.	<i>Curva de calibração</i>	39
5.7.2.	<i>Estudos de repetibilidade, reprodutibilidade, estabilidade e interferente</i>	41
5.8.	Estudo de Recuperação e Determinação de Rutina	41
6.	CONCLUSÃO	44
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Componentes utilizados no desenvolvimento de biossensores.....	13
Figura 2. Gráfico da velocidade da reação em função da concentração do substrato, para uma enzima que obedeça à cinética de Michaelis-Menten	15
Figura 3. Representação do sítio ativo das lacases.	16
Figura 4. Estrutura de α -, β -, e γ -CD.....	18
Figura 5. Representação generalizada da reação de redução de espécies radicalares por compostos fenólicos.	19
Figura 6. Estrutura química da rutina.	20
Figura 7. Forma de aplicação do potencial na SWV. A corrente é medida nas regiões 1 e 2, pulso direto e reverso, respectivamente.	22
Figura 8. Determinação da atividade enzimática da lacase livre e imobilizada pelo método espectrofotométrico.....	29
Figura 9. Estudo da estabilidade enzimática da LAC livre e imobilizada (AuNP-CD-LAC) acompanhada durante 24 dias.....	31
Figura 10. Imagens de TEM para (A) AuNP-CD e (B) AuNP-CD-LAC. Inserido: Histogramas referentes a aproximadamente 300 partículas.....	32
Figura 11. (A) Voltamogramas de SWV obtidos usando diferentes eletrodos: (a) EPC sem modificação, (b) EPC-CD, (c) EPC-LAC, (d) EPC-AuNP-CD, (e) EPC AuNP-CD-LAC em solução tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0) contendo $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de rutina em incremento de 10 mV, amplitude de 40 mV e frequência de 100 Hz. (B) Resposta relativa.	33
Figura 12. Representação esquemática da oxidação da rutina catalisada pela enzima com subsequente redução eletroquímica da espécie formada sobre a superfície do biossensor.....	34
Figura 13. Espectroscopia de impedância eletroquímica para diferentes eletrodos em solução de $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl. A amplitude da perturbação aplicada foi de 10 mV, potencial de circuito aberto, e a faixa de frequência aplicada de 100.000 a 0,1 Hz.....	35

Figura 14. Estudo da concentração de enzima no biossensor, realizado em $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de rutina em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0).	36
Figura 15. Estudo da natureza do pH de eletrólito suporte sobre a corrente e potencial de pico resultante do biossensor em $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de rutina em solução tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,0 a 5,0) e fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0 e 7,0) por SWV.....	37
Figura 16. Investigação dos parâmetros de SWV sobre a resposta analítica do biossensor proposto em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de solução tampão acetato (pH 5,0) contendo $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de rutina. (A) Estudo da frequência; (B) Estudo do incremento; (C) Estudo da amplitude.....	39
Figura 17. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos utilizando o biossensor proposto em solução tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0) e soluções de rutina, nas seguintes concentrações: (a) $2,99 \times 10^{-7}$ (b) $5,98 \times 10^{-7}$ (c) $8,97 \times 10^{-7}$ (d) $1,19 \times 10^{-6}$ (e) $1,49 \times 10^{-6}$ (f) $2,08 \times 10^{-6}$ (g) $2,67 \times 10^{-6}$ (h) $3,26 \times 10^{-6}$ (i) $3,85 \times 10^{-6}$ (j) $4,43 \times 10^{-6}$ (k) $5,01 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ com uma frequência de 100 Hz, amplitude do impulso 40 mV e incremento de varredura 10 mV. (B) Curva de calibração para rutina.	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Recuperação de rutina em amostras farmacêuticas usando o biossensor proposto. 42

Tabela 2. Determinação de rutina em amostras farmacêuticas por SWV e UV. 43

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS - Sal de amônio do ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6- sulfônico)

Ag/AgCl - Eletrodo de referência de prata/cloreto de prata

AuNP - Nanopartículas de ouro

AuNP-CD - Nanopartículas de ouro estabilizada em ciclodextrina

AuNP-CD-LAC - Nanopartículas de ouro estabilizada em ciclodextrina e imobilizada com Lacase

CD - β -ciclodextrina

CDs – Ciclodextrinas

EPC - Eletrodo de pasta de carbono (do inglês, carbono paste electrode)

K_M - Constante de Michaelis-Menten

LAC – Lacase

LOD - Limite de detecção (do inglês, limit of detection)

LOQ - Limite de quantificação (do inglês, limit of quantitation)

NPM - Nanopartículas metálicas

R_{ct} - Resistência à transferência de carga (do inglês, charge-transfer resistance)

RSD – Desvio padrão relativo (do inglês, relative standard deviation)

SWV - Voltametria de onda quadrada (do inglês, square wave voltammetry)

TEM - Microscopia Eletrônica de Transmissão

RESUMO

Nesse trabalho foi construído um biossensor de pasta de carbono contendo nanopartículas de ouro (AuNP) estabilizadas em β -ciclodextrina (CD) e imobilizadas com lacase (LAC) para a determinação de rutina em amostras farmacêuticas. Inicialmente, realizou-se a síntese das AuNP, utilizando CD como agente estabilizante e borohidreto de sódio como agente redutor. Uma solução de LAC foi obtida a partir de microrganismos geneticamente modificados (*Aspergillus oryzae*) e sua atividade foi medida por espectrofotometria UV-Visível. A solução de LAC foi misturada a AuNP-CD, obtendo-se uma dispersão contendo LAC imobilizada no nanomaterial. As dispersões de AuNP-CD e AuNP-CD-LAC foram caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM), medidas espectrofotométricas e de potencial Zeta. Vários parâmetros do método foram investigados e a melhor resposta foi obtida em tampão acetato (0,1 mol L⁻¹; pH 5,0), 50 μ L de AuNP-CD-LAC e 1,145 U mL⁻¹ de LAC (construção do biossensor), amplitude 40 mV, frequência 100 Hz e incremento 10 mV (voltametria de onda quadrada). Sob as condições previamente otimizadas a curva de calibração para rutina apresentou duas faixas lineares. A primeira (faixa I) de $3,0 \times 10^{-7}$ a $1,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ ($r^2 = 0,9949$), com limite de detecção de $1,73 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e a segunda (faixa II) de $2,10 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ a $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ ($r^2 = 0,9944$) com limite de detecção de $5,85 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. O biossensor proposto foi empregado na determinação de rutina em fármacos (cápsulas e creme) e os resultados obtidos mostraram-se de acordo com os valores rotulados e com o método de referência empregado.

Palavras-chave: biossensor, lacase, nanopartícula de ouro, ciclodextrina, rutina.

1. INTRODUÇÃO

A rutina pertence à classe de compostos fenólicos conhecida como flavonoides. Os flavonoides são encontrados na natureza em sementes e grãos de frutas, vegetais e diferentes plantas medicinais. Essa classe de substâncias naturais apresenta um largo espectro de atividades bioquímicas e farmacológicas incluindo efeitos antioxidantes, vasodilatadores, anti-inflamatórios, anti-alérgicos, antivirais e estimulantes do sistema biológico. Por apresentar essas propriedades interessantes, a rutina é muito utilizada em formulações cosméticas e farmacêuticas para uso externo (cremes, géis, pomadas, *sprays*, membranas para liberação controlada de fármacos), melhorando principalmente os sintomas de insuficiência dos vasos linfáticos e venosos e diminuindo a fragilidade capilar.

Técnicas eletroanalíticas, como a voltametria de onda quadrada associada ao uso de biossensores enzimáticos, por exemplo, são muito empregadas na determinação de compostos fenólicos nos mais diversos tipos de amostras (alimentícias, clínicas, farmacêuticas e ambientais, entre outras). A voltametria de onda quadrada é uma técnica voltamétrica de pulso rápida e sensível que apresenta baixo custo de instrumentação e manutenção, facilidade de operação, baixos limites de detecção, boa sensibilidade e seletividade na detecção e quantificação de diversos analitos. Por estes motivos, esta técnica voltamétrica vem sendo uma alternativa interessante em relação a outras técnicas de análises como a cromatografia e a espectrofotometria, por exemplo.

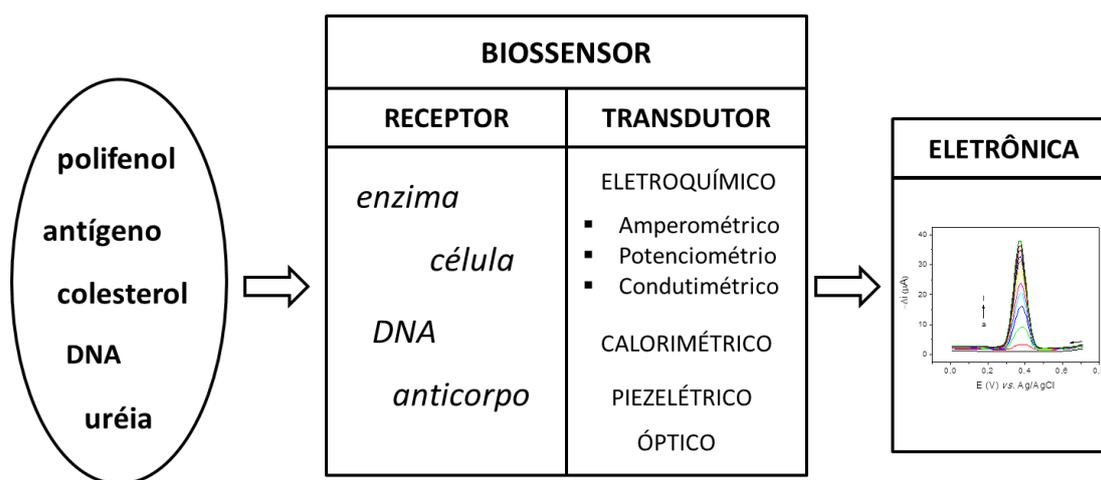
Portanto, o presente trabalho visa à construção de um novo biossensor a base de pasta de carbono modificado com a enzima lacase e nanopartículas de ouro para a determinação de rutina em amostras farmacêuticas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Biossensores

Biossensor é um dispositivo analítico no qual um material biológico (enzimas, tecidos, DNA, anticorpos) é imobilizado na superfície de um transdutor adequado. O material biológico atua como um receptor e tem a função de reconhecer e interagir seletivamente com o analito, resultando na alteração de uma ou mais propriedades físico-químicas (por exemplo, a transferência de elétrons e a variação de massa) que são detectadas e podem ser medidas pelo transdutor. O transdutor, por sua vez, converte esse sinal biológico em um sinal mensurável (corrente elétrica ou diferença de potencial elétrico, por exemplo).^{1,2} Em biossensores eletroquímicos as medidas baseiam-se na transferência de elétrons que ocorre na interface eletrodo-solução, sendo que a corrente medida é diretamente proporcional à concentração de espécies eletroativas que são oxidadas ou reduzidas na superfície dos eletrodos.³ A Figura 1 mostra o princípio de funcionamento e os componentes que constituem um biossensor.

Figura 1. Componentes utilizados no desenvolvimento de biossensores.⁴



Dentre os materiais mais utilizados na construção de biossensores têm destaque: ouro, carbono vítreo e a pasta de carbono. Esses substratos podem ser modificados com uma grande variedade de materiais (por exemplo,

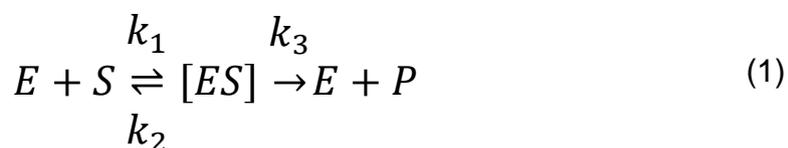
anticorpo, enzimas, nanopartículas, surfactantes, líquidos iônicos) melhorando a seletividade e a sensibilidade desses dispositivos. Os eletrodos construídos a base de pasta de carbono oferecem vantagens em relação ao baixo custo, facilidade na construção e renovação da superfície.^{1,3-7}

Desde o desenvolvimento do primeiro biossensor conhecido como “eletrodo enzimático”, construído por Clark & Lyons em 1962, diversos outros biossensores foram construídos empregando diferentes tipos de materiais biológicos.^{8,9} Neste contexto, a utilização de enzimas no desenvolvimento de biossensores resulta em sensores altamente seletivos e sensíveis.¹⁰

2.2. Enzimas

Enzimas são macromoléculas (proteínas) que atuam como catalisadores em reações biológicas. O catalisador não altera a constante de equilíbrio da reação e atua diminuindo a energia de ativação da reação, acelerando vários tipos de reações de conversão de substratos em produtos.^{11,12} As reações ocorrem em uma parte específica da enzima chamada de sítio ativo, e as moléculas que interagem com esse sítio são chamadas de substratos.¹¹

Uma teoria para explicar as características cinéticas apresentadas por muitas enzimas foi proposta em 1913 por Leonor Michaelis e Maud Menten. A teoria baseia-se em uma enzima (E) que se combina com um substrato (S), para formar um complexo enzima-substrato (ES), o qual pode prosseguir para formar um produto (P), ou dissociar em E e S, de acordo com a Equação 1.



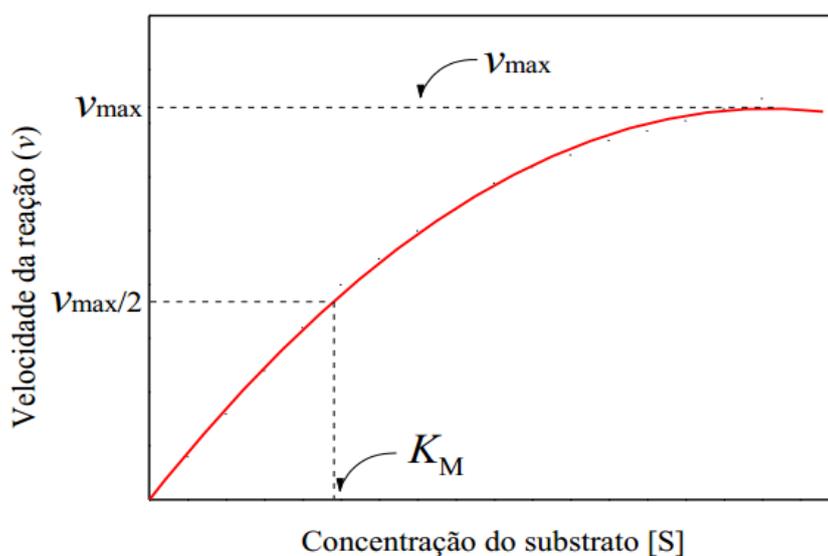
A velocidade v de formação do produto é dada pela Equação 2 (Equação de Michaelis-Menten) na qual v_{\max} é a velocidade quando a enzima está totalmente saturada com substrato, e KM (constante de Michaelis-Menten) é a concentração de substrato na qual a velocidade de reação é metade da máxima ($v_{\max}/2$). Essa constante é característica de um substrato para uma

enzima específica, fornecendo um parâmetro de especificidade entre substrato-enzima.

$$V = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (2)$$

De acordo com a Figura 2, a velocidade de catálise v varia com a concentração do substrato $[S]$, onde v é definida como o número de moléculas de produto formadas por segundo. Pode-se observar que v é quase linearmente proporcional a $[S]$, quando $[S]$ é baixa; porém, em alta $[S]$, v é quase independente de $[S]$.^{11,13}

Figura 2. Gráfico da velocidade da reação em função da concentração do substrato, para uma enzima que obedeça à cinética de Michaelis-Menten.¹³



2.2.1. Enzima lacase

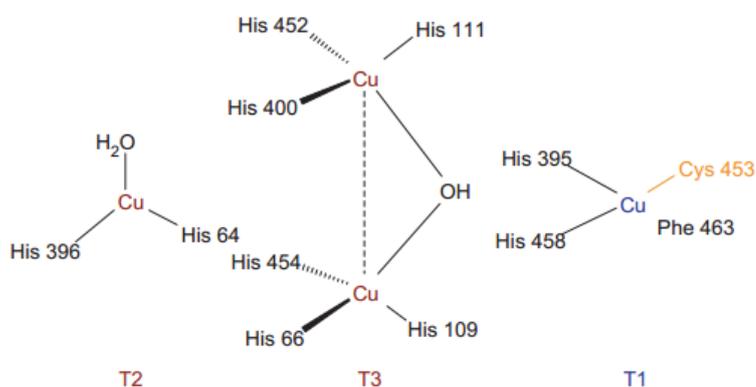
A lacase (LAC) pertence à classe das oxirredutases, mais especificamente à família das oxidases “multicobre”, sendo encontrada na natureza, incluindo: plantas, bactérias, insetos e, principalmente, fungos.^{13,14}

As lacases vêm sendo estudadas pelas várias aplicações biotecnológicas, tais como biotransformação de xenobióticos e efluentes

industriais, biorremediação de solos contaminados, produção de bioetanol, clarificação de vinhos e chás e são amplamente empregadas, como modificadores, no desenvolvimento de biossensores, pois catalisam a oxidação de uma grande variedade de compostos, em especial compostos fenólicos com a redução simultânea de oxigênio molecular à água.¹⁴⁻¹⁷

Sua estrutura é constituída por quatro átomos de cobre, de três diferentes tipos, localizados um em cada sítio Tipo 1 e Tipo 2 e dois no sítio Tipo 3, conforme apresenta a Figura 3. Estes átomos desempenham importante papel nos mecanismos catalíticos desta enzima e são caracterizados pela distribuição espectral no UV-Vis e características de ressonância paramagnética eletrônica (EPR). O sítio Tipo 1 (sítio mononuclear) é onde acontece a primeira oxidação do substrato. Este sítio possui uma banda de absorção em 600 nm sendo responsável pela cor azul da LAC em solução aquosa. O cobre Tipo 2 possui absorção fraca na região do visível, mas é ativa no EPR. Já o cobre Tipo 3 apresenta absorção próximo de 300 nm.^{18,19}

Figura 3. Representação do sítio ativo das lacases.¹⁷



2.2.2. Imobilização enzimática

Imobilização é um termo genérico empregado para descrever a retenção de uma biomolécula em um suporte, que tem como principal finalidade a proteção da atividade e estabilidade da enzima durante os processos onde são empregadas. As características apresentadas pelas enzimas imobilizadas

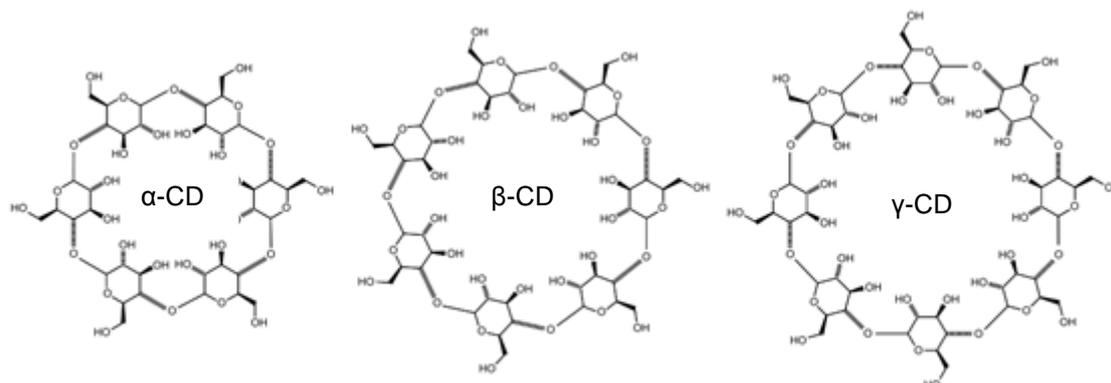
dependem tanto de suas propriedades como do suporte e dos reagentes usados na imobilização, os quais devem ser criteriosamente escolhidos para não alterar o sítio ativo da enzima. São indiscutíveis as vantagens fornecidas por este processo, assim, vários procedimentos de imobilização de enzimas têm sido desenvolvidos.^{16,19,20,21} De um modo geral, estes métodos podem ser classificados como físicos, onde existem fracas interações entre enzima-suporte, e químicos onde a enzima é quimicamente ligada ao suporte por ligações covalentes.^{22,23}

Como descrito anteriormente, enzimas são biocatalisadores com elevada especificidade que têm sido utilizadas nas indústrias alimentícia, têxtil e de papel, bem como na construção de biossensores. Entretanto, essas biomoléculas estão sujeitas à inativação por diversos fatores físicos e químicos durante sua utilização ou até mesmo estocagem. Assim, a imobilização deste componente biológico tem se mostrado uma poderosa ferramenta para melhorar quase todas as suas propriedades, entre as quais destacamos: facilidade de recuperação e reutilização e, com isto, um aumento no tempo de vida útil e na estabilidade enzimática em relação à temperatura, aos solventes orgânicos e à variação de pH sem perda de sua eficiência catalítica. Uma infinidade de materiais vem sendo empregado em processos de imobilização com o propósito de se obter biocatalisadores mais eficientes, em comparação à sua forma livre, tais como: ciclodextrina, quitosana, quitina, alginato, celulose, entre outros.^{16,21-24}

Ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos formados por moléculas de D-glicose unidas através de ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow4)$, obtidas por hidrólise enzimática do amido. As CDs mais conhecidas são as α , β e γ -CD (Figura 4), constituídas por 6, 7 e 8 unidades de glicose, respectivamente, que adotam a conformação de cadeira. A orientação cíclica estabelece uma estrutura cônica tubular e esse arranjo estrutural confere a estes açúcares propriedades físico-químicas únicas, sendo capazes de encapsular em sua cavidade moléculas hidrofóbicas. Frente a este aspecto molecular, a grande habilidade em formar complexos de inclusão com moléculas pouco polares, tem possibilitado a utilização de CD (em especial, β -CD) em diferentes áreas da ciência e tecnologia. Esses materiais vêm sendo empregados como matriz

para imobilização e estabilização de enzimas para posterior aplicação em biossensores.²⁵⁻²⁸

Figura 4. Estrutura de α -, β -, e γ -CD.



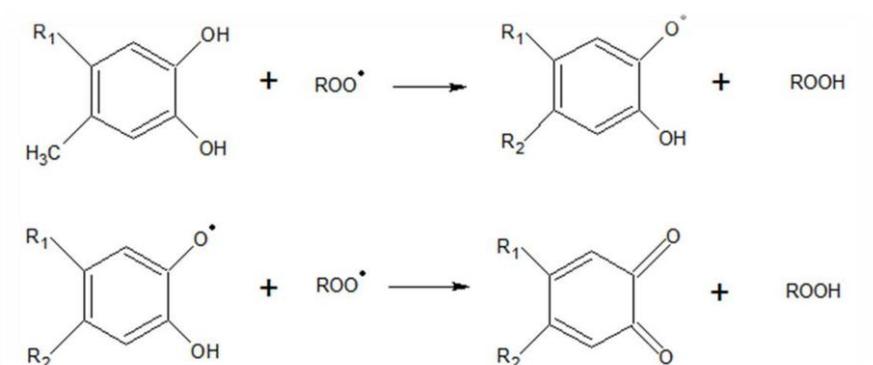
2.3. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos naturais são originados do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução. Compreendem uma ampla variedade de moléculas que possuem anel aromático, contendo um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Eles são divididos em várias classes de acordo com o número de anéis fenólicos que contêm e dos elementos estruturais que esses anéis possuem, como fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonóides, taninos e ligninas que são, na maioria das vezes, suscetíveis à ação de enzimas.^{29,30} Os flavonóides e os ácidos fenólicos são os que mais se destacam e, são considerados os antioxidantes fenólicos mais comuns de fontes naturais. Estas substâncias são amplamente distribuídas no reino vegetal, sendo encontradas em frutas e vegetais.³¹

A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na

estrutura destas substâncias interrompendo desta forma cadeias de reação oxidativa.³² A Figura 5 mostra um esquema do mecanismo antioxidante, de forma generalizada, para compostos fenólicos.

Figura 5. Representação generalizada da reação de redução de espécies radicalares por compostos fenólicos.

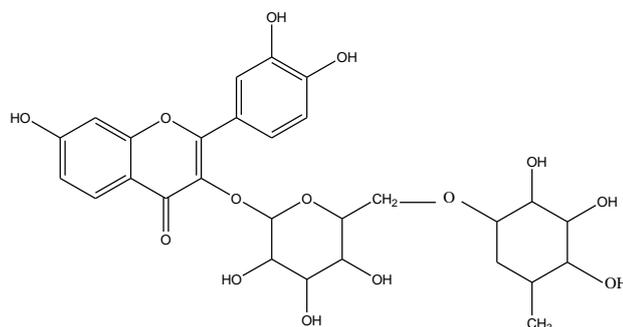


Desta forma, esses compostos são considerados importantes, pois em sua maioria, apresentam excelente atividade farmacológica além de inibirem a oxidação lipídica e a proliferação de fungos. Esses compostos também são responsáveis pela cor, adstringência e aroma em alimentos e bebidas e nas aplicações industriais.^{29,33}

2.3.1. Rutina

A rutina (Figura 6) é um derivado de flavona encontrada amplamente no reino vegetal em cebolas, maçãs, chá, tomates e trigo sarraceno. Por apresentar uma grande diversidade de atividade farmacológica, devido as suas propriedades antioxidantes e vasoprotetoras, é amplamente empregada em fármacos de efeito antiinflamatório, antialérgico, antiviral, e com propriedades anticancerígena.³⁴

Figura 6. Estrutura química da rutina.



Os métodos para a determinação de rutina incluem espectrofotometria, eletroforese capilar e eletroquímica. Neste contexto, os métodos eletroquímicos que empregam biossensores modificados com nanopartículas metálicas, nanotubos de haloisita, líquido iônico e polímeros, por exemplo, apresentam vantagens em relação aos demais métodos, devido ao seu baixo custo, simplicidade e tempo de resposta rápido.^{20,35}

2.4. Nanomateriais

Nanopartículas metálicas (NPM), especialmente de ouro, prata e platina, estão entre as nanoestruturas mais estudadas e aplicadas na construção de biossensores, pois além de apresentarem as características únicas de um nanomaterial (eletrônicas, magnéticas, ópticas e eletroquímicas), quando aplicadas no desenvolvimento de biossensores, as NPM também oferecem um microambiente biocompatível para imobilização de enzimas, preservando a atividade catalítica destas biomoléculas, e favorecendo a reação de transferência de elétrons entre a enzima e a superfície do biossensor. Dentre as propriedades desses nanomateriais, destacam-se a área superficial específica e a elevada atividade catalítica que está associada ao seu tamanho e composição.³⁶⁻⁴⁰

Neste sentido, biossensores construídos com nanomateriais têm apresentado resultados promissores, como aumento na sensibilidade, estabilidade e velocidade de resposta, trazendo vantagens para aplicação destes dispositivos em análises clínicas, monitoramento ambiental, segurança

alimentar e controle de qualidade de produtos.^{38,41-43} Tais avanços representam o grande potencial destes biossensores, que são uma alternativa interessante para análises rápidas e de fácil utilização para aplicações em amostras reais.

2.5. Técnicas Voltamétricas

A voltametria é uma técnica eletroanalítica dinâmica, que se baseia na medida da corrente elétrica em uma cela eletroquímica com sistema de três eletrodos: eletrodo de trabalho, eletrodo de referência e contra-eletrodo, na qual a velocidade de oxidação ou redução do analito é limitada pela velocidade de transferência de massa na superfície do eletrodo indicador. Esta corrente elétrica é medida em função da aplicação controlada de um potencial, gerando as curvas denominadas voltamogramas.⁴⁴

No eletrodo de trabalho ocorre a reação de oxirredução da espécie eletroativa. Este eletrodo pode ser composto por diferentes substratos (carbono, ouro e prata, por exemplo) e, ainda, pode ser modificado com diversos materiais (AuNP, líquido iônico, nanotubos de haloisita, ciclodextrina, polímeros e enzimas) a fim de melhorar a sensibilidade deste sensor. O eletrodo de referência, usualmente um eletrodo de Ag/AgCl, permite o monitoramento do potencial do eletrodo de trabalho. O contra-eletrodo, que geralmente é um fio de platina, atua no controle da corrente necessária para sustentar a eletrólise que ocorre no eletrodo de trabalho. Nesta situação, a corrente passará entre o eletrodo de trabalho e o auxiliar, evitando que ocorram distúrbios (como eletrólise, por exemplo) no eletrodo de referência, o que acarretaria uma mudança no seu potencial, deixando de atuar como uma referência.^{45,46}

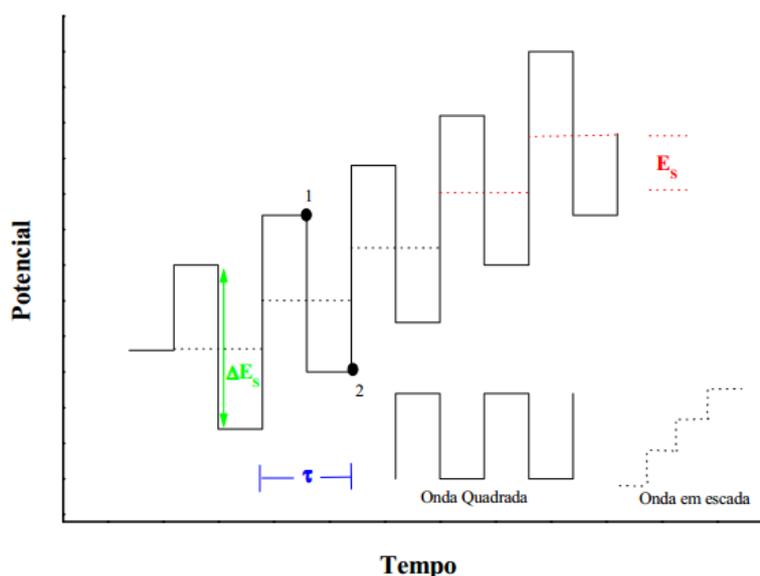
2.5.1. Voltametria de Onda Quadrada

Dentre as técnicas voltamétricas, a voltametria de onda quadrada (SWV, do inglês, square wave voltammetry) se destaca por apresentar elevada sensibilidade (com limites de detecção na ordem de 10^{-7} a 10^{-8} mol L⁻¹) e por apresentar rápido tempo de análise (velocidades de varredura superiores a 100

mV s^{-1}). Além disso, essa técnica minimiza o efeito da corrente capacitiva, uma vez que, a corrente é medida ao final de cada pulso de potencial onde a corrente capacitiva se torna negligenciável.^{45,47,48}

Na SWV, a forma da curva de corrente-potencial é proveniente da aplicação de potenciais de altura ΔE_s (amplitude do pulso de potencial), que variam de acordo com uma escada de potencial com largura E_s (altura do degrau) e período τ (duração dos pulsos). O sinal de excitação do potencial *versus* tempo na SWV está representado na Figura 7 e é obtido pela sobreposição de uma sequência de pulsos de onda quadrada sobre um sinal na forma de escada.⁴⁷

Figura 7. Forma de aplicação do potencial na SWV. A corrente é medida nas regiões 1 e 2, pulso direto e reverso, respectivamente.⁴⁷



As correntes elétricas são medidas ao final dos pulsos diretos e reversos e o sinal é obtido, de forma diferencial, como uma intensidade da corrente resultante (Δi), que é diretamente proporcional à concentração do analito.^{45,47}

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Desenvolver um biossensor à base de pasta de carbono modificado com nanopartículas de ouro (AuNP) estabilizadas em β -ciclodextrina (CD) e imobilizadas com LAC para determinação de rutina em amostras farmacêuticas por voltametria de onda quadrada.

3.2. Objetivos específicos

- Obter uma solução enzimática da lacase, produzida por microrganismos geneticamente modificados (*Aspergillus oryzae*), a partir de microesferas;
- Determinar a atividade da enzima lacase livre e imobilizada em AuNP-CD por método espectrofotométrico;
- Sintetizar as AuNP-CD;
- Caracterizar as AuNP-CD e AuNP-CD-LAC por microscopia eletrônica de transmissão (TEM), potencial zeta e espectrofotometria UV-Visível;
- Construir um biossensor a base de pasta de carbono modificado com AuNP-CD-LAC;
- Otimizar as condições experimentais do método: natureza e pH do eletrólito suporte, concentração e proporção dos modificadores, e parâmetros da técnica de voltametria de onda quadrada (frequência, amplitude e incremento);
- Realizar estudos de estabilidade, repetibilidade e reprodutibilidade do biossensor proposto;
- Aplicar o biossensor proposto para determinação de rutina em amostras farmacêuticas;
- Comparar o teor de rutina, nas amostras analisadas, utilizando o biossensor proposto, com um método comparativo.

4. METODOLOGIA

4.1. Reagentes e soluções

As soluções foram preparadas empregando água destilada e todos os reagentes utilizados no preparo das soluções foram obtidos comercialmente, em grau analítico, e não passaram por processo extra de purificação.

Soluções tampão fosfato na concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas utilizando uma mistura de monohidrogenofosfato e dihidrogenofosfato de potássio (Vetec). O ajuste do pH destas soluções foi realizado na faixa de 6,0 e 7,0 através da adição de hidróxido de sódio (Sigma-Aldrich) ou ácido fosfórico (Nuclear) conforme necessário.

Soluções tampão acetato na concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas usando uma mistura de acetato de sódio (Sigma-Aldrich) e ácido acético (Vetec). O ajuste do pH destas soluções foi realizado na faixa de 3,0 a 5,0, através da adição de hidróxido de sódio (Sigma-Aldrich) ou ácido acético.

Solução padrão de rutina (Sigma-Aldrich) foi preparada antes de cada estudo na concentração de $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em etanol. Soluções de menor concentração foram feitas a partir deste estoque.

Borohidreto de sódio, 20 mmol L^{-1} , (Nuclear), β -ciclodextrina (0,5%; m/v) e cloreto de ouro trihidratado ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) obtidos da Sigma-Aldrich foram empregados na síntese das AuNP-CD.

Para construção dos sensores/biossensores foi empregado grafite em pó (Acheson 38 Fisher Scientific) e óleo mineral Nujol (Aldrich) como agente aglutinante. A Lacase Denilite® II BASE, produzida a partir de organismos geneticamente modificados (*A. oryzae*), foi fornecida pela Novozymes (Dinamarca).

Para a determinação da atividade enzimática foi utilizado 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato), ABTS, (Sigma-Aldrich) em concentração de $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ e solução diluída de lacase.

4.2. Equipamentos e medidas eletroquímicas

As medidas eletroanalíticas foram realizadas em uma cela eletroquímica com capacidade aproximada de 15 mL com tampa contendo orifícios circulares para encaixe de um sistema de três eletrodos: o biossensor proposto (eletrodo de trabalho), um eletrodo de Ag/AgCl ($\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$) (eletrodo de referência) e uma placa de platina como eletrodo auxiliar. Foram adicionados a cela eletroquímica 10,0 mL de solução tampão ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), usado como eletrólito suporte, juntamente com alíquotas da solução padrão de rotina, submetidas a um tempo de agitação de 60 s à temperatura ambiente (25°C) para homogeneização completa.

Um Potenciostato/Galvanostato Autolab PGSTAT101 conectado a um computador contendo o software NOVA (versão 1.10), para o processamento dos dados, foi empregado na realização das medidas eletroanalíticas. As medidas de pH foram realizadas utilizando um pHmetro Micronal modelo B-475 contendo um eletrodo de vidro combinado. Um banho ultrassônico Unique 1400A foi utilizado para auxiliar no preparo das soluções. Um espectrofotômetro Micronal modelo B-572 e uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm foram utilizados para a determinação da atividade enzimática da LAC.

4.3. Obtenção da solução enzimática

Inicialmente foram pesados 5,0 g das microcápsulas Denilite® II BASE e maceradas com auxílio de almofariz e pistilo. O material obtido foi transferido para um béquer onde foram adicionados 50,0 mL da solução tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0). A suspensão foi deixada sob agitação magnética durante 30 minutos à temperatura ambiente (25°C). Em seguida, a mistura foi filtrada com papel filtro pregueado (porosidade de $14,0 \mu\text{m}$) e armazenada em um frasco âmbar sob refrigeração. A solução enzimática preparada foi utilizada como fonte da enzima lacase para a construção dos biossensores.

4.4. Determinação da atividade enzimática

Uma unidade de atividade enzimática pode ser definida como a quantidade de enzima que catalisa uma reação com velocidade de formação de um μmol de substrato por minuto.⁴⁸

A atividade enzimática da LAC livre e imobilizada foram determinadas por espectrofotometria UV-visível acompanhando a variação da absorvância da reação de oxidação do substrato, sal de amônio do ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS), em 420 nm. Na cubeta de quartzo de 3,0 mL foram adicionados 2,8 mL da solução de ABTS ($0,50 \text{ mmol L}^{-1}$) e 0,20 mL da solução enzimática diluída. As medidas de absorvância foram realizadas em triplicatas, com intervalos de três a cinco dias, utilizando a média das absorvâncias para construir o gráfico de Absorvância vs. Tempo (min). Os valores foram registrados a cada 20 segundos, do início da reação, até que completasse o tempo de 2 minutos.

4.5. Síntese e caracterização das AuNP-CD e AuNP-CD-LAC

As AuNP-CD foram sintetizadas pelo seguinte procedimento: 100 μL de uma solução aquosa de HAuCl_4 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) foram adicionados a 10 mL de uma solução de CD a 0,5% (w/v), sob agitação, seguido de uma adição rápida de 200 μL de borohidreto de sódio (20 mmol L^{-1}), mantendo agitação mecânica por aproximadamente 30 minutos. Observou-se como resultado uma mudança de coloração da dispersão para vermelha, indicando a formação das AuNP-CD. Esta dispersão foi pré-concentrada cerca de 20 vezes utilizando uma centrífuga com agitação de 8000 RPM a 4°C por 10 minutos, para posteriormente ser empregada na construção do biossensor.

A imobilização da LAC sobre as AuNP foi realizada através da mistura da solução enzimática com a dispersão de AuNP-CD (razão 1:1, v/v), acompanhada pela alteração da coloração de vermelha para roxa. As dispersões de AuNP-CD e AuNP-CD-LAC foram caracterizada através de microscopia eletrônica de transmissão (TEM), em um microscópio JEOL JEM-1011 (no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica – LCME/UFSC),

medidas de potencial Zeta (Zetasizer Nano ZS, Malvern) e espectrofotométricas (Cary 60 UV-Vis, Agilent).

4.6. Construção do Biossensor

A construção do biossensor proposto foi realizada da seguinte maneira: primeiramente 50 μL de AuNP-CD-LAC concentrada (1:1, v/v) foi depositado sob 150 mg de grafite em pó e este material ficou sob vácuo durante 24 horas, para secagem. Após esse período, foi adicionado 3 gotas de Nujol e este material macerado por 15 minutos com auxílio de almofariz e pistilo para homogeneização completa da pasta. A pasta obtida foi transferida para uma seringa de plástico (capacidade: 1,0 mL; diâmetro interno: 1,0 mm). Por último, um fio de cobre de dimensões 0,4 cm x 10,0 cm foi inserido para obter o contato elétrico. O biossensor preparado foi utilizado como o eletrodo de trabalho.

Outros sensores foram preparados a fim de avaliar a contribuição de cada modificador empregado neste trabalho. Foram preparados quatro diferentes sensores: um sensor não modificado (EPC), um sensor modificado com CD (EPC-CD), um sensor modificado com AuNP-CD (EPC-AuNP-CD), um biossensor modificado com LAC livre (EPC-LAC), além do biossensor proposto (EPC-AuNP-CD-LAC).

4.7. Preparo das amostras e determinação de rotina

Foram utilizadas duas amostras de fármaco (cápsulas e creme) para a determinação de rotina empregando o biossensor proposto. As amostras foram obtidas em uma farmácia de manipulação de Florianópolis.

A amostra de cápsula, foi preparada a partir do conteúdo de 5 cápsulas de rotina enquanto a amostra de creme foi preparada a partir de 1,086 g de creme de rotina. As amostras foram solubilizadas em 250 mL de etanol e após foi realizada uma filtração simples para remover o material insolúvel/impurezas. Por fim foram armazenadas em um frasco âmbar sob refrigeração para evitar a degradação.

A determinação de rutina nas amostras foi realizada através do método de adição de padrão, por voltametria de onda quadrada. Alíquotas das amostras preparadas foram transferidas para a cela eletroquímica contendo o eletrólito suporte e quantificadas a partir das correntes resultantes obtidas no processo de oxirredução, após sucessivas adições da solução padrão de rutina. A determinação de rutina também foi feita pelo método espectrofotométrico de referência.⁴⁹

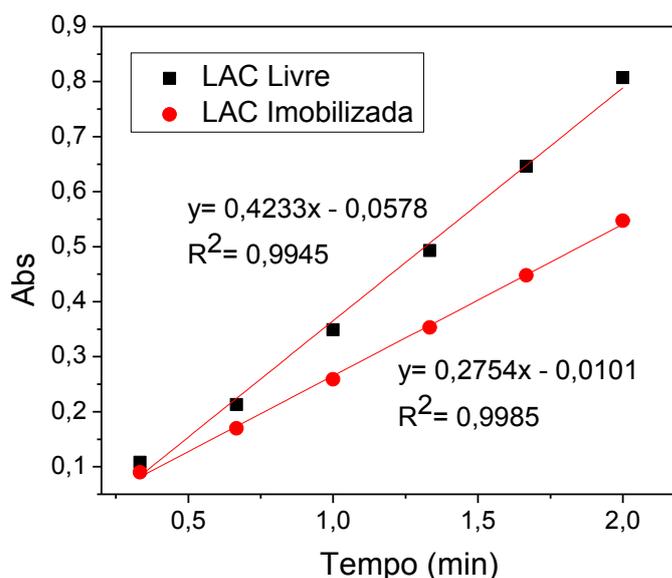
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Estudo da atividade e Estabilidade da Lacase

Após a obtenção da solução enzimática, a atividade da LAC foi investigada por espectrofotometria UV-Vis, acompanhando a reação de oxidação do ABTS pela LAC, medindo o aumento da absorvância no comprimento de onda de 420 nm. De acordo com o gráfico da absorvância vs. tempo (Figura 8), pode-se calcular a atividade da LAC através da Equação 3.

A partir dos valores de absorvância obtidos em função do tempo de reação, foi calculada a atividade enzimática dessa solução utilizando um fator de diluição (FD) igual a 100 e obteve-se 17,6 unidades mL⁻¹. Esta solução de LAC foi misturada a dispersão de AuNP-CD, resultando na imobilização da enzima neste nanomaterial (AuNP-CD-LAC). Então, foi realizada novamente a determinação da atividade, com a enzima imobilizada, utilizando um FD igual a 200 e obteve-se o valor de 22,9 unidades mL⁻¹. Isto indica que o processo de imobilização foi realizado com sucesso, aumentando a atividade da LAC e não desnaturando a enzima.

Figura 8. Determinação da atividade enzimática da lacase livre e imobilizada pelo método espectrofotométrico.



$$\text{Atividade Enzimática} = \frac{\Delta Abs \ t^{-1}}{\varepsilon \ b} \times V_t \times \frac{1}{V_e} \times 1000 \times FD \quad (3)$$

Sendo:

$\Delta Abs \ t^{-1}$ = coeficiente angular do gráfico de variação da absorbância vs. tempo (min);

ε_{420nm} = Absortividade molar ($36.000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$);⁵⁰

b= Caminho óptico (1 cm);

V_t = Volume total utilizado no ensaio (mL);

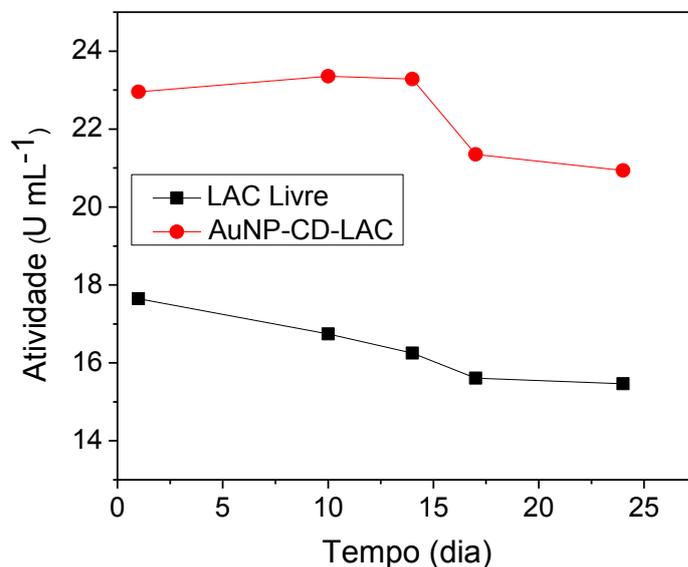
V_e = Volume da solução de lacase utilizado no ensaio (mL);

FD = Fator diluição (diluição da solução de lacase).

U = Unidades ($U = \text{mol min}^{-1}$)

A atividade enzimática da solução de LAC livre e da dispersão de AuNP-CD imobilizada com LAC foram acompanhadas durante 24 dias, sendo os dados desse estudo apresentados na Figura 9. Com base nesta investigação, optou-se em usar a solução logo que preparadas ou no máximo com 15 dias para garantir uma maior atividade catalítica. Além disso, pode-se observar que as enzimas imobilizadas (AuNP-CD-LAC) além de apresentarem maior atividade catalítica, também mantiveram a atividade por mais tempo.

Figura 9. Estudo da estabilidade enzimática da LAC livre e imobilizada (AuNP-CD-LAC) acompanhada durante 24 dias.



A solução enzimática de LAC foi utilizada como fonte de enzima no desenvolvimento deste trabalho por apresentar baixo custo, maior atividade enzimática quando comparada a lacase livre e ser de fácil preparo.

5.2. Caracterização das AuNP-CD e AuNP-CD-LAC

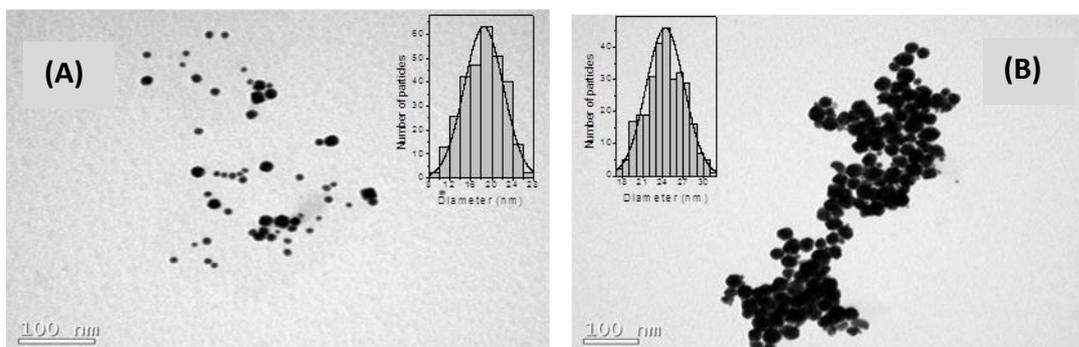
As propriedades dos nanomateriais (ópticas, elétricas, magnéticas, catalíticas, dentre outras) são fortemente dependentes do seu tamanho. Desta forma, é de suma importância a caracterização das AuNP-CD e AuNP-CD-LAC.^{30,51,52}

A síntese de AuNP foi realizada na presença de CD, que são moléculas de açúcar unidas em um anel (oligossacarídeos cíclicos), as quais tem a função de atuar como agente estabilizante, evitando a aglomeração das partículas nanométricas. Após a síntese, o nanomaterial foi caracterizado por espectrometria UV-Vis, TEM e medidas de potencial zeta.

A Figura 10 apresenta imagens de TEM de AuNP-CD e AuNP-CD-LAC. As partículas da dispersão de AuNP-CD apresentaram um diâmetro médio de 18,5 nm, que sofreu um ligeiro aumento após a adição da enzima LAC para

aproximadamente 24,3 nm, conforme pode ser observado através dos histogramas obtidos com base na análise de 300 partículas. Este aumento no tamanho das partículas é atribuído a presença das moléculas aniônicas de LAC (pI < 4), que interagem com a superfície positiva das AuNP-CD, sob as condições utilizadas na imobilização (pH ≈ 6,0). Essa proposta foi corroborada pelas medidas de potencial Zeta, que indicaram um potencial de +17,7 mV para a superfície das AuNP-CD e -29,5 mV para as AuNP-CD imobilizadas com LAC.

Figura 10. Imagens de TEM para (A) AuNP-CD e (B) AuNP-CD-LAC. Inserido: Histogramas referentes a aproximadamente 300 partículas.



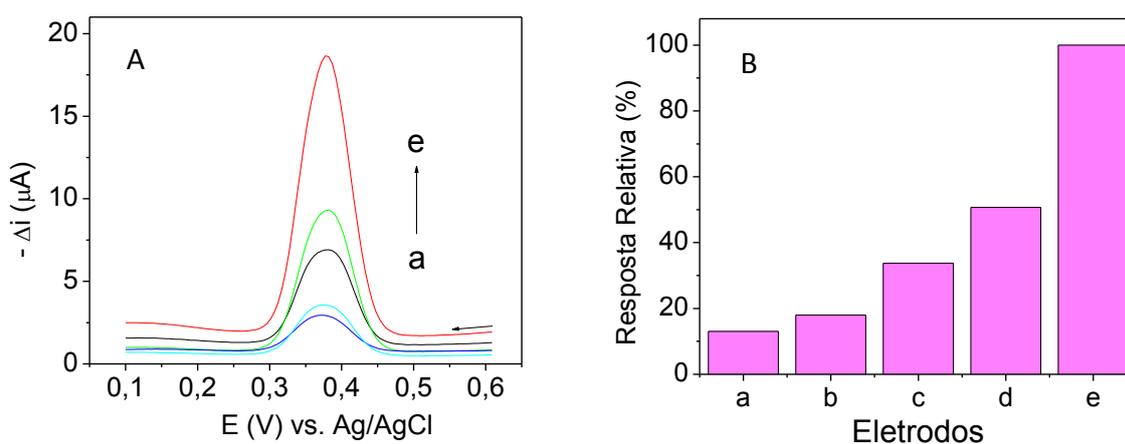
5.3. Estudo da contribuição dos modificadores utilizados na construção do biossensor

Diferentes eletrodos foram construídos a fim de avaliar a contribuição de cada modificador empregado neste trabalho. Os sensores investigados foram: EPC não modificado, EPC modificado com CD, EPC modificado com AuNP-CD, EPC modificado com LAC livre e EPC modificado com AuNP-CD-LAC (biossensor proposto). A Figura 11-A mostra os voltamogramas de onda quadrada obtidos utilizando os diferentes eletrodos. Todas as medidas foram realizadas em solução tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 5,0) contendo 3,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ de rutina.

A Figura 11-B mostra a resposta relativa obtida com cada eletrodo. Pode-se observar que, a presença da LAC no eletrodo “c” provoca um aumento de corrente em mais de 3 vezes em relação ao EPC não modificado “a”. A

presença apenas de CD (eletrodo “b”) não apresentou aumento significativo de resposta, já a presença de AuNP-CD (eletrodo “d”) apresentou um ganho de corrente aproximadamente igual ao do eletrodo contendo enzima livre. A presença da enzima imobilizada em AuNP-CD-LAC (eletrodo “e”) apresentou um aumento de cerca de 8 vezes em relação ao eletrodo “a”, confirmando que o uso deste material na construção do biossensor proposto é altamente promissor.

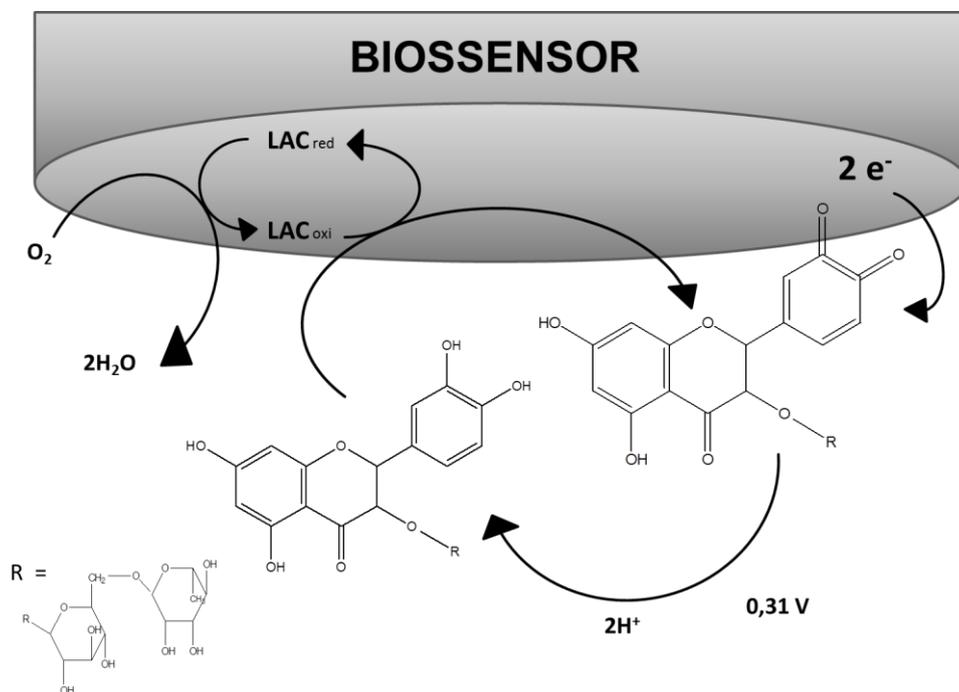
Figura 11. (A) Voltamogramas de SWV obtidos usando diferentes eletrodos: (a) EPC sem modificação, (b) EPC-CD, (c) EPC-LAC, (d) EPC-AuNP-CD, (e) EPC AuNP-CD-LAC em solução tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 5,0) contendo 3,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ de rutina em incremento de 10 mV, amplitude de 40 mV e frequência de 100 Hz. (B) Resposta relativa.



5.4. Princípio de funcionamento do biossensor proposto

A Figura 12 ilustra a representação esquemática da reação entre a rutina e a LAC na superfície do biossensor. A rutina em contato com a LAC catalisa a reação de oxidação com a simultânea redução do oxigênio molecular à água. A espécie formada é reduzida eletroquimicamente na superfície do biossensor com um potencial de +0,31 V vs. Ag/AgCl. A corrente resultante obtida na redução eletroquímica da espécie oxidada é proporcional à concentração de rutina em solução.

Figura 12. Representação esquemática da oxidação da rutina catalisada pela enzima com subsequente redução eletroquímica da espécie formada sobre a superfície do biossensor.



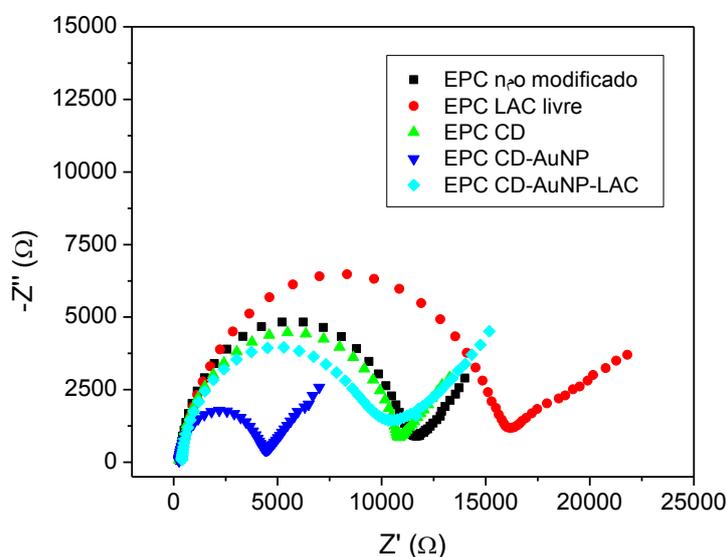
5.5. Estudo de Impedância Eletroquímica

Um estudo utilizando espectroscopia de impedância eletroquímica foi realizado a fim de se avaliar a resistência à transferência de carga (R_{ct}) na superfície dos eletrodos modificados em solução contendo $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$. A Figura 13 mostra os diagramas de Nyquist obtidos para diferentes eletrodos, sendo que o diâmetro do semicírculo indica a R_{ct} e a linha reta indica a contribuição da R_{ct} na superfície do biossensor.

Pode-se observar que a adição apenas de proteína ao eletrodo (EPC LAC livre) causa um aumento da R_{ct} , quando comparado ao EPC não modificado. Pode-se observar também que a adição de AuNP-CD ao eletrodo causou um decréscimo significativo da R_{ct} devido à elevada condutividade das NPM, e que a presença de enzima imobilizada neste material causou um aumento da R_{ct} , conforme esperado, mas que foi significativamente menor à R_{ct} do EPC contendo LAC livre, em virtude da presença do nanomaterial. A pequena contribuição da R_{ct} na superfície do biossensor proposto faz com que

ocorra um aumento na condutividade e como consequência um aumento na transferência de elétrons, mais espécies são oxidadas e reduzidas, resultando num ganho de corrente, sendo a mesma diretamente proporcional a concentração de analito na amostra.

Figura 13. Espectroscopia de impedância eletroquímica para diferentes eletrodos em solução de $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4}$ e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl. A amplitude da perturbação aplicada foi de 10 mV, potencial de circuito aberto, e a faixa de frequência aplicada de 100.000 a 0,1 Hz.



5.6. Otimização do Método

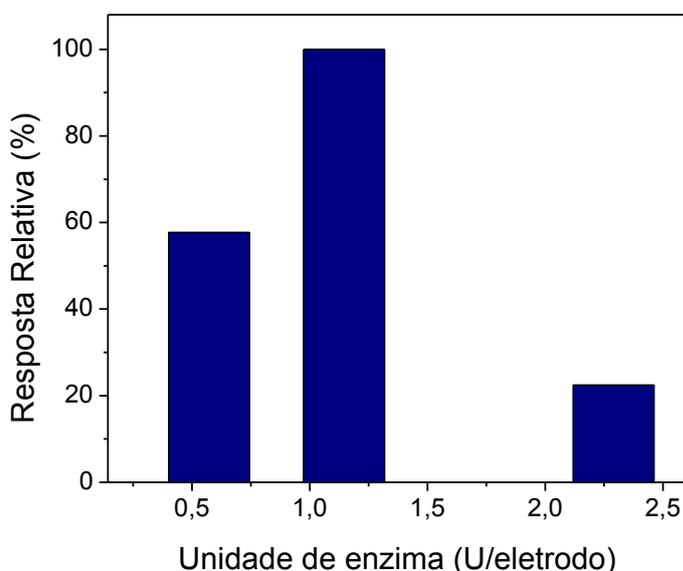
Para avaliar o desempenho do biossensor proposto, foram investigados parâmetros como a quantidade de modificadores (AuNP-CD e LAC), natureza e pH do eletrólito suporte além dos parâmetros da técnica de SWV (frequência, amplitude e incremento) utilizando $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de rutina.

5.6.1. Proporção dos modificadores

A influência do efeito da quantidade de LAC foi avaliada no intervalo de 0,570 a 2,290 unidades de LAC/eletrodo. A resposta analítica da

rutina aumentou com a concentração da enzima até 1,145 unidades de LAC/eletrodo e, após atingir o máximo, o valor da corrente exibiu uma ligeira diminuição (Figura 14), que pode ser atribuída aos efeitos de aumento da resistência, o que faz com que a transferência de elétrons seja dificultada. Além disso, foi avaliado a proporção de AuNP-CD no intervalo de 25 a 100 μL e a melhor resposta analítica foi em 50 μL . Portanto, a concentração 1,145 unidades de LAC/eletrodo e 50 μL de AuNP-CD foram selecionadas para construção dos biossensores.

Figura 14. Estudo da concentração de enzima no biossensor, realizado em $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de rutina em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0).



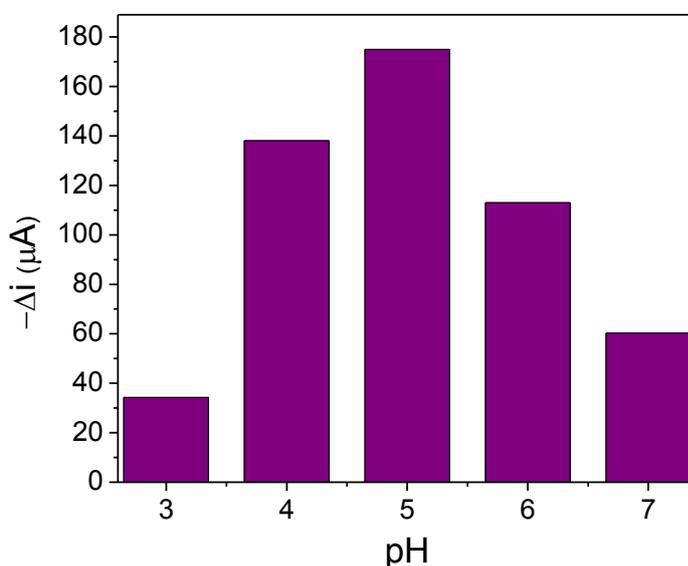
5.6.2. Estudo da natureza e pH do eletrólito suporte

A escolha de um eletrólito suporte apropriado é essencial para a sensibilidade dos biossensores visto que, quando adicionado em concentração a cerca de cem vezes maior que a da espécie eletroativa, pode conferir à solução e à interface uma série de propriedades como, por exemplo, alta solubilidade, alto grau de ionização. O eletrólito suporte também deve ser estável química e eletroquimicamente no solvente empregado. A faixa de pH utilizada também é de extrema importância, pois pode afetar o desempenho da

enzima (constituente do biossensor), uma vez que, cada enzima possui uma faixa de pH ótima em que mantém a máxima atividade e eficiência de catálise e, por consequência, o comportamento eletroquímico.^{46,53}

Desta forma, o pH foi avaliado na faixa de 3,0-5,0 para o tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e 6,0-7,0 para o tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$). O estudo foi realizado por SWV empregando $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de rutina. As respostas para diferentes valores de pH são mostradas na Figura 15 sendo que a máxima de corrente para a rutina foi obtida em solução tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 5,0. Consequentemente, a solução tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0) foi selecionada como melhor eletrólito de suporte para os estudos posteriores.

Figura 15. Estudo da natureza do pH de eletrólito suporte sobre a corrente e potencial de pico resultante do biossensor em $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de rutina em solução tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,0 a 5,0) e fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0 e 7,0) por SWV.



5.6.3. Parâmetros da SWV

A corrente de pico na SWV é dependente de vários parâmetros instrumentais como a frequência, amplitude de pulso e incremento de varredura. Assim, os efeitos destes parâmetros sobre a resposta de corrente

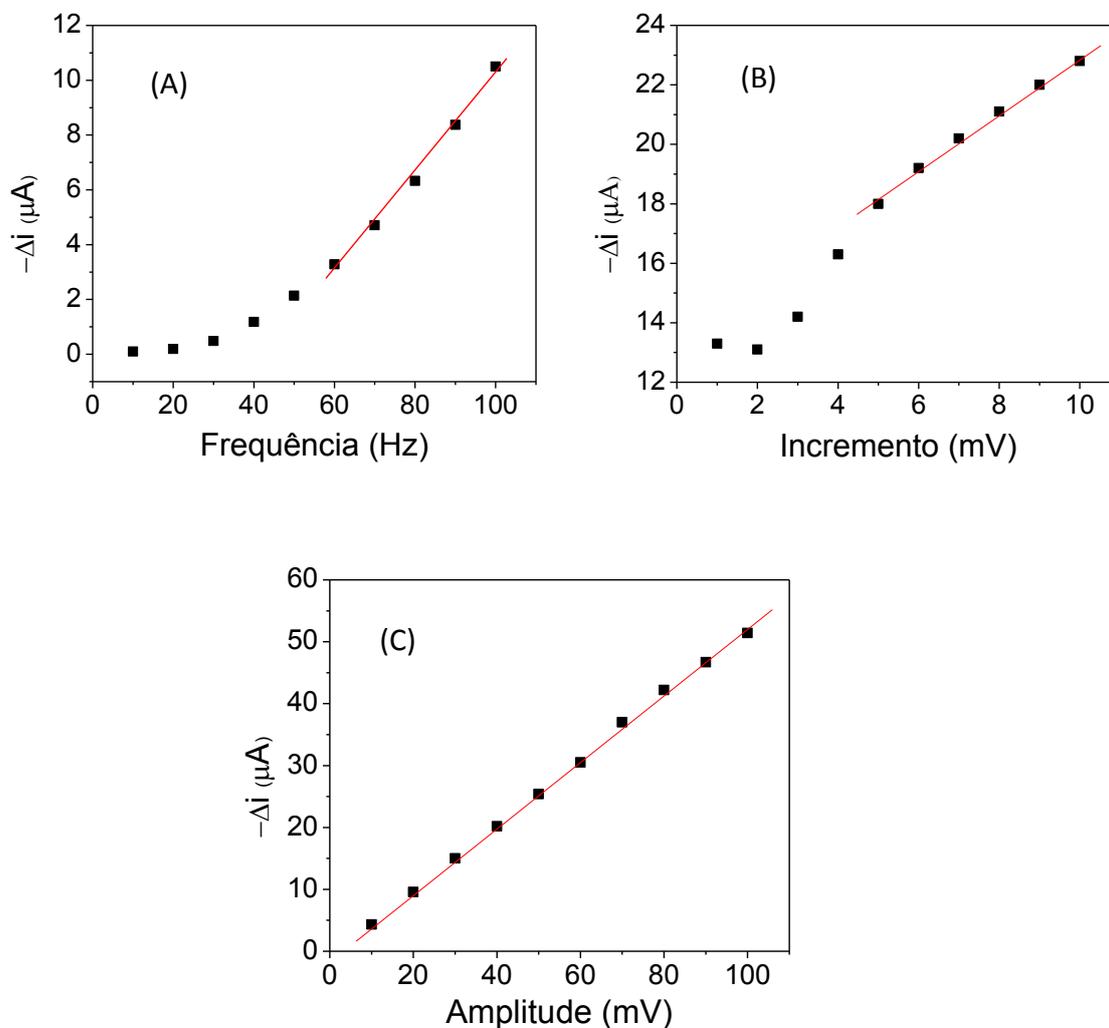
para $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de rutina em solução de tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0) foram investigadas a fim de obter as melhores condições experimentais para o biossensor proposto.

Inicialmente, foi estudada a variação da frequência em uma faixa de 10 a 100 Hz, com incremento e amplitude fixados em 5 mV e 70 mV, respectivamente. Como é possível observar na Figura 16-A uma resposta linear crescente das correntes de pico resultante da rutina foi observada na faixa de 60 a 100mV, deste modo, o valor de frequência em 100 mV foi selecionado.

A variação do incremento de potencial foi estudada em uma faixa de 1 a 10 mV, com frequência e amplitude fixos em 100 Hz e 70 mV, respectivamente. A intensidade das correntes de pico resultante aumentou gradualmente até o incremento máximo (10 mV) e este valor foi selecionado, conforme indica a Figura 16-B.

Além do incremento e da frequência, a amplitude de pulso também foi investigada no intervalo de 10 a 100 Hz, o incremento e a frequência foram fixados nos melhores valores (10 mV e 100 Hz, respectivamente) para este estudo. De acordo com a Figura 16-C é possível observar um aumento linear da corrente de pico da rutina até 100 Hz, porém é de extrema importância analisar a forma dos voltamogramas, visto que, a resolução dos picos influencia diretamente o desempenho analítico do biossensor. Nesse caso, a partir de 40 mV os voltamogramas apresentaram picos distorcidos, então se optou por utilizar uma amplitude de 40mV.

Figura 16. Investigação dos parâmetros de SWV sobre a resposta analítica do biossensor proposto em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de solução tampão acetato (pH 5,0) contendo $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de rutina. (A) Estudo da frequência; (B) Estudo do incremento; (C) Estudo da amplitude.



5.7. Avaliação de Alguns Parâmetros de Validação do Método para Análise de Rutina utilizando o Biossensor Proposto.

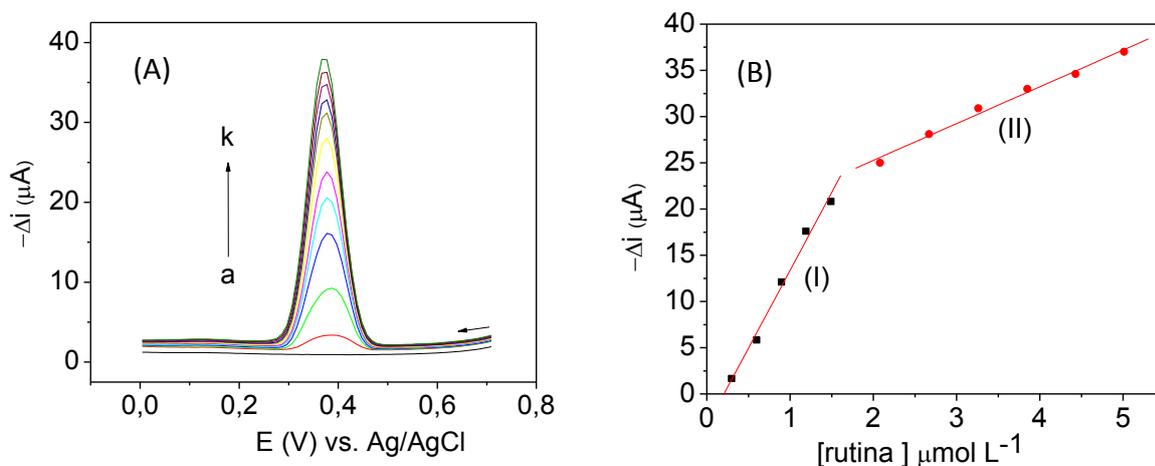
5.7.1. Curva de calibração

A fim de avaliar a sensibilidade na resposta eletroquímica e o baixo limite de detecção para o eletrodo modificado, a técnica de voltametria

de onda quadrada foi utilizada para a construção da curva de calibração, aplicando-se as condições previamente otimizadas.

Como pode ser observado na Figura 17 (B), a curva apresentou dois perfis lineares distintos. A primeira faixa linear (I) de $3,0 \times 10^{-7}$ a $1,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e a segunda (II) de $2,1 \times 10^{-6}$ a $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. Para a primeira faixa foi obtido a seguinte equação: $-\Delta i = -3,47 \times 10^{-6} + 16,83$ [rutina] com coeficiente de correlação (r^2) de 0,9949. A segunda faixa pode ser expressa por $-\Delta i = 1,73 \times 10^{-5} + 3,98$ [rutina] com coeficiente de correlação (r^2) de 0,9944. Nas equações Δi representa a corrente resultante (μA) e [rutina] a concentração de rutina (mol L⁻¹). Os limites de detecção (LOD = 3 x desvio padrão do intercepto / inclinação) e os limites de quantificação (LOQ = 10 x desvio padrão do intercepto / inclinação) foram calculados para as duas faixas lineares, obtendo para a faixa (I) $1,73 \times 10^{-7}$ e $5,77 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e para (II) $5,85 \times 10^{-7}$ e $1,95 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, respectivamente.

Figura 17. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos utilizando o biossensor proposto em solução tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 5,0) e soluções de rutina, nas seguintes concentrações: (a) $2,99 \times 10^{-7}$ (b) $5,98 \times 10^{-7}$ (c) $8,97 \times 10^{-7}$ (d) $1,19 \times 10^{-6}$ (e) $1,49 \times 10^{-6}$ (f) $2,08 \times 10^{-6}$ (g) $2,67 \times 10^{-6}$ (h) $3,26 \times 10^{-6}$ (i) $3,85 \times 10^{-6}$ (j) $4,43 \times 10^{-6}$ (k) $5,01 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ com uma frequência de 100 Hz, amplitude do impulso 40 mV e incremento de varredura 10 mV. (B) Curva de calibração para rutina.



5.7.2. Estudos de repetibilidade, reprodutibilidade, estabilidade e interferente

Estudos de repetibilidade foram realizados empregando o mesmo biossensor para executar 7 medidas de SWV usando uma concentração de $3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de rutina em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0). O desvio padrão relativo (RSD) obtido entre as correntes de pico foi de 5,6 %. Também foi avaliado a repetibilidade entre eletrodos, sendo que para este estudo 3 biossensores foram construídos da mesma forma. O RSD entre as medidas realizadas com cada eletrodo foi de 6,0 %. Os resultados indicam que o biossensor proposto possui boa repetibilidade.

A estabilidade do biossensor foi investigada por SWV empregando $8,97 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de rutina em um período de 180 dias. Para este estudo o biossensor foi mantido em temperatura ambiente (aproximadamente $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$). O RSD entre as medidas foi inferior a 2,4 % indicando que o biossensor proposto apresentou boa estabilidade. Este resultado satisfatório pode ser atribuído à eficiência na imobilização da enzima no nanomaterial, mantendo a atividade catalítica da lacase.

Para avaliar a seletividade do biossensor foi realizado um estudo de possíveis interferentes empregando os excipientes presentes nas amostras de rutina (creme *lanete base* para a amostra de creme e amido com aerosol para a amostra de cápsula). Este estudo foi realizado por SWV, em triplicatas, nas proporções 1:1, 1:5, 1:10 e 1:20 rutina:interferente. Nenhum efeito significativo de interferência foi observado durante os experimentos (mudança do sinal menor que 5% entre as medias), comprovando que os excipientes presentes nas amostras não interferem na determinação de rutina pelo método eletroquímico proposto.

5.8. Estudo de Recuperação e Determinação de Rutina

O estudo de recuperação foi realizado através do método de adição de padrão, onde as medias foram feitas em triplicata usando duas amostras

farmacêuticas (A e B). Foram adicionados 1,49 e 2,95 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de padrão de rutina para a amostra A e 0,75, 1,12 e 1,50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de padrão de rutina para a amostra B. As taxas de recuperações (

Tabela 1) obtidas para essas amostras variam de 96,2 a 103,8% demonstram a exatidão satisfatória do biossensor proposto e baixa interferência da matriz da amostra.

Tabela 1. Recuperação de rutina em amostras farmacêuticas usando o biossensor proposto.

Amostra ^a	RUTINA ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		Recuperação (%) ^c
	Adicionado	Recuperado ^b	
A	1,49	1,54 \pm 0,2	103,3
	2,95	2,91 \pm 0,03	98,6
B	0,75	0,72 \pm 0,03	96,2
	1,12	1,16 \pm 0,03	103,8
	1,50	1,48 \pm 0,03	98,8

^aA= Creme de rutina, B= Cápsula de rutina. ^bMédia \pm desvio padrão; n=2 (A) n=3 (B). ^cRecuperação = (valor médio encontrado / valor adicionado) x 100%.

A fim de avaliar a aplicabilidade do biossensor proposto, determinou-se a concentração de rutina em duas amostras farmacêuticas, nas condições experimentais otimizadas.

Alíquotas das amostras foram transferidas para a cela eletroquímica contendo tampão acetato 0,1 mol L^{-1} (pH 5) e quantificadas a partir das correntes resultantes obtidas no processo de oxirredução, após sucessivas adições da solução padrão de rutina pelo método da adição de padrão por SWV. A determinação de rutina também foi feita pelo método espectrofotométrico de referência (UV-Visível)⁴⁹ e os resultados encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Determinação de rutina em amostras farmacêuticas por SWV e UV.

Amostra	Rotulado	UV*	Biossensor*	E.R₁ (%)	E.R₂ (%)
cápsula	20% (mg/cap)	21,50 ± 0,02	20,1 ± 0,4	0,5	7,5
creme	5 % (m/m)	4,94 ± 0,03	5,14 ± 0,5	1,2	2,8

*n= 3; **E.R₁** : Erro relativo Biossensor vs. Rotulado ; **E.R₂** : Erro relativo Biossensor vs. UV

Como pode ser observado na Tabela 2, os resultados indicam boa concordância entre o método proposto e o método espectrofotométrico de referência, e está próximo ao valor rotulado o que reforça a potencialidade do uso do biossensor como uma ferramenta alternativa para a determinação de rutina.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi desenvolvido, avaliado e aplicado um novo biossensor a base de pasta de carbono, contendo nanopartículas de ouro estabilizadas em ciclodextrina e imobilizadas com lacase.

Os resultados obtidos demonstram a vantagem da modificação do EPC com AuNP-CD-LAC, comparado ao eletrodo não modificado, devido à presença da enzima que possui atividade catalítica na oxidação de compostos fenólicos, bem como pela presença das AuNP que proporcionam um aumento na taxa de transferência de elétrons, fator de grande importância no funcionamento de sensores que operam com medidas eletroquímicas. Ainda, esse material ofereceu um ambiente biocompatível para imobilização da enzima visto que garantiu um maior tempo de vida útil e estabilidade de aproximadamente 180 dias para o biossensor.

A repetibilidade e reprodutibilidade do biossensor foram satisfatórias, com RSD de 5,6 e 6,0 % respectivamente. O biossensor apresentou boa sensibilidade na determinação de rutina (LOD de $1,73 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, para a primeira faixa linear) e recuperações entre 96,2 a 103,8% demonstraram uma exatidão satisfatória do biossensor desenvolvido e indicam a ausência de efeitos de matriz nestas determinações.

O biossensor proposto foi empregado com sucesso na determinação de rutina em duas amostras farmacêuticas (creme e cápsula) e os resultados experimentais demonstraram boa concordância com o método espectrofotométrico de referência e com os valores rotulados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ CAMPÀS, M.; CARPENTIER, R.; ROUILLON, R. Plant tissue-and photosynthesis-based biosensors. **Biotechnology Advances.**, 26, 370-378, 2008.
- ² KIRSCH, J.; SILTANEN, C.; ZHOU, Q.; REVZIN, A.; SIMONIAN, A. Biosensor technology: recent advances in threat agent detection and medicine. **Chemical Society Reviews.**, 42, 8733--8768, 2013.
- ³ NIKOLELIS, D. P.; VARZAKAS, T.; ERDEM, A.; NIKOLELI, G-P. Portable Biosensing of Food Toxicants and Environmental Pollutants, Boca Raton (FL), CRC Press Taylor & Francis Group,.44p, 2014.
- ⁴ MELLO, L. D.; KUBOTA, L. T. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. **Food Chemistry.**, 77, 237– 256, 2002.
- ⁵ D'ORAZIO, P. Biosensors in clinical chemistry. **International journal of clinical chemistry**,334, 41–69, 2003.
- ⁶ WU, Z.; ZHAO, F.; VARCOE, J. R.; THUMSER, A. E.; AVIGNONEROSSA, C.; SLADE, R. C. T. Direct electron transfer of glucose oxidase immobilized in an ionic liquid reconstituted cellulose– carbon nanotube matrix. **Bioelectrochemistry**, 77, 64-68, 2009.
- ⁷ WU, J.; FU, Q.; LU, B.; LI, H.; XU, Z. Surfactant-associated electrochemical properties of ferrocene adsorbed on a glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes. **Thin Solid Films**, 518, 3240–3245, 2010.
- ⁸ FATIBELLO-FILHO, O.; CAPELATO, M.D. Biossensores. **Química Nova**, 15, 28–39, 1992.
- ⁹ ROSATTO, S.S.; FREIRE, R.S.; DURÁN, N.; KUBOTA, L.T. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. **Química Nova**, 24, 77–86, 2001.
- ¹⁰ OLIVEIRA, I. R. W. Z, Desenvolvimento de biossensores e sensores biomiméticos para determinação de compostos fenólicos. 2007. 148 f. **Tese**

(Doutorado em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

¹¹ LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 1202 p., 2006.

¹² MCMURRY, John. **Química orgânica**: [combo]. 7th ed. norte americana. São Paulo: Cengage Learning, 452-454, 2005.

¹³ STRYER, L. **Bioquímica**. 4^a.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1000, 1996.

¹⁴ MAYER, A. M.; STAPLES, R. C. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, 60, 551–565, 2002.

¹⁵ FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, M. A.; MOLDES, D. Recent developments and applications of immobilized laccase – a review. **Biotechnology Advances**, 31, 1808–1825, 2013.

¹⁶ DURÁN, N.; ROSA, M. A.; D'ANNIBALE, A.; GIANFREDA, L. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, 31, 907- 931, 2002.

¹⁷ RIVA, S., Laccases: blue enzymes for green chemistry. **Trends in Biotechnology**, 24, 219-226, 2006.

¹⁸ GIARDINA, P.; FARACO, V.; PEZZELLA, C.; PISCITELLI, A.; VANHULLE, S.; SANNIA, G. Laccases: a never-ending story. **Cell. Mol. Life Sci.**, 67, 369–385, 2010

¹⁹ MOROZOVA, O. V., SHUMAKOVICH, G. P., GORBACHEVA, M. A., SHLEEV, S. V., YAROLOV, A. I. **Review “Blue” Laccases**, 72, 1396-1412, 2007.

²⁰ OLIVEIRA, I. R. W. Z.; FATIBELLO-FILHO, O. Imobilização da lacase em micropartículas de quitosana obtidas por spray drying e usadas na construção de biossensores. **Química Nova**, 32, 1195-1201, 2009.

²¹ MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUIBAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and

selectivity via immobilization techniques. **Enzyme Microbial Technology** 40, 1451–1463, 2007.

²² FERNANDES, S. C.; de OLIVEIRA I. R. W. Z.; VIEIRA, I. C. A green bean homogenate immobilized on chemically crosslinked chitin for determination of caffeic acid in white wine. **Enzyme and Microbial Technology** 40, 661–668, 2007.

²³ DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova** 27, 623–630, 2004.

²⁴ KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology** 35, 126–139, 2004.

²⁵ OZMEN, E. Y.; YILMAZ, M. Pretreatment of *Candida rugosa* lipase with soybean oil before immobilization on β -cyclodextrin-based polymer. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** 69, 58–62, 2009.

²⁶ OLIVEIRA, I. R. W. Z.; VIEIRA, I. C. Immobilization procedures for the development of a biosensor for determination of hydroquinone using chitosan and gilo (*Solanum gilo*). **Enzyme and Microbial Technology** 38, 449–456, 2006.

²⁷ BRITTO, M. A. F. O.; NASCIMENTO JR, C. S.; SANTOS, H. F. Análise estrutural de ciclodextrinas: um estudo comparativo entre métodos teóricos clássicos e quânticos. **Química Nova** 27, 882–888, 2004.

²⁸ FRACETO, L. F.; GONÇALVES, M. M.; MORAES, C. M.; ARAÚJO, D. R.; ZANELLA, L.; PAULA, E.; PERTINHEZ, T. A. Caracterização do complexo de inclusão ropivacaína: β -ciclodextrina. **Química Nova** 30, 1203–1207, 2007.

²⁹ SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**. 15, 71-78, 2002.

³⁰ FERNANDES, S. C. Biossensores eletroquímicos para compostos fenólicos usando novos materiais. 2012. 98 f. **Tese (Doutorado em Química)** – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

- ³¹ BROINIZI, P. R. B., WARTHA, E. R. S. de A., SILVA, A. M. de O, NOVOA, A. J. V., TORRES, R. P., AZEREDO, H. M. C., ALVES, R. E, MANCINI, J. F. Evaluation of the antioxidant activity of phenolic compounds naturally contained in by-products of the cashew apple (*anacardium occidentale* L.) **Food Science and Technology**, 27, 902-908, 2007.
- ³² SOUZA, C. M. de M.; SILVA, H. R.; VIEIRA, G. M.; AYRES, M. C.C; COSTA, C. L. S. da.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. de M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, 30, 351-355, 2007.
- ³³ ROBARDS, K.; ANTOLOVICH, M. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids. **Analyst**. 122, 11-34, 1997.
- ³⁴ BRECHO, J. R. M., MACHADO, H., GUERRA, M. O. Rutina – estrutura, metabolismo e potencial farmacológico. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**. 01, 21-25, 2009.
- ³⁵ FRANZOI, A.C., SPINELLI, A., VIEIRA, I.C. Rutin determination in pharmaceutical formulations using a carbon paste electrode modified with poly(vinylpyrrolidone). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 47, 73-977, 2008.
- ³⁶ SHAOJUN, G.; ERKANG, W. Synthesis and electrochemical applications of gold nanoparticles **Analytica Chimica Acta** 598, 181–192, 2007.
- ³⁷ MERKOÇI, A. Nanoparticles-based strategies for DNA, protein and cell sensors. **Biosensors and Bioelectronics**, 26, 1164–1177, 2010.
- ³⁸ DORIA, G.; CONDE, J.; VEIGAS, B.; GIESTAS, L.; ALMEIDA, C.; ASSUNÇÃO, M.; ROSA, J.; BAPTISTA, P. V. Noble metal nanoparticles for biosensing applications. **Sensors**, 12, 1657–1687, 2012.
- ³⁹ GUO, S.; WANG, E. Synthesis and electrochemical applications of gold nanoparticles. **Analytica Chimica Acta**. 598, 181-192, 2007.

- ⁴⁰ SHIDDIKY, M. J. A.; TORRIERO, A. A. J. Application of ionic liquids in electrochemical sensing systems. **Biosensors and Bioelectronics**, 26, 775-787, 2011.
- ⁴¹ ZHANG, X.; GUO, Q.; CUI, D. Recent advances in nanotechnology applied to biosensors. **Sensors**, 09, 1033-1053, 2009.
- ⁴² SAEI, A. A.; NAJAFI-MARANDI, P.; ABHARI, A.; GUARDIA, M.; DOLATABADI, J. E. N. Electrochemical biosensors for glucose based on metal nanoparticles. **Trends Analytical Chemistry**, 42, 216 – 227, 2013.
- ⁴³ SOUZA, D.; CODOGNOTO, L.; MALAGUTTI, A. R.; TOLEDO, R. A.; PEDROSA, V. A.; OLIVEIRA, R. T. S.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Voltametria de onda quadrada. segunda parte: aplicações. **Química Nova**, 27, 790-797, 2004.
- ⁴⁴ SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Química Nova**, 26, 81- 89, 2003.
- ⁴⁵ ZAPP, E. Sensor bioinspirado modificado com nanopartículas metálicas estabilizadas em surfactante aplicado à determinação de polifenóis. 2012. 79 f. **Dissertação (Mestrado em Química)** - Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.
- ⁴⁶ SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2008. 999 p.
- ⁴⁷ HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005. 876 p.
- ⁴⁸ FERNANDES, S. C. Biossensor para ácido clorogênico contendo líquido iônico com nanopartículas de irídio. 2009. 73f. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.
- ⁴⁹ **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 16 ed., (AOAC Official Method – Rutin in Drugs) 952.28, 1995.

⁵⁰ BOURBONNAIS, R.; LEECH, D.; PAICE, M. G. Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. **Biochimica et Biophysica Acta**, General Subjects.1379, 381-390, 1998.

⁵¹ ZARBIN A. J. G. Química de (nano)materiais. **Química Nova**, 30, 1469-1479, 2007.

⁵² ZAPP, E.; BRONDANI, D.; VIEIRA, I. C.; DUPONT, J.; SCHEEREN, C. W. Bioelectroanalytical determination of rutin based on bi-enzymatic sensor containing iridium nanoparticles in ionic liquid phase supported in clay. **Electroanalysis**, 23, 764-776, 2011.

⁵³ AGOSTINHO, S. M. L.; VILLAMIL, R. F. V.; NETO, A. A.; ARANHAH. O eletrólito de suporte e suas múltiplas funções em processos de eletrodo. **Química Nova**, 27, 813 – 817, 2004.