

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ANA CRISTINA FRANZOI

INCORPORAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS
DISPERSAS EM LÍQUIDOS IÔNICOS NO DESENVOLVIMENTO
DE BIOSSENSORES PARA DETERMINAÇÃO DE LUTEOLINA E
QUERCETINA

Florianópolis – SC

2011

ANA CRISTINA FRANZOI

INCORPORAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS
DISPERSAS EM LÍQUIDOS IÔNICOS NO DESENVOLVIMENTO
DE BIOSSENSORES PARA DETERMINAÇÃO DE LUTEOLINA E
QUERCETINA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Doutor em Química. Área de concentração: Química Analítica.

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

Florianópolis – SC

2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

F837i Franzoi, Ana Cristina

Incorporação de nanopartículas metálicas dispersas em líquidos iônicos no desenvolvimento de biossensores para determinação de luteolina e quercetina [tese] / Ana Cristina Franzoi ; orientadora, Iolanda da Cruz Vieira. - Florianópolis, SC, 2011.

124 p.: il., grafs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. Biossensores. 3. Lacase. 4. Líquidos iônicos. 5. Nanopartículas. 6. Luteolina. 7. Quercetina. I. Vieira, Iolanda da Cruz. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU 54

ANA CRISTINA FRANZOI

INCORPORAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS
DISPERSAS EM LÍQUIDOS IÔNICOS NO DESENVOLVIMENTO
DE BIOSSENSORES PARA DETERMINAÇÃO DE LUTEOLINA E
QUERCETINA

Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do título de **Doutor em Química** no **Programa de Pós-Graduação em Química** da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 01 de abril de 2011.

Prof. Dr. Ademir Neves
Coordenador do Programa

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^ª. Dr^ª. Maria Valnice Boldrin
(IQ – UNESP)

Prof. Dr. Mauro Bertotti

Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke

Prof. Dr. Josiel Barbosa Domingos

Prof^ª. Dr^ª. Hérica Aparecida Magosso

*À minha família e meus amores,
Arlindo, Goreti, Daniel, Luciana,
Marcus e Meg.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por estar comigo em todos os momentos;

Aos meus pais, Arlindo e Goreti, pessoas maravilhosas que nunca mediram esforços para realização dos meus sonhos;

Aos meus queridos irmãos, Daniel e Luciana, pelo carinho e apoio de sempre;

Ao meu marido Marcus, pelo seu amor, companheirismo e compreensão;

À Prof^a. Dr^a. Iolanda da Cruz Vieira pela orientação e dedicação durante o desenvolvimento deste trabalho, e principalmente por ter acreditado no meu potencial;

Ao Prof. Dr. Almir Spinelli, ao Prof. Dr. Antônio Carlos Joussef e à Prof^a. Dr^a. Maria da Graça do Nascimento pelas importantes discussões;

Ao Prof. Dr. Jairton Dupont, à Prof^a. Dr^a. Carla W. Scheeren e ao doutorando Pedro Migowski pela doação dos líquidos iônicos e nanopartículas metálicas dispersas em líquidos iônicos, bem como pela síntese e caracterização desses materiais;

À empresa Novozymes pela doação da enzima lacase;

Aos colegas do Laboratório de Biossensores (LaBios): Sally, Suellen, Daniela, Eduardo e Francielle pela amizade e importante contribuição dada a este trabalho;

Aos professores da banca, por aceitarem fazer parte da mesma;

À Universidade Federal de Santa Catarina, professores e funcionários do Departamento de Química pela oportunidade de concluir este trabalho;

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

TRABALHOS DESENVOLVIDOS E PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO

1. FRANZOI, A. C.; BRONDANI, D.; ZAPP, E.; MOCCELINI, S. K.; FERNANDES, S. C.; VIEIRA, I. C.; DUPONT, J. Incorporação de líquidos iônicos e nanopartículas metálicas na construção de sensores eletroquímicos. **Química Nova** 2011, aceito para publicação.
2. MOCCELINI, S. K.; FRANZOI, A. C.; VIEIRA, I. C.; DUPONT, J.; SCHEEREN, C. W. A novel support for laccase immobilization: Cellulose acetate modified with ionic liquid and application in biosensor for methyl dopa detection. **Biosensors and Bioelectronics** 26, 3549–3554, 2011.
3. FRANZOI, A. C.; VIEIRA, I. C.; SCHEEREN, C. W.; DUPONT, J. Development of quercetin biosensor through Immobilizing laccase in a modified β -cyclodextrin matrix containing Ag nanoparticles in ionic liquid. **Electroanalysis** 22, 1376–1385, 2010.
4. FRANZOI, A. C.; VIEIRA, I. C.; DUPONT, J. Biosensors of laccase based on hydrophobic ionic liquids derived from imidazolium cation. **Journal of Brazilian Chemical Society** 21, 1451–1458, 2010.
5. de LIMA, F.; LUCCA, B. G.; BARBOSA, A. M. J.; FERREIRA, V. S.; MOCCELINI, S. K.; FRANZOI, A. C.; VIEIRA, I. C. Biosensor based on pequi polyphenol oxidase immobilized on chitosan crosslinked with cyanuric chloride for thiodicarb determination. **Enzyme and Microbial Technology** 47, 153–158, 2010.
6. FRANZOI, A. C.; VIEIRA, I. C.; DUPONT, J.; SCHEEREN, C. W.; de OLIVEIRA, L. F. Biosensor for luteolin based on silver or gold nanoparticles in ionic liquid and laccase immobilized in chitosan modified with cyanuric chloride. **Analyst** 134, 2320–2328, 2009.
7. FRANZOI, A. C.; MIGOWSKI, P.; DUPONT, J.; VIEIRA, I. C. Development of biosensors containing laccase and imidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ionic liquid for the determination of rutin. **Analytica Chimica Acta** 639, 90–95, 2009.
8. FRANZOI, A. C.; PERALTA, R. A.; NEVES, A.; VIEIRA, I. C. Biomimetic sensor based on $Mn^{III}Mn^{II}$ complex as manganese peroxidase mimetic for determination of rutin. **Talanta** 78, 221–226, 2009.

9. FRANZOI, A. C.; DUPONT, J.; SPINELLI, A.; VIEIRA, I. C. Biosensor based on laccase and an ionic liquid for determination of rosmarinic acid in plant extracts. **Talanta** 77, 1322–1327, 2009.
10. MAGUERROSKI, K. S.; FERNANDES, S. C.; FRANZOI, A. C.; VIEIRA, I. C. Pine nut peroxidase immobilized on chitosan crosslinked with citrate and ionic liquid used in the construction of a biosensor. **Enzyme and Microbial Technology** 44, 400–405, 2009.
11. 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, 973–977, 2008.

RESUMO

A presente tese descreve o desenvolvimento de novos biossensores para aplicação na determinação de luteolina em amostras de chá de camomila e quercetina em formulação farmacêutica manipulada e suco de maçã, empregando a técnica de voltametria de onda quadrada.

Inicialmente, dois biossensores contendo nanopartículas de prata ou ouro dispersas em líquido iônico hexafluorofosfato de 1-*n*-butil-3-metilimidazólio (Ag- ou Au-BMI.PF₆) e lacase (*Aspergillus oryzae*) imobilizada em quitosana quimicamente modificada com cloreto cianúrico foram desenvolvidos. Esta enzima catalisa a oxidação da luteolina a sua correspondente *o*-quinona, a qual é reduzida eletroquimicamente na superfície do eletrodo a um potencial de 0,35 V *versus* Ag/AgCl. Sob condições previamente otimizadas, foram construídas as curvas analíticas para cada biossensor a partir da corrente resultante *versus* concentração de luteolina, apresentando linearidade em um intervalo de $9,9 \times 10^{-8}$ a $5,8 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, com limites de detecção de $5,3 \times 10^{-8}$ (Ag-biossensor) e $2,8 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ (Au-biossensor). A recuperação de luteolina nas amostras de chá variou de 90,0 a 105,1%. Esses biossensores demonstraram elevada sensibilidade de calibração, excelente seletividade, boa reprodutibilidade e estabilidade, e representam uma alternativa viável para determinação desta flavona.

Na segunda parte desse estudo, um biossensor contendo nanopartículas de prata dispersas em líquido iônico bis(trifluorometanosulfonil)imidato de 1-*n*-butil-3-metilimidazólio (Ag-BMI.N(Tf)₂) e lacase imobilizada em β-ciclodextrina modificada com epícloridrina foi construído. A lacase catalisa a oxidação da quercetina a sua *o*-quinona, que é reduzida na superfície do biossensor a um potencial de 0,29 V. Este biossensor mostrou linearidade em um intervalo de $1,0 \times 10^{-7}$ a $6,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e um baixo limite de detecção ($3,9 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹). Além disso, forneceu excelentes resultados quanto à repetibilidade, reprodutibilidade, seletividade, estabilidade e recuperação, e também demonstrou ser apropriado para determinação de quercetina em amostra farmacêutica e suco de maçã (obtido da fruta fresca).

Palavras-Chave: Biossensor, Lacase, Líquido iônico, Nanopartículas, Luteolina, Quercetina.

ABSTRACT

This present thesis describes the development of novel biosensors for application in the luteolin determination in chamomile tea samples and quercetin in manipulated pharmaceutical formulation and apple juice, using square-wave voltammetry.

Initially, two biosensors containing silver or gold nanoparticles dispersed in ionic liquid 1-*n*-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate and laccase (*Aspergillus oryzae*) immobilized in chitosan chemically modified with cyanuric chloride were developed. This enzyme catalyzes the oxidation of luteolin to its corresponding *o*-quinone, which is electrochemically reduced on the surface electrode at a potential of 0.35 V *versus* Ag/AgCl. Under optimized conditions, the analytical curves for the biosensors were built from the resulting current *versus* luteolin concentration, presenting linearly in a range of 9.9×10^{-8} to 5.8×10^{-6} mol L⁻¹, with detection limits of 5.3×10^{-8} (Ag-biosensor) and 2.8×10^{-8} mol L⁻¹ (Au-biosensor). The recovery for luteolin in tea samples ranged of 90.0 to 105.1%. These biosensors demonstrated high calibration sensitivity, excellent selectivity, good reproducibility and stability, and represent a viable alternative for determination of this flavone.

In the second part of this study, a biosensor containing silver nanoparticles in ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide (Ag-BMI.N(Tf)₂) and laccase immobilized on β-cyclodextrin modified with epichlorohydrin was constructed. Laccase catalyzes the oxidation of quercetin to its *o*-quinone, which is reduced on the biosensor surface at a potential of 0.29 V. This biosensor showed linearity in a range of 1.0×10^{-7} to 6.5×10^{-6} mol L⁻¹ and a low detection limit of 3.9×10^{-8} mol L⁻¹. Moreover, it supplied excellent results for repeatability, reproducibility, selectivity, stability and recovery, and also demonstrated to be suitable for quercetin determination in pharmaceutical formulation and apple juice (obtained of the fresh fruit).

Keywords: Biosensor, Laccase, Ionic liquid, Nanoparticles, Luteolin, Quercetin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo encaixe induzido	21
Figura 2. Representação esquemática do ciclo catalítico da Lac (RIVA, 2006)	22
Figura 3. Representação estrutural do sítio ativo das Lac (DURÁN <i>et al.</i> , 2002)	23
Figura 4. Estrutura tridimensional da Lac (<i>Trametes versicolor</i>): íons cobre são descritos como esferas azuis e moléculas de água como esferas vermelhas (PIONTEK <i>et al.</i> , 2002)	24
Figura 5. Métodos para imobilização de enzimas (adaptado de DALLA-VECCHIA <i>et al.</i> , 2004)	26
Figura 6. Estrutura química da QTS	28
Figura 7. (A) Estrutura geral das CD. O índice n representa o número de glicoses adicionais: n = 1 (α -CD), n = 2 (β -CD) e n = 3 (γ -CD) e (B) Representação da estrutura funcional das CD (BRITTO <i>et al.</i> , 2004)	29
Figura 8. Componentes utilizados no desenvolvimento de biossensores (adaptado de MELLO e KUBOTA, 2002; GRIESHABER <i>et al.</i> , 2008)	30
Figura 9. Estruturas de cátions que compõem LI (R, R ₁ , R ₂ , R ₃ e R ₄ = cadeias alquílicas) (FRANZOI <i>et al.</i> , 2011)	33
Figura 10. Micrografias eletrônicas da superfície de um (A) ECLI construído com o LI BMI.PF ₆ e (B) EPC não modificado (FRANZOI <i>et al.</i> , 2011)	35
Figura 11. Representação da imobilização da enzima PFO em QTS reticulada com oxalato e a “esfera protetora” formada pelo LI contendo nanopartículas metálicas (Ir-BMI.PF ₆) (adaptada de FERNANDES <i>et al.</i> , 2009 e extraída de FRANZOI <i>et al.</i> , 2011)	41
Figura 12. Estruturas de fenóis e ácidos fenólicos	42
Figura 13. Estrutura básica de um flavonóide e suas subclasses	43
Figura 14. Estrutura química da luteolina	44
Figura 15. Estrutura química da quercetina	45
Figura 16. Forma de aplicação do potencial na SWV. A corrente é medida nas regiões 1 e 2, pulso direto e reverso, respectivamente (SKOOG <i>et al.</i> , 2008)	48
Figura 17. Representação esquemática da cela eletroquímica com os três eletrodos	54
Figura 18. Esquema de construção dos biossensores	57
Figura 19. Gráfico Abs <i>versus</i> tempo para determinação da atividade enzimática da Lac	60

- Figura 20.** Estudo da estabilidade da Lac armazenada sob refrigeração (4 °C) 61
- Figura 21.** Esquema proposto para imobilização da Lac em QTSCiCi 62
- Figura 22.** SEM das pastas de carbono dos biossensores contendo (A) Nujol e (B) Au-BMI.PF₆ 63
- Figura 23.** Representação esquemática da oxidação da luteolina catalisada pela Lac e a redução eletroquímica da *o*-quinona na superfície do Lac-QTSCiCi/Nujol/Au-BMI.PF₆-biossensor. Lac_{red}: lacase na forma reduzida e Lac_{oxi}: lacase na forma oxidada 64
- Figura 24.** Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando (a) EPC, (b) Lac/Nujol-biossensor, (c) Lac-QTSCiCi/Nujol-biossensor, (d) Lac-QTSCiCi/Nujol/BMI.PF₆-biossensor, (e) Lac-QTSCiCi/Nujol/Ag-BMI.PF₆-biossensor e (f) Lac-QTSCiCi/Nujol/Au-BMI.PF₆-biossensor em solução contendo 4,8x10⁻⁶ mol L⁻¹ de luteolina em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,0); frequência de 50 Hz; amplitude de 100 mV e incremento de 5,0 mV. Inserido: valores das correntes de pico. O experimento foi realizado em triplicata 65
- Figura 25.** Voltamogramas de onda quadrada usando Nujol:Au-BMI.PF₆ nas proporções (a) 100:0, (b) 75:25, (c) 50:50, (d) 25:75 e (e) 0:100% (m/m) no biossensor imerso em solução tampão acetato pH 4,0 contendo 4,8x10⁻⁶ mol L⁻¹ de luteolina em frequência de 50 Hz, amplitude de 100 mV e incremento de 5,0 mV. Inserido: valores de corrente para cada composição do biossensor 67
- Figura 26.** Efeito da quantidade de Lac (unidades) na resposta do Lac-QTSCiCi/Nujol/Au-BMI.PF₆-biossensor utilizando solução contendo 4,8x10⁻⁶ mol L⁻¹ de luteolina em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,0) 68
- Figura 27.** Efeito do pH/eletrólito suporte sobre a resposta do Lac-QTSCiCi/Nujol/Au-BMI.PF₆-biossensor utilizando solução de luteolina 4,8x10⁻⁶ mol L⁻¹ 69
- Figura 28.** Investigação dos parâmetros de SWV: (A) Frequência, (B) Amplitude e (C) Incremento sobre a resposta analítica do Lac-QTSCiCi/Nujol/Au-BMI.PF₆-biossensor utilizando solução contendo 4,8x10⁻⁶ mol L⁻¹ de luteolina em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,0) 71
- Figura 29.** Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando (A) Lac-QTSCiCi/Nujol/Ag-BMI.PF₆-biossensor e (B) Lac-QTSCiCi/Nujol/Au-BMI.PF₆-biossensor em: (a) solução tampão

- acetato (0,1 mol L⁻¹; pH 4,0) e soluções de luteolina nas concentrações: (b) 9,9x10⁻⁸; (c) 2,0x10⁻⁷; (d) 6,0x10⁻⁷; (e) 9,9x10⁻⁷; (f) 1,4x10⁻⁶; (g) 2,0x10⁻⁶; (h) 3,0x10⁻⁶; (i) 3,9x10⁻⁶; (j) 4,8x10⁻⁶ e (k) 5,8x10⁻⁶ mol L⁻¹ em frequência de 50 Hz, amplitude de 100 mV e incremento de 5,0 mV. Inserido: curvas analíticas correspondentes. Experimentos realizados em triplicata 73
- Figura 30.** Estudo da estabilidade do Lac-QTSCiCi/Nujol/Au-BML.PF₆-biossensor em solução tampão acetato contendo luteolina 4,8x10⁻⁶ mol L⁻¹ 74
- Figura 31.** (A) Gráfico Abs *versus* tempo para determinação da atividade enzimática da Lac e (B) Estudo da estabilidade da Lac armazenada sob refrigeração (4 °C) 81
- Figura 32.** Imagens de SEM da (A) β-CD e (B) β-CDEpi 82
- Figura 33.** Esquema proposto para imobilização da Lac em β-CDEpi (Crini, *et al.*,1998) 83
- Figura 34.** Esquema da reação de oxidação da quercetina catalisada pela enzima Lac e sua subsequente redução na superfície do eletrodo. Lac_{red}: lacase na forma reduzida e Lac_{oxi}: lacase na forma oxidada 84
- Figura 35.** (A) Representação esquemática da construção dos diferentes sensores e (B) Voltamogramas de onda quadrada usando (a) EPC, (b) Lac/Nujol-biossensor, (c) Lac-β-CDEpi/Nujol-biossensor, (d) Lac-β-CDEpi/Nujol/BML.N(Tf)₂-biossensor, (e) Lac-β-CDEpi/Nujol/Ag-BML.N(Tf)₂-biossensor e (f) Lac/Nujol/Ag-BML.N(Tf)₂-biossensor em solução contendo 4,2x10⁻⁶ mol L⁻¹ de quercetina em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,0); frequência de 60 Hz; amplitude de 100 mV e incremento de 8,0 mV. Inserido: valores das correntes de pico. O experimento foi realizado em triplicata 85
- Figura 36.** Efeito da quantidade de Lac (unidades) na resposta do Lac-β-CDEpi/Nujol/Ag-BML.N(Tf)₂-biossensor utilizando solução contendo 4,2x10⁻⁶ mol L⁻¹ de quercetina em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,0) 87
- Figura 37.** Efeito do pH/eletrólito suporte sobre a resposta do Lac-β-CDEpi/Nujol:Ag-BML.N(Tf)₂-biossensor utilizando solução de quercetina 4,2x10⁻⁶ mol L⁻¹ (*a* – tampão acetato e *f* – tampão fosfato) 87
- Figura 38.** Investigação dos parâmetros de SWV: (A) Frequência (amplitude = 80 mV e incremento = 5,0 mV) (B) Amplitude (frequência = 60 mV e incremento = 5,0 mV) e (C) Incremento (frequência = 60 mV e amplitude = 100 mV) sobre a resposta

analítica do Lac- β -CDEpi/Nujol:Ag-BMI.N(Tf)₂-biossensor utilizando solução contendo $4,2 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de quercetina em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,0)

89

Figura 39. Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando Lac- β -CDEpi/Ag-BMI.N(Tf)₂-biossensor em: (a) solução tampão acetato (0,1mol L⁻¹; pH 4,0) e soluções de quercetina nas seguintes concentrações: (b) $1,0 \times 10^{-7}$; (c) $5,0 \times 10^{-7}$; (d) $9,9 \times 10^{-7}$; (e) $2,0 \times 10^{-6}$; (f) $3,0 \times 10^{-6}$; (g) $3,4 \times 10^{-6}$; (h) $4,2 \times 10^{-6}$; (i) $5,7 \times 10^{-6}$; (j) $6,5 \times 10^{-6}$ e (k) $7,4 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ em frequência de 60 Hz, amplitude de 100 mV e incremento de 8,0 mV. Inserido: curva analítica. Experimento realizado em duplicata

90

Figura 40. Estudo da estabilidade dos diferentes biossensores: (—■—) Lac- β -CDEpi/Nujol/Ag-BMI.N(Tf)₂-biossensor; (—○—) Lac- β -CDEpi/Nujol-biossensor e (—◆—) Lac/Nujol-biossensor usando $4,2 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de quercetina em solução tampão acetato (pH 4,0). Experimentos realizados em duplicata

92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Nomes e abreviaturas de alguns ânions presentes em LI (CONSORTI <i>et al.</i> , 2001; WEI e IVASKA <i>et al.</i> , 2008; FRANZOI <i>et al.</i> , 2011)	33
Tabela 2. Viscosidade (η) e condutividade (σ) de alguns LI (T = 25 °C) (BUZZEO <i>et al.</i> , 2004; O'MAHONY <i>et al.</i> , 2008)	34
Tabela 3. Principais subclasses dos flavonóides	43
Tabela 4. Analitos avaliados, solventes utilizados para preparação das soluções e respectivas concentrações	52
Tabela 5. Parâmetros avaliados para otimização do método	71
Tabela 6. Respostas relativas do Lac-QTSCiCi/Nujol/Au-BMI.PF ₆ -biossensor para diferentes compostos fenólicos e a concentração tolerada para os possíveis interferentes na determinação de luteolina	76
Tabela 7. Recuperação de luteolina em amostras de chá de camomila usando os biossensores propostos	77
Tabela 8. Determinação de luteolina em chás de camomila usando os biossensores propostos	78
Tabela 9. Faixas lineares e limites de detecção para o analito luteolina empregando diferentes técnicas analíticas	79
Tabela 10. Parâmetros avaliados para otimização do método	89
Tabela 11. Recuperação de quercetina em diferentes amostras usando o Lac- β -CDEpi/Nujol/Ag-BMI.N(Tf) ₂ -biossensor	94
Tabela 12. Determinação de quercetina em diferentes amostras usando o Lac- β -CDEpi/Nujol/Ag-BMI.N(Tf) ₂ -biossensor	95
Tabela 13. Faixas lineares e limites de detecção para quercetina empregando diferentes técnicas analíticas	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\Delta\text{Abs t}^{-1}$	Varição da absorbância com o tempo
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato, sal de diamônio)
Ag-BMI.N(Tf) ₂	Nanopartículas de prata dispersas em bis(trifluorometanosulfonil)imidato de 1- <i>n</i> -butil-3-metilimidazólio
Ag-BMI.PF ₆	Nanopartículas de prata dispersas em hexafluorofosfato de 1- <i>n</i> -butil-3-metilimidazólio
ATP	Trifosfato de adenosina (<i>Adenosine Triphosphate</i>)
Au-BMI.PF ₆	Nanopartículas de ouro dispersas em hexafluorofosfato de 1- <i>n</i> -butil-3-metilimidazólio
BMI.BF ₄	Tetrafluorofosfato de 1- <i>n</i> -butil-3-metilimidazólio
BMI.PF ₆	Hexafluorofosfato de 1- <i>n</i> -butil-3-metilimidazólio
BMI.N(Tf) ₂	Bis(trifluorometanosulfonil)imidato de 1- <i>n</i> -butil-3-metilimidazólio
BPI.PF ₆	Hexafluorofosfato de <i>n</i> -butilpiridínio
BPI.N(Tf) ₂	Bis(trifluorometanosulfonil)imidato de <i>n</i> -butilpiridínio
CD	Ciclodextrina(s)
β -CD	β -Ciclodextrina(s)
β -CDEpi	β -Ciclodextrina modificada com epiclorigrina
CE	Eletroforese capilar (<i>Capillary Electrophoresis</i>)
CE-ED	Eletroforese capilar com detecção eletroquímica (<i>Capillary Electrophoresis with Electrochemical Detection</i>)
CHN	Carbono, hidrogênio e nitrogênio
CiCi	Cloreto cianúrico
EC	<i>Enzyme Commission</i>
ECLI	Eletrodo(s) de carbono e líquido iônico
ΔE_p	Separação entre os potenciais de pico anódico e

	catódico
EMI.BF₄	Tetrafluorofosfato de 1-etil-3-metilimidazólio
EPC	Eletrodo(s) de pasta carbono
EPC-LI	Eletrodo(s) de pasta carbono modificado com líquido iônico
Epi	Epiclorigrina
FET	Transistores de efeito de campo (<i>Field Effect Transistor</i>)
GO_x	Glicose oxidase
HMI.Cl	Cloreto de 1-hexil-3-metilimidazólio
HMI.N(Tf)₂	Bis(trifluorometanosulfonil)imidato 1-hexil-3-metilimidazólio
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>)
HpMI.PF₆	Hexafluorofosfato de 1-heptil-3-metilimidazólio
HRP	Peroxidase da raiz forte (<i>Horseradish Peroxidase</i>)
Li	Corrente resultante
I⁺	Cátion 1,3-dialquilimidazólio
Ir-BMI.PF₆	Nanopartículas de irídio dispersas em hexafluorofosfato de 1- <i>n</i> -butil-3-metilimidazólio
IUBMB	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (<i>International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i>)
Lac	Lacase
LC	Cromatografia líquida (<i>Liquid chromatography</i>)
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (<i>Liquid chromatography coupled with Mass Spectrometry</i>)
LI	Líquido(s) iônico(s)
N_{6,2,2,2}.N(Tf)₂	Bis(trifluorometanosulfonil)imidato de hexiltriethylamônio
PFO	Polifenol oxidase

PhOH	Substrato fenólico
PhO[•]	Radical fenóxi
Pi⁺	Cátion alquilpiridínio
Pt-BMI.PF₆	Nanopartículas de platina dispersas em hexafluorofosfato de 1- <i>n</i> -butil-3-metilimidazólio
QTS	Quitossana
QTSCiCi	Quitossana modificada com cloreto cianúrico
RNA	Ácido ribonucléico (<i>Ribonucleic Acid</i>)
SCE	Eletrodo de calomelano saturado (<i>Saturated Calomel Electrode</i>)
SEM	Microscopia eletrônica de varredura (<i>Scanning Electron Microscopy</i>)
SWV	Voltametria de onda quadrada (<i>Square Wave Voltammetry</i>)
UV	Ultravioleta
UV-vis	Ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1. Eletrodo de Pasta de Carbono	19
2.2. Enzimas	20
2.2.1. Lacase	22
2.3. Imobilização de enzimas	24
2.3.1. Quitosana	27
2.3.2. Ciclodextrina	28
2.4. Biossensores	30
2.5. Líquidos iônicos	32
2.5.1. Líquidos iônicos em eletrodos de pasta de carbono	34
2.5.2. Líquidos iônicos em biossensores de pasta de carbono	36
2.6. Nanopartículas metálicas	38
2.7. Compostos fenólicos	41
2.7.1. Luteolina	44
2.7.2. Quercetina	45
2.8. Técnicas eletroanalíticas	46
2.8.1. Voltametria	47
<i>2.8.1.1. Voltametria de Onda Quadrada</i>	47
3. OBJETIVOS	49
3.1. Objetivo geral	49
3.2. Objetivos específicos	49
3.2.1. Biossensores contendo nanopartículas de prata ou ouro em líquido iônico e lacase imobilizada em quitosana modificada	49
3.2.2. Biossensor contendo nanopartículas de prata em líquido iônico e lacase imobilizada em β-ciclodextrina modificada	49
4. PARTE EXPERIMENTAL	51
4.1. Reagentes e soluções	51
4.2. Instrumentação	53
4.3. METODOLOGIA	54
4.3.1. Extração da lacase da microcápsula	54
4.3.2. Determinação da atividade da lacase	54
4.3.3. Reticulação da quitosana	55
4.3.4. Reticulação da β-ciclodextrina	55
4.3.5. Imobilização da enzima lacase	56
4.3.6. Construção dos biossensores	56

4.3.6.1. <i>Biossensores contendo nanopartículas de prata ou ouro em líquido iônico e lacase imobilizada em quitosana modificada</i>	56
4.3.6.2. <i>Biossensor contendo nanopartículas de prata em líquido iônico e lacase imobilizada em β-ciclodextrina modificada</i>	57
4.3.7. Medidas eletroquímicas	58
4.3.8. Preparação das amostras e determinação de luteolina	58
4.3.9. Preparação das amostras e determinação de quercetina	58
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.1. Biossensores contendo nanopartículas de prata ou ouro em líquido iônico e lacase imobilizada em quitosana modificada	60
5.1.1. Estudo da atividade e estabilidade da lacase	60
5.1.2. Reticulação da quitosana e imobilização da lacase	61
5.1.3. Morfologia das pastas	62
5.1.4. Reação enzimática na superfície do eletrodo	63
5.1.5. Comportamento eletroquímico da luteolina usando diferentes sensores	64
5.1.6. Otimização do método	66
5.1.6.1. <i>Porcentagem de líquido iônico contendo nanopartículas</i>	66
5.1.6.2. <i>Quantidade de enzima</i>	68
5.1.6.3. <i>Eletrólito suporte e pH</i>	68
5.1.6.4. <i>Parâmetros de voltametria de onda quadrada</i>	69
5.1.7. Curva analítica da luteolina	72
5.1.8. Repetibilidade, reprodutibilidade e estabilidade dos biossensores	74
5.1.9. Seletividade e interferentes	75
5.1.10. Estudo de recuperação	77
5.1.11. Determinação de luteolina em chá de camomila	78
5.2. Biossensor contendo nanopartículas de prata em líquido iônico e lacase imobilizada em β-ciclodextrina modificada	81
5.2.1. Estudo da atividade e estabilidade da lacase	81
5.2.2. Reticulação da β-ciclodextrina e imobilização da lacase	82
5.2.3. Reação enzimática na superfície do eletrodo	83
5.2.4. Comportamento eletroquímico da quercetina usando diferentes sensores	84
5.2.5. Otimização do método	86
5.2.5.1. <i>Quantidade de enzima</i>	86

5.2.5.2. Efeito do eletrólito suporte e pH	86
5.2.5.3. Parâmetros de voltametria de onda quadrada	87
5.2.6. Curva analítica da quercetina	90
5.2.7. Repetibilidade, reprodutibilidade e estabilidade do biossensor	91
5.2.8. Seletividade e interferentes	92
5.2.9. Estudo de recuperação	93
5.2.10. Determinação de quercetina em formulação farmacêutica e suco de maçã	94
6. CONCLUSÕES	98
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

1. INTRODUÇÃO

Com o aperfeiçoamento das técnicas eletroanalíticas, os sensores eletroquímicos ganharam novos espaços em diversas áreas da pesquisa, permitindo a detecção e quantificação de substâncias em níveis de concentração cada vez menores. Dentre as espécies de interesse, podemos destacar os compostos fenólicos, uma vez que são explorados em áreas industriais (farmacêutica e alimentos) bem como em áreas do conhecimento (medicina, química, biologia).

A grande aplicabilidade dessas técnicas analíticas está relacionada a vantagens como simplicidade, rapidez, baixo limite de detecção e economia, sendo uma alternativa extremamente viável às tradicionais técnicas cromatográficas. Uma grande desvantagem das mesmas consiste na baixa seletividade eletroquímica. Neste sentido surgem os eletrodos quimicamente modificados, com polímeros, enzimas, moléculas de DNA, etc., que promovem a melhoria desta propriedade, minimizando a possível interferência de várias outras substâncias presentes.

Eletrodos à base de pasta de carbono representam uma excelente opção como eletrodo base, pois possibilitam a modificação interna do material eletródico, onde enzimas, por exemplo, podem ser facilmente incorporadas. Entretanto, o fator chave na construção de biossensores é o procedimento de imobilização da enzima, que permite a obtenção de dispositivos com elevada estabilidade. Ainda em busca do desenvolvimento de sensores e biossensores com melhor desempenho analítico, visando principalmente um aumento de sensibilidade, pesquisadores vêm utilizando líquidos iônicos em substituição total ou parcial aos tradicionais aglutinantes.

A associação de propriedades físico-químicas tais como excelente condutividade iônica, alta estabilidade térmica e química, baixa pressão de vapor e ampla janela eletroquímica de potencial fazem dos líquidos iônicos compostos promissores para aplicação nas mais diversas áreas. Em adição, a organização estrutural desses sais fundidos permite a síntese e estabilização de nanopartículas metálicas. Esses nanomateriais vêm sendo amplamente empregados em diferentes dispositivos, uma vez que suas características únicas como habilidade catalítica e biocompatibilidade proporcionam uma melhora no sinal analítico e/ou no processo de imobilização, além de promoverem a transferência de elétrons entre o material biológico e a superfície do eletrodo.

O emprego de líquidos iônicos contendo nanopartículas dispersas como aglutinantes em eletrodos de pasta de carbono é uma área de

pesquisa ainda recente. Entretanto, acredita-se que esta associação resulte em um efeito sinérgico para a construção de biossensores com características analíticas superiores, especialmente sensibilidade e estabilidade.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Eletrodo de pasta de carbono

Adams em 1958 (ADAMS, 1958) desenvolveu o primeiro eletrodo de pasta de carbono (EPC) renovável, que desde então sofreu um expressivo desenvolvimento e se tornou um dos sensores mais empregados para determinação de compostos em solução.

Pastas de carbono são resultantes de uma mistura de pó de grafite e um líquido orgânico, denominado agente aglutinante. Este agente serve para preencher os interstícios entre as partículas de grafite, formando uma pasta compacta que possibilita sua fixação ao eletrodo. Tamanho uniforme, alta pureza química e baixa capacidade de adsorção de impurezas eletroativas são propriedades indispensáveis ao pó de grafite. O aglutinante deve ser quimicamente inerte e imiscível em soluções aquosas, além de possuir baixa volatilidade, alta viscosidade e elevada pureza. Parafina líquida e Nujol são aglutinantes não condutores amplamente utilizados na preparação de pastas de carbono. Estes eletrodos oferecem versatilidade, baixo custo, baixa corrente de fundo, facilidade de renovação da superfície, ampla faixa de potencial de trabalho e fácil construção (KALCHER *et al.*, 1995; ŠVANCARA e SCHACHL, 1999).

Além de todas as características supracitadas, uma das principais vantagens de utilizar a pasta de carbono para construção de sensores é a possibilidade de modificação interna do material eletrodico, diferentemente do que ocorre com eletrodos sólidos convencionais, em que a modificação ocorre apenas na superfície. Com o avanço das pesquisas em eletroanálise, estudos têm sido realizados com o objetivo principal de se obter novos sensores com desempenho analítico superior para aplicação na determinação de compostos. Deste modo, diferentes materiais como, polímeros, ácidos húmicos, componentes biológicos (ex.: enzimas, tecidos vegetais, etc.), complexos biomiméticos, nanotubos de carbono, líquidos iônicos, nanopartículas, entre outros, vêm sendo incorporados para a modificação dos tradicionais EPC (ŠVANCARA *et al.*, 2001; PEREIRA *et al.*, 2002; CRESPILO e REZENDE, 2007; FERNANDES *et al.*, 2008 A e B; FRANZOI *et al.*, 2008; FRANZOI *et al.*, 2009 A; ŠVANCARA *et al.*, 2009 A e B; FRANZOI *et al.*, 2011).

2.2. Enzimas

As enzimas são componentes especializados na catálise de reações biológicas e estão entre as biomoléculas mais notáveis devido a sua extraordinária especificidade e poder catalítico. Formadas por longas cadeias de aminoácidos unidas através de ligações peptídicas, a maioria das enzimas é de origem protéica, com exceção de um pequeno grupo de moléculas de ácido ribonucléico (RNA, *Ribonucleic Acid*) cataliticamente ativas, as ribozimas. A eficiência catalítica das enzimas é alcançada com a diminuição da energia de ativação necessária para que uma reação química se processe, resultando em um aumento de velocidade e possibilitando a conversão de um tipo de substância (substrato) em outra (produto), não sendo consumidas durante a reação (VOET e VOET, 1990; LEHNINGER *et al.*, 2006).

O centro ou sítio ativo da enzima é o local onde se processam as reações com o substrato. Para o processo catalítico, as apoenzimas requerem apenas seus resíduos de aminoácidos, sendo enzimas de natureza exclusivamente protéica. Entretanto, outras enzimas necessitam de cofatores (componentes químicos adicionais de origem não-protéica) para exercer sua atividade, que podem ser espécies inorgânicas (ex.: íons metálicos: Fe^{3+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+}) ou moléculas orgânicas complexas, denominadas coenzimas (ex.: vitaminas: biotina, tiamina). Uma enzima completa, cataliticamente ativa, unida à sua coenzima e/ou íons metálicos é então chamada de holoenzima. Além disso, a ação catalítica de uma enzima é dependente da temperatura e do pH. Esta pode sofrer desnaturação (perda da conformação protéica nativa), tornando-se inativa, se submetida a agentes como calor, solventes orgânicos, ácidos e bases fortes ou outros materiais (VOET e VOET, 1990; MIKKELSEN e CORTÓN, 2004; LEHNINGER *et al.*, 2006).

As enzimas são formadas por uma complexa estrutura tridimensional de cadeias polipeptídicas, o que lhes proporciona um formato característico e único. Assim, essas biomoléculas são altamente específicas tanto nas reações que catalisam como no reconhecimento de substratos. O substrato deve acomodar-se no sítio ativo da enzima interagindo com os resíduos de aminoácidos e como resultado, ligações químicas são quebradas e/ou formadas (VOET e VOET, 1990; LEHNINGER *et al.*, 2006). Um modelo utilizado para explicar a especificidade enzimática é o do encaixe induzido, proposto por Daniel E. Koshland Jr. em 1958 (Figura 1). De acordo com esta teoria, as cadeias laterais dos aminoácidos que formam o sítio ativo da enzima sofrem uma reorientação, fato este que potencializa a sua ação catalítica.

A modificação no sítio ativo ocorre até que o substrato esteja completamente ligado, sendo definido neste momento a sua conformação final. Uma vez que as enzimas exibem estruturas flexíveis, o substrato não se liga a um sítio ativo rígido, conforme havia sido proposto por Hermann Emil Fischer (modelo chave-fechadura).

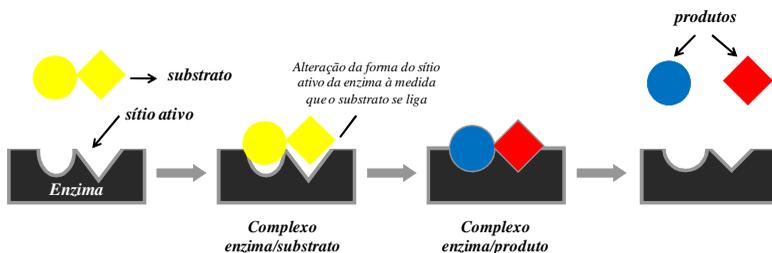


Figura 1. Modelo encaixe-induzido.

As enzimas são divididas em seis classes de acordo com o tipo de reações que catalisam e sua identificação é feita através do seu número EC (*Enzyme Commission*). Tal divisão foi proposta pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB, *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) e está listada abaixo (MIKKELSEN e CORTÓN, 2004):

1. *Oxidorrredutases*: catalisam reações de oxidação e redução (ex.: peroxidase, catecol oxidase, lacase);
2. *Transferases*: catalisam a transferência de grupos funcionais entre moléculas (ex.: transaldolase, transaminase, transcetolase);
3. *Hidrolases*: facilitam a quebra de ligações como C–C, C–O, C–N com o auxílio da água (ex.: urease, fosfatase, lipase);
4. *Liases*: catalisam a quebra dessas mesmas ligações pela eliminação de grupos funcionais, formando ligações duplas ou atuam de modo inverso, catalisam a adição de grupos funcionais através de ligações duplas (ex.: oxalato descarboxilase, carbonato desidratase, isocitrato liase);
5. *Isomerases*: facilitam rearranjos geométricos ou estruturais, e também transformam uma molécula em seu isômero (ex.: arabinose isomerase, alfa tirosina, maleato isomerase);
6. *Ligases*: realizam reações de condensação associadas ao consumo de energia proveniente da hidrólise de uma ligação pirofosfato do

trifosfato de adenosina (ATP, *Adenosine Triphosphate*) (ex.: piruvato carboxilase, acetato-CoA ligase).

2.2.1. Lacase

A lacase (Lac) (EC 1.10.3.2) é uma enzima multicobre com alta massa molar pertencente à classe das oxidorreduzases. São enzimas que agem sobre uma variedade de substratos aromáticos, particularmente fenólicos (PhOH), catalisando a oxidação de seus grupos hidroxilas a radicais fenóxi (PhO[•]), com simultânea redução do oxigênio à água, como ilustrado na Figura 2 (MAYER e STAPLES, 2002; DURÁN *et al.*, 2002; RIVA, 2006; COUTO e HERRERA, 2006; WIDSTEN e KANDELBAUER, 2008; DWIVEDI *et al.*, 2011).

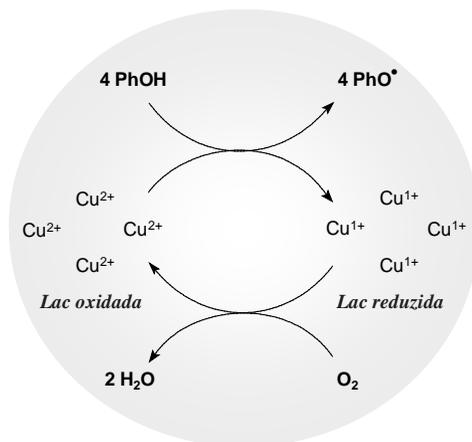


Figura 2. Representação esquemática do ciclo catalítico da Lac (RIVA, 2006).

O ciclo catalítico envolve sucessivas transferências de elétrons entre os átomos de cobre pertencentes à mesma enzima. A Lac nativa é constituída por quatro átomos de cobre com estado de oxidação 2+. À medida que a reação se processa, a Lac promove a oxidação dos PhOH, até redução de todos os seus átomos de cobre (representada como Lac reduzida), que então sofre reoxidação, liberando duas moléculas de água a partir da redução de uma molécula de oxigênio molecular (DURÁN *et al.*, 2002; RIVA, 2006; DWIVEDI *et al.*, 2011).

Em geral, esta enzima necessita de quatro átomos de cobre para realizar o seu mecanismo catalítico. A partir de características

funcionais e espectroscópicas específicas, mostrou-se que estes átomos estão distribuídos em diferentes sítios de ligação e são classificados em três tipos (Figura 3). O átomo de cobre Tipo 1 ou azul forma o sítio mononuclear que está envolvido na captura e transferência de elétrons (oxidação do substrato). Um cobre Tipo 2 e dois cobres Tipo 3 (sítio trinuclear) participam da ligação com o oxigênio, sendo responsáveis pela redução do oxigênio molecular e liberação de água (DURÁN *et al.*, 2002; PIONTEK *et al.*, 2002; RIVA, 2006; HAKULINEN *et al.*, 2006; DWIVEDI *et al.*, 2011).

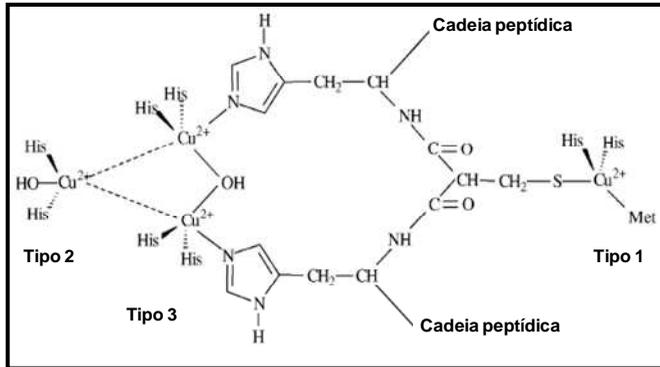


Figura 3. Representação estrutural do sítio ativo das Lac (DURÁN *et al.*, 2002).

Lac estão amplamente distribuídas em plantas superiores, fungos e algumas bactérias. A existência dessa enzima foi demonstrada pela primeira vez por Yoshida em 1883, em uma planta (*Rhus vernicifera*), e foi caracterizada como uma cobre oxidase por Bertrand em 1985. Posteriormente, foi descoberta a principal fonte dessas enzimas: os fungos. Dentre eles, destacam-se os basidiomicetos, denominados fungos “da podridão branca da madeira”, pois estão envolvidos na degradação da lignina (MAYER e STAPLES, 2002; WIDSTEN e KANDELBAUER, 2008; DWIVEDI *et al.*, 2011). O fungo *Trametes versicolor* é uma das fontes de Lac e sua estrutura tridimensional está ilustrada na Figura 4 (PIONTEK *et al.*, 2002).

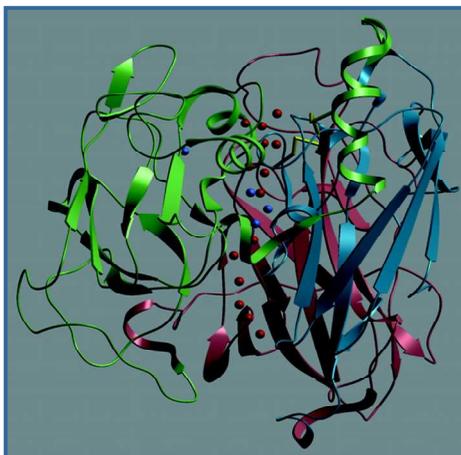


Figura 4. Estrutura tridimensional da Lac (*Trametes versicolor*): íons cobre são descritos como esferas azuis e moléculas de água como esferas vermelhas (PIONTEK *et al.*, 2002).

Reações enzimáticas oferecem vantagens devido ao fato de as enzimas serem específicas e catalisadores biodegradáveis. Deste modo, existe um amplo interesse pelas Lac, devido às suas múltiplas aplicações nas indústrias alimentícias, têxteis e de papel, bem como em áreas biotecnológicas, em especial, biorremediação de águas e solos contaminados (DURÁN *et al.*, 2002; MINUSSI *et al.*, 2002; MAYER e STAPLES, 2002; COUTO e HERRERA, 2006; WIDSTEN e KANDELBAUER, 2008; DWIVEDI *et al.*, 2011). Além disso, há uma grande utilização destas enzimas em laboratórios de pesquisa, como por exemplo, em reações de síntese orgânica e na construção de eletrodos (biossensores) para determinação de compostos em solução (DURÁN *et al.*, 2002; MINUSSI *et al.*, 2002; SANTHIAGO e VIEIRA, 2007; FERNANDES *et al.*, 2008 B; DIACONU *et al.*, 2010; Di FUSCO *et al.*, 2010).

2.3. Imobilização de enzimas

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 e diminuição dos custos das reações catalisadas (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; MATEO *et al.*, 2007; KRAJEWSKA, 2004; KOSSEVA *et al.*, 2009).

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 das do suporte e reagentes usados na imobilização, os quais devem ser criteriosamente escolhidos para não alterar o sítio ativo da enzima. Uma infinidade de materiais vem sendo empregada com o propósito de se obter biocatalisadores com propriedades superiores, em comparação à sua forma livre, tais como: quitina (DURÁN *et al.*, 2002; KRAJEWSKA, 2004; FERNANDES *et al.*, 2007), quitosana (DURÁN *et al.*, 2002; KRAJEWSKA, 2004; OLIVEIRA e VIEIRA, 2006; FERNANDES *et al.*, 2008 B; MOCCELINI *et al.*, 2008; DIACONU *et al.*, 2010; de LIMA *et al.*, 2010), alginato (DURÁN *et al.*, 2002; DING *et al.*, 2008; NILAVEDI *et al.*, 2008), celulose (DURÁN *et al.*, 2002; REN *et al.*, 2009; WU *et al.*, 2009) e ciclodextrina (ZHU *et al.*, 2000; CAMACHO *et al.*, 2007; OZMEN *et al.*, 2009; OZMEN e YILMAZ, 2009).

São indiscutíveis as vantagens fornecidas por este processo, assim, vários procedimentos de imobilização de enzimas têm sido desenvolvidos (Figura 5). 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 (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; KRAJEWSKA, 2004; MATEO *et al.*, 2007; KOSSEVA *et al.*, 2009).

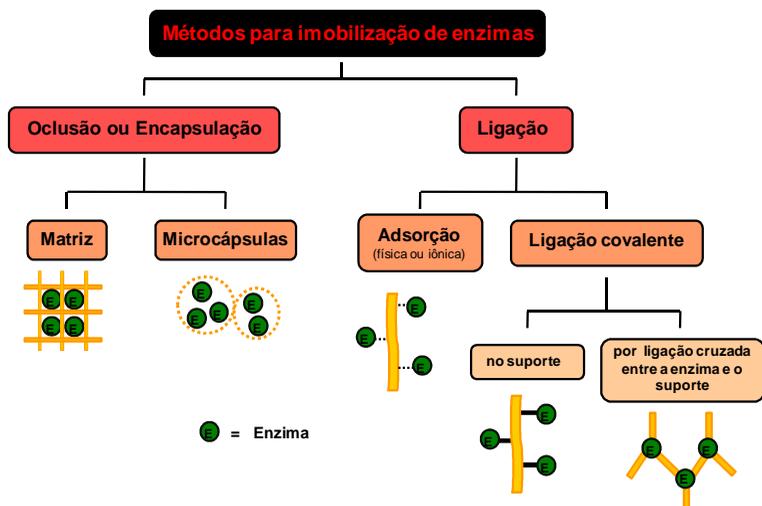


Figura 5. Métodos para imobilização de enzimas (adaptado de DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004).

A imobilização via oclusão ou microencapsulação consiste em confinar ou aprisionar a enzima em uma matriz polimérica insolúvel ou em uma microcápsula. O método da oclusão envolve o confinamento da enzima nos interstícios formados entre as ligações covalentes cruzadas de um polímero. Devido à irregularidade estrutural da matriz, a perda de enzima através dos poros maiores é uma grande desvantagem. Já o método da microencapsulação envolve o confinamento de enzimas em pequenas esferas de membranas semipermeáveis (ex.: acetato de celulose, policarbonato, colágeno). Nesta metodologia a biomolécula é totalmente envolvida pelo sistema, o que dificulta a sua lixiviação para o meio. Ambas as técnicas apresentam a vantagem da enzima não interagir quimicamente com o suporte, o que pode ser muito importante para evitar possível diminuição da atividade enzimática. Contudo, a lenta velocidade de difusão dos substratos e produtos através da membrana porosa é um fator limitante (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; KRAJEWSKA, 2004; MATEO *et al.*, 2007; KOSSEVA *et al.*, 2009).

A adsorção é um dos procedimentos mais simples e mais utilizados para imobilização enzimática. Neste método, o biocatalisador é unido ao suporte através de interações de baixa energia, como por exemplo, forças de Van der Waals ou interação eletrostática, sem modificação química. Estabilidade, capacidade de adsorção, porosidade

e tamanho dos poros são algumas características indispensáveis ao suporte para o sucesso da adsorção de uma enzima. Vários materiais podem ser aplicados para esse tipo de imobilização, tais como celulose, sílica, quitosana, quitina e polietileno, entre outros. Porém, uma das principais desvantagens deste método é a dessorção da biomolécula do suporte (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; KRAJEWSKA, 2004; MATEO *et al.*, 2007; KOSSEVA *et al.*, 2009).

Os métodos baseados na imobilização por ligação covalente apresentam a grande vantagem de exercerem uma forte ligação enzima-suporte, diminuindo o processo de dessorção da enzima e aumentando a estabilidade frente a variáveis como pH, solvente e temperatura. Este procedimento envolve a modificação química de um resíduo de aminoácido da enzima através da ligação covalente entre seus grupos funcionais não essenciais à atividade catalítica, com grupos reativos dos suportes. Na ligação covalente cruzada, reagentes bi ou multifuncionais são utilizados para reagirem com os grupos livres contidos na cadeia polimérica formando uma rede tridimensional entre o suporte, assim como a formação de ligações cruzadas entre as moléculas de enzima e do suporte. Dentre os reagentes mais usados estão a glicoxal, epicloridrina, glutaraldeído e dentre os suportes comumente empregados estão quitina, quitosana e sílica (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; KRAJEWSKA, 2004; MATEO *et al.*, 2007; KOSSEVA *et al.*, 2009).

2.3.1. Quitosana

A quitina é o segundo polissacarídeo natural mais abundante na natureza e está presente em uma variedade de animais marinhos (caranguejo, camarão, lagosta), insetos e fungos. A quitosana (QTS) (Figura 6), obtida através da reação de desacetilação parcial da quitina em meio alcalino, é o seu derivado mais importante. Quitina e QTS são constituídas por unidades de 2-acetamida-2-desoxi-D-glicose e 2-amino-2-desoxi-D-glicose unidas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$, entretanto esses biopolímeros diferem quanto à proporção relativa dessas unidades e quanto à solubilidade. A quitina, que é insolúvel em meio aquoso e na maioria dos solventes orgânicos, apresenta uma estrutura com predomínio de grupos acetamida ($-\text{NHCOCH}_3$), já a QTS, onde predominam os grupamentos amino ($-\text{NH}_2$), apresenta solubilidade em soluções aquosas diluídas de ácidos. A insolubilidade da quitina é o maior fator limitante da sua utilização (KRAJEWSKA, 2004; LARANJEIRA e FÁVERE, 2009).

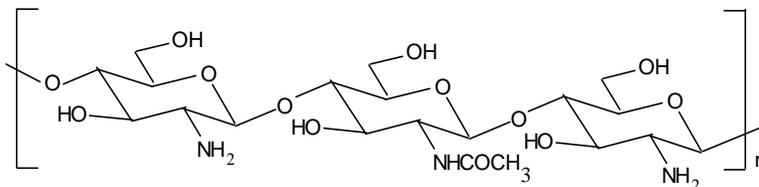


Figura 6. Estrutura química da QTS.

A biocompatibilidade, biodegradabilidade, atoxicidade e baixo custo da QTS são propriedades que vêm sendo exploradas em aplicações industriais e tecnológicas. Além disso, o alto percentual de grupos amino e hidroxila disponíveis na matriz deste biopolímero permite a sua modificação com agentes reticulantes como glutaraldeído, epícloridrina, tripolifosfato e citrato, que promovem um aumento de estabilidade e resistência mecânica. A QTS é empregada na biomedicina, em produtos farmacêuticos, na agricultura, na indústria de cosméticos e de alimentos e, também, como adsorvente na remoção de corantes e metais para o tratamento de água e efluentes industriais (KUMAR, 2000; CRINI, 2005; CRINI e BADOT, 2008; LARANJEIRA e FÁVERE, 2009). Em adição, todas essas excelentes características da QTS proporcionam um ambiente favorável para imobilização de componentes biológicos, particularmente enzimas, sendo comumente usada no desenvolvimento de biossensores (DURÁN *et al.*, 2002; KRAJEWSKA, 2004; OLIVEIRA e VIEIRA, 2006, FERNANDES *et al.*, 2008 B; MOCCELINI *et al.*, 2008, DIACONU *et al.*, 2010; de LIMA *et al.*, 2010).

2.3.2. Ciclodextrina

Ciclodextrinas (CD) são oligossacarídeos cíclicos formados por moléculas de D-glicose unidas através de ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow4)$ (Figura 7A), obtidas por hidrólise enzimática do amido. As CD mais conhecidas são as α , β e γ -CD, constituídas por 6, 7 e 8 unidades de glicose, respectivamente, que adotam a conformação de cadeira. A orientação cíclica estabelece uma estrutura cônica tubular, ilustrada pela Figura 7B, com o lado mais largo formado pelas hidroxilas secundárias em C-2 e C-3 e a face mais estreita constituída pela hidroxila primária ligadas em C-6. Esse arranjo estrutural confere a estes açúcares propriedades físico-químicas únicas, sendo capazes de encapsular em sua cavidade moléculas hidrofóbicas (BRITTO *et al.*, 2004; FRACETO

et al., 2007; OGOSHI e ARADA, 2008).

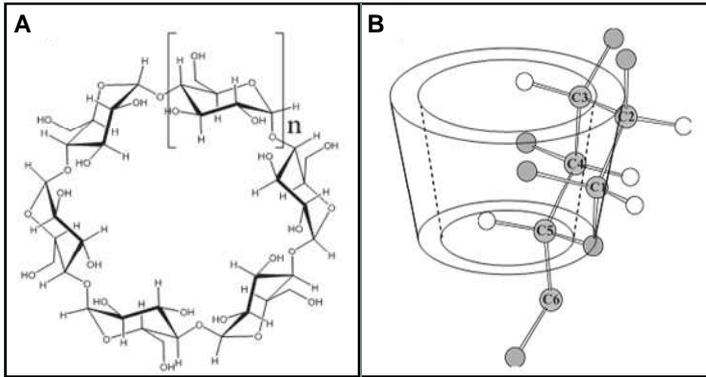


Figura 7. (A) Estrutura geral das CD. O índice n representa o número de glicoses adicionais: $n = 1$ (α -CD), $n = 2$ (β -CD) e $n = 3$ (γ -CD) e (B) Representação da estrutura funcional das CD (BRITTO *et al.*, 2004).

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, dentre as quais podemos citar: alimentos, cosméticos e farmacêutica (DEL VALLE, 2004; BRITTO *et al.*, 2004; PINTO *et al.*, 2005; CAL e FRACETO *et al.*, 2007; CENTKOWSKA, 2008; OGOSHI e ARADA, 2008). Destaca-se ainda a aplicação de β -CD na modificação de eletrodos com a finalidade de melhorar a seletividade e/ou sensibilidade do sensor base (ROA-MORALES *et al.*, 2005; RAMÍREZ-BERRIOZABAL *et al.*, 2008; JIN *et al.*, 2009; CAO *et al.*, 2011).

Em adição, existe um considerável interesse na preparação de polímeros de β -CD através do uso de agentes reticulantes, tais como, epícloridrina e diisocianatos. Esses materiais vêm sendo empregados como adsorventes para remoção de poluentes orgânicos e metais pesados de águas residuais (CRINI, 2005; ROMO *et al.*, 2008; ZHAO *et al.*, 2009) e como matriz para imobilização e estabilização de enzimas (ZHU *et al.*, 2000; OZMEN *et al.*, 2009; OZMEN e YILMAZ, 2009), para posterior aplicação em biossensores.

2.4. Biossensores

Um biossensor pode ser definido como um dispositivo analítico composto por um componente biológico (receptor bioquímico) intimamente em contato com um elemento de transdução, o qual deve ser capaz de transformar a resposta biológica em um sinal elétrico proporcional à concentração do analito presente em uma amostra. Enzimas, anticorpos, antígenos, oligonucleotídeos, organelas, células e tecidos vegetais têm sido utilizados como elementos biológicos de reconhecimento. Os transdutores podem ser classificados em eletroquímicos (amperométricos, potenciométricos, condutimétricos ou transistores de efeito de campo (FET, *Field Effect Transistor*)), calorimétricos, ópticos ou piezolétricos (FATIBELLO-FILHO e CAPELATO, 1992; MELLO e KUBOTA, 2002; PEREIRA *et al.*, 2002; GRIESHABER *et al.*, 2008).

A Figura 8 mostra esquematicamente os componentes que constituem um biossensor.

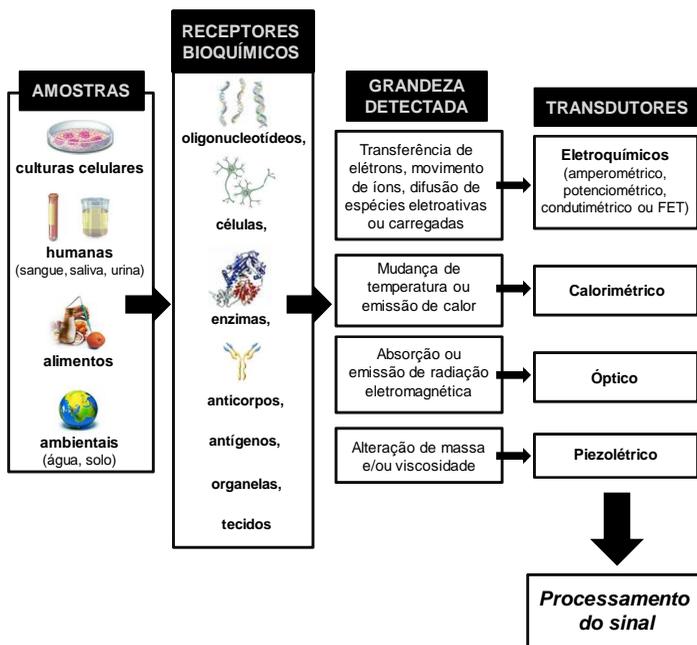


Figura 8. Componentes utilizados no desenvolvimento de biossensores (adaptado de MELLO e KUBOTA, 2002; GRIESHABER *et al.*, 2008).

O princípio básico de funcionamento consiste no reconhecimento do analito por meio de um receptor bioquímico. Esta interação seletiva resulta na variação de alguma propriedade físico-química (emissão ou absorção de radiação eletromagnética, variação de massa, emissão de calor, transferência de elétrons, movimento de íons, etc.), gerando um sinal que é detectado e então, convertido pelo transdutor a uma resposta mensurável. Finalmente ocorre a amplificação e processamento dessa resposta correspondente à concentração do analito (FATIBELLO-FILHO e CAPELATO, 1992; MELLO e KUBOTA, 2002; PEREIRA *et al.*, 2002; GRIESHABER *et al.*, 2008).

Clark & Lyons, em 1962, construíram o primeiro sensor amperométrico para detecção de glicose utilizando glicose oxidase (GOx) imobilizada em uma membrana de celulose acoplada a um eletrodo de oxigênio (FATIBELLO-FILHO e CAPELATO, 1992). Posteriormente, em 1972, a Yellow Spring Instrument Co comercializou o primeiro biossensor para detecção de glicose no corpo humano. Desde então, diversos outros biossensores foram construídos e empregados na análise química de uma variedade de substâncias nas áreas biológica, clínica, ambiental, industrial, agrícola, alimentícia e científica. Este crescente desenvolvimento é justificado devido às inúmeras vantagens apresentadas por estes dispositivos: baixo custo, facilidade de operação e construção, boa sensibilidade, seletividade e estabilidade, reprodutibilidade, resposta rápida, possibilidade de miniaturização e portabilidade (FATIBELLO-FILHO e CAPELATO, 1992; MELLO e KUBOTA, 2002; PEREIRA *et al.*, 2002; GRIESHABER *et al.*, 2008).

Dentre os biossensores, destacam-se os enzimáticos, que combinam a seletividade e sensibilidade da enzima com a simplicidade dos transdutores eletroquímicos. Enzimas purificadas ou tecidos vegetais podem ser aplicados para este propósito. A imobilização e estabilização dessa biomolécula é a etapa crítica na construção desses dispositivos. Em adição, a pasta de carbono é um material largamente aplicado como eletrodo base na preparação de biossensores devido às vantagens descritas anteriormente, especialmente pela possibilidade de modificação interna do material eletródico. (FATIBELLO-FILHO e CAPELATO, 1992; ŠVANCARA *et al.*, 2001; DURÁN *et al.*, 2002; MINUSSI *et al.*, 2002; MELLO e KUBOTA, 2002; PEREIRA *et al.*, 2002; OLIVEIRA e VIEIRA, 2006; FERNANDES *et al.*, 2007; SANTHIAIGO e VIEIRA, 2007; FERNANDES *et al.*, 2008 B; MOCCELINI *et al.*, 2008; ŠVANCARA *et al.*, 2009 A e B).

2.5. Líquidos iônicos

Uma substância encontra-se no estado líquido quando as interações entre as espécies constituintes são mais fortes do que aquelas existentes no estado gasoso, porém mais fracas do que aquelas presentes no estado sólido. Assim, a maior parte dos líquidos é constituída por moléculas neutras, uma vez que a presença de espécies carregadas determinaria a existência de interações iônicas, normalmente fortes para conduzir a substância ao estado sólido. Entretanto, uma análise mais detalhada sobre a natureza dessas interações em substâncias iônicas mostra que estas têm uma ampla variação, possibilitando a obtenção de líquidos com caráter iônico (CONSORTI *et al.*, 2001).

A história dos líquidos iônicos (LI) iniciou em 1914 com a síntese de um sal líquido a temperatura ambiente, nitrato de etilamônio, por Walden, o qual apresentou baixo ponto de fusão (12 °C). Os grupos de pesquisa de Osteryoung e Hussey desenvolveram LI contendo o ânion cloroaluminato ($Al_2Cl_7^-$) e os cátions alquilpiridínio (PI^+) (CHUM *et al.*, 1975; GALE *et al.*, 1978; ROBINSON e OSTERYOUNG, 1979) ou 1,3-dialquilimidazólio (I^+) (WILKES *et al.*, 1982). Posteriormente, Wilkes e Zaworotko (WILKES e ZAWOROTKO, 1992) descreveram uma nova classe de LI, baseados no cátion 1-etil-3-metilimidazólio (EMI^+) e em ânions como o tetrafluorborato (BF_4^-) e hexafluorofosfato (PF_6^-). Estes compostos despertaram grande interesse em diversos campos do conhecimento e constituem hoje uma área emergente que está em expressivo crescimento.

Basicamente, LI ou sais fundidos (líquidos à temperatura ambiente) podem ser definidos como eletrólitos constituídos apenas por íons (cátions orgânicos e ânions orgânicos ou inorgânicos), que apresentam fracas interações interiônicas, baixa energia de retículo cristalino, baixa pressão de vapor, habilidade catalítica, alta estabilidade química e térmica. Uma característica peculiar dos LI é a ampla possibilidade de variação de suas propriedades físico-químicas. Propriedades como viscosidade, miscibilidade em água e condutividade, por exemplo, podem ser moduladas através das diferentes combinações entre cátions e ânions, com a finalidade de se obter um solvente adequado para a aplicação que se queira realizar (CONSORTI *et al.*, 2001; WEI e IVASKA, 2008; O'MAHONY *et al.*, 2008; SHIDDIKY e TORRIERO, 2011; FRANZOI *et al.*, 2011). Cátions e ânions comumente presentes na estrutura dos LI estão representados na Figura 9 e Tabela 1.

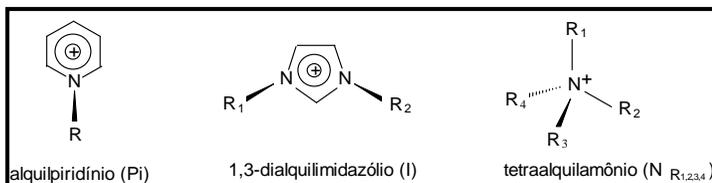


Figura 9. Estruturas de cátions que compõem LI (R, R₁, R₂, R₃ e R₄ = cadeias alquílicas) (FRANZOI *et al.*, 2011).

Tabela 1. Nomes e abreviaturas de alguns ânions presentes em LI (CONSORTI *et al.*, 2001; WEI e IVASKA *et al.*, 2008; FRANZOI *et al.*, 2011).

Ânions	Nome	Abreviatura
Cl ⁻	cloreto	.Cl
Br ⁻	brometo	.Br
BF ₄ ⁻	tetrafluoroborato	.BF ₄
PF ₆ ⁻	hexafluorofosfato	.PF ₆
NO ₃ ⁻	nitrato	.NO ₃
Al ₂ Cl ₇ ⁻	cloroaluminato	.Al ₂ Cl ₇
CH ₃ CO ₂ ⁻	acetato	.Ac
CH ₃ SO ₄ ⁻	metilsulfato	.MeSO ₄
(CF ₃ SO ₂) ₂ N ⁻	bis(trifluorometanosulfonyl)imidato	.N(Tf) ₂

Em virtude de suas características únicas, em especial, inflamabilidade, volatilidade e toxicidade desprezíveis, estes materiais vêm atraindo a atenção de pesquisadores e indústrias interessados em tecnologias limpas, a conhecida “química verde”. Atualmente, LI estão sendo utilizados, com grande sucesso, como substitutos dos solventes orgânicos tradicionais, que geralmente são bastante voláteis e nocivos. Podemos destacar suas aplicações como solventes em reações orgânicas e organometálicas (DUPONT *et al.*, 2000; EARLE e SEDDON, 2000; DUPONT *et al.*, 2002 A; ZHAO e MALHOTRA, 2002; SHARIFI *et al.*, 2010), em processos de extração (LIU *et al.*, 2005 A; PENG *et al.*, 2007) e em biocatálise (ZHAO e MALHOTRA, 2002; PERSSON e BORNSCHEUER, 2003; YANG e PAN, 2005; van RANTWIJK e SHELDON, 2007; MONIRUZZAMAN *et al.*, 2010), e também como catalisadores em reações orgânicas (GOLEDZINOWISKI *et al.*, 1993; HOWARTH *et al.*, 1997).

Além de todas as suas excelentes propriedades físico-químicas,

os LI derivados da associação do cátion 1-*n*-butil-3-metilimidazólio (BMI⁺) e ânions fracamente coordenantes (como por exemplo: BF₄⁻, PF₆⁻ e N(Tf)₂⁻) apresentam excelente condutividade, viscosidade relativamente baixa e ampla janela eletroquímica de potencial. Deste modo, esses LI têm ganhado notável espaço em estudos eletroquímicos, onde são usados como eletrólito suporte (BUZZEO *et al.*, 2004; GHILANE *et al.*, 2008; ANDRIKO *et al.*, 2010) ou eletrólitos de dispositivos como baterias ou capacitores (HAYASHI *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2006; WEI e IVASKA, 2008; LEWANDOWSKI e ŚWIDERSKA-MOCEK, 2009; SUN e SUN, 2010; SHIDDIKY e TORRIERO, 2011). Na Tabela 2 estão listados os valores de viscosidade e condutividade para diversos LI, em função do tipo de ânion e cátion presentes em sua estrutura.

Tabela 2. Viscosidade (η) e condutividade (σ) de alguns LI (T = 25 °C) (BUZZEO *et al.*, 2004; O'MAHONY *et al.*, 2008).

LI	η (mPa s)	σ (mS cm ⁻¹)
BMI.N(Tf) ₂	44	3,9
HMI.N(Tf) ₂	59	-
EMI.BF ₄	43	13,0
BMI.BF ₄	112	1,7
BMI.PF ₆	275	1,5
BPI.N(Tf) ₂	89	2,2
HMI.Cl	7456	-
N _{6,2,2,2} .N(Tf) ₂	167	0,7

Outro emprego dos LI no campo analítico é a sua incorporação em sensores e biossensores de pasta de carbono, através da substituição total ou parcial dos tradicionais aglutinantes não condutores. Essa aplicação teve início nos últimos anos, mas vem ganhando um espaço expressivo dentro da vasta família de EPC modificados, fato este que pode ser confirmado pelos inúmeros trabalhos publicados em revistas especializadas.

2.5.1. Líquidos iônicos em eletrodos de pasta de carbono

Os eletrodos à base de pó de grafite contendo como aglutinante apenas LI são conhecidos como eletrodos de carbono e líquido iônico

(ECLI), entretanto, quando há somente uma substituição parcial do aglutinante tradicional pelo LI, pode-se denominar simplesmente de EPC modificado com LI (EPC-LI). Diversos grupos de pesquisa têm realizado estudos nesta área visando a construção de sensores com desempenho analítico superior ao EPC tradicional (LIU *et al.*, 2005 B; MALEKI *et al.*, 2006; SAFAVI *et al.*, 2006; MALEKI *et al.*, 2007; SAFAVI *et al.*, 2007; ZHANG e ZHENG, 2007; ZHENG *et al.*, 2007; SUN *et al.*, 2007; SUN *et al.*, 2008 A, B e C; MUSAMEH *et al.*, 2008; MUSAMEH e WANG, 2008; CHERNYSHOV *et al.*, 2008; WEI e IVASKA, 2008; SHIDDIKY e TORRIERO, 2011; FRANZOI *et al.*, 2011).

A microscopia eletrônica de varredura (SEM, *Scanning Electron Microscopy*) mostra as diferenças significativas entre um EPC e um ECLI construídos com a mesma proporção (em massa) de aglutinantes. A Figura 10 apresenta as características morfológicas desses dois eletrodos (FRANZOI *et al.*, 2011). O EPC (Figura 10B) é caracterizado por uma superfície formada por flocos de carbono irregulares e cada camada pode ser claramente distinguida. Não há um meio de condução apropriado entre as camadas no EPC, assim as cargas são dificilmente transferidas devido à presença do aglutinante não condutor. No ECLI (Figura 10A), não se observa esta separação, sendo sua superfície mais uniforme. Lis não agem somente como aglutinantes para formar uma pasta, também preenchem os interstícios vazios entre as partículas de grafite, formando uma ponte entre as camadas de carbono, possibilitando a transferência de carga. Morfologias semelhantes foram observadas em outros trabalhos relatados na literatura (LIU *et al.*, 2005; MALEKI *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2007; SUN *et al.*, 2007).

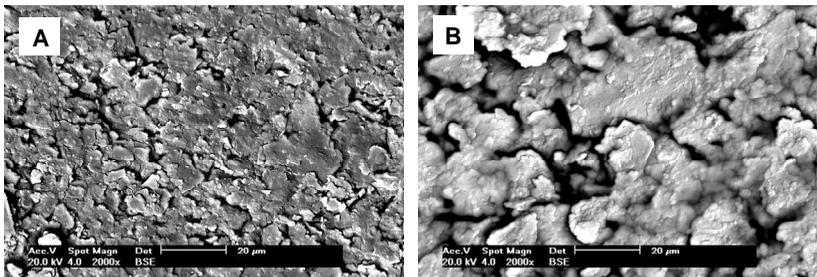


Figura 10. Micrografias eletrônicas da superfície de um (A) ECLI construído com o LI BMI.PF₆ e (B) EPC não modificado (FRANZOI *et al.*, 2011).

Sun e colaboradores (SUN *et al.*, 2008 B) investigaram o comportamento eletroquímico da hidroquinona utilizando um ECLI com hexafluorofosfato de *n*-butilpiridínio (BPI.PF₆) como aglutinante. Os voltamogramas cíclicos da hidroquinona foram comparados e de acordo com os pesquisadores, dois aspectos foram observados: diminuição na separação entre os potenciais de pico catódico e anódico (ΔE_p) e aumento significativo na corrente de pico, quando utilizado o ECLI em comparação ao EPC. A resposta do eletrodo contendo LI é superior devido às contribuições dos dois materiais condutores, o grafite e o LI. Além disso, o LI forma uma ponte condutora que proporciona uma reação eletrocatalítica com taxas de transferência de elétrons mais elevadas, ou seja, aumentando a reversibilidade e melhorando a sensibilidade do sensor. Sob condições experimentais previamente otimizadas para o ECLI, construiu-se uma curva analítica a partir da corrente de pico anódica *versus* concentração de hidroquinona, apresentando linearidade em um intervalo de $5,0 \times 10^{-6}$ a $5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ com um limite de detecção de $2,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.

Zhang e colaboradores (ZHANG e ZHENG, 2007) desenvolveram um ECLI à base do LI hexafluorofosfato de 1-heptil-3-metilimidazólio (HpMI.PF₆) para quantificação de hidroquinona. Os autores ressaltaram as vantagens da aplicação do LI, tais como condutividade e eficiência na transferência de elétrons que melhoraram o desempenho do eletrodo. A curva analítica apresentou linearidade na faixa de $1,0 \times 10^{-5}$ a $1,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ e um limite de detecção de $4,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. Além disso, o ECLI demonstrou excelente reprodutibilidade com um desvio padrão relativo de 1,4%.

2.5.2. Líquidos iônicos em biossensores de pasta de carbono

Nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo estudos na linha de biossensores modificados com LI, especialmente para detecção de compostos fenólicos, utilizando enzimas oxidoredutases purificadas ou obtidas de extratos brutos de vegetais (MAGUERROSKI *et al.*, 2009; BRONDANI *et al.*, 2009 A; FRANZOI *et al.*, 2009 B e C; FRANZOI *et al.*, 2010 A).

Um homogenato de milho verde (*Zea mays* L.) foi aplicado como fonte de peroxidase (HRP, *Horseradish Peroxidase*) na construção de um biossensor contendo BMI.PF₆. Um dos propósitos deste trabalho foi investigar a influência de diferentes proporções de Nujol: BMI.PF₆ (100:0, 50:50 e 0:100%, m/m) na resposta do biossensor utilizando voltametria cíclica e de onda quadrada. Os autores verificaram um

aumento na corrente de pico desta catecolamina até a proporção 50:50%, atribuída à condutividade do LI que aumenta a taxa de transferência de elétrons. Este biossensor foi selecionado para determinação de adrenalina em amostras farmacêuticas e apresentou uma faixa de trabalho de $9,89 \times 10^{-7}$ a $1,22 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ com um limite de detecção de $2,27 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ (BRONDANI *et al.*, 2009 A). O mesmo comportamento (proporção Nujol:LI - 50:50%, m/m) foi observado para outros biossensores (FRANZOI *et al.*, 2009 B e C; MAGUERROSKI *et al.*, 2009; FRANZOI *et al.*, 2010 A).

Biossensores contendo Lac (*Aspergillus oryzae*) e LI BMI.PF₆ ou BMI.BF₄ foram construídos para a quantificar ácido rosmarínico em extrato de melissa (*Melissa officinalis* L.). O biossensor com BMI.PF₆ apresentou maior resposta de corrente para a redução da *o*-quinona a ácido rosmarínico quando comparado com a resposta do biossensor contendo BMI.BF₄ e com o EPC. Relacionou-se esse comportamento à estrutura hidrofóbica do PF₆⁻ como contra-íon do cátion imidazol, proporcionando um melhor desempenho ao biossensor. Após otimização do método, o biossensor apresentou características analíticas favoráveis como alta sensibilidade, ampla faixa linear ($9,99 \times 10^{-7}$ – $6,54 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹), baixo limite de detecção ($1,88 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹), boa reprodutibilidade e estabilidade (FRANZOI *et al.*, 2009 B).

O LI hidrofóbico BMI.N(Tf)₂ foi incorporado em diferentes biossensores para investigar o comportamento eletroquímico de compostos fenólicos, tais como: ácido rosmarínico (MAGUERROSKI *et al.*, 2009), rutina (FRANZOI *et al.*, 2009 C) e adrenalina (FRANZOI *et al.*, 2010 A). Todos os dispositivos forneceram resposta superior ao tradicional EPC em suas determinações, confirmando a vantagem de se usar LI como aglutinante.

Como citado anteriormente, LI têm mostrado boa compatibilidade com biomoléculas em comparação aos solventes orgânicos convencionais ou soluções aquosas (ZHAO e MALHOTRA, 2002; PERSSON e BORNSCHEUER, 2003; YANG e PAN, 2005; van RANTWIJK e SHELDON, 2007; MONIRUZZAMAN *et al.*, 2010). Supõe-se que a ligação de hidrogênio e a interação eletrostática entre o LI e a enzima resultem em uma alta barreira cinética que protege a enzima contra desnaturação.

Alguns trabalhos reportados na literatura demonstram que o aumento da estabilidade de enzimas na presença de LI associado à condutividade desses líquidos fornece biossensores com excelente desempenho para aplicação na determinação de uma infinidade de substâncias (DING *et al.*, 2008; SHANGGUAN *et al.*, 2008;

SHIDDIKY e TORRIERO, 2011).

Ding e colaboradores (DING *et al.*, 2008) propuseram um biossensor modificado com o LI BPI.PF₆, utilizando HRP como material biológico, para determinação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Após a construção do ECLI, uma solução contendo HRP foi depositada sobre a superfície do eletrodo, que posteriormente foi recoberta por um filme de alginato de sódio. Estudos eletroanalíticos e morfológicos demonstraram dois pontos interessantes: um aumento na intensidade da corrente devido à presença do aglutinante condutor e que alginato-LI proporcionam um microambiente favorável para realização do processo biocatalítico. O biossensor proposto apresentou elevada sensibilidade, boa reprodutibilidade e estabilidade e um limite de detecção de $5,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹.

Shangguan e outros (SHANGGUAN *et al.*, 2008), em uma investigação pioneira, construíram um biossensor para detecção de glicose em sangue humano através da imobilização direta da GOx na superfície de um ECLI. Resultados experimentais indicaram que a reação eletroquímica é quase reversível ($\Delta E_p = 0,056$ V) e que o LI fornece um meio apropriado para imobilização da GOx e para transferência direta de elétrons entre GOx e ECLI. Este excelente microambiente devido ao efeito do LI contribuiu para o bom desempenho do biossensor, que apresentou uma faixa de trabalho de $1,0 \times 10^{-7}$ a $8,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ com um limite de detecção de $3,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ e estabilidade durante 20 dias.

2.6. Nanopartículas metálicas

A nanotecnologia estende a ciência de materiais para o domínio de partículas e interfaces com dimensões extremamente pequenas, da ordem de 1 a 100 nanômetros ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$). Partículas deste tamanho apresentam uma grande área superficial e, freqüentemente, exibem propriedades eletrônicas, ópticas, magnéticas ou químicas distintas de partículas e superfícies macroscópicas. Este tipo de tecnologia tem atraído considerável atenção nos últimos anos, principalmente no desenvolvimento de diferentes sensores, pela expectativa do impacto que estes compostos nanoestruturados podem causar na melhoria do desempenho destes dispositivos (sensibilidade, detectabilidade, estabilidade). Nanopartículas metálicas, nanopartículas magnéticas, nanotubos de carbono representam alguns nanomateriais empregados para tal finalidade (JIANRONG *et al.*, 2004; MERKOÇI, 2007; GUO e WANG, 2007; PINGARRÓN *et al.*, 2008; WANG e HU, 2009;

ZHANG *et al.*, 2009; ŠVANCARA *et al.*, 2009 A e B; CAMPBELL e COMPTON, 2010; FRANZOI *et al.*, 2011).

Nanopartículas metálicas, especialmente de metais nobres, exibem características fantásticas como, excelente habilidade catalítica, elevada área superficial e biocompatibilidade, que justificam o seu extensivo uso em biossensores. Devido a essas propriedades, tais nanomateriais podem fornecer um ambiente estável para imobilização de biomoléculas preservando sua atividade, e ainda facilitar a transferência de elétrons entre o material biológico e a superfície do eletrodo (JIANRONG *et al.*, 2004; GUO e WANG, 2007; PINGARRÓN *et al.*, 2008; WANG e HU, 2009; ZHANG *et al.*, 2009; CAMPBELL e COMPTON, 2010).

Diante das várias técnicas existentes, uma metodologia simples e muito usada consiste na deposição direta (eletrodeposição) de nanopartículas sobre a superfície do eletrodo. Por exemplo, tirosinase imobilizada por ligação cruzada em um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de ouro foi usada para preparar um biossensor que mostrou alta atividade frente a vários compostos fenólicos (CARRALERO SANZ *et al.*, 2005). Outro exemplo ilustra a construção de ECLI no qual nanopartículas de ouro foram eletrodepositadas. Hemoglobina foi imobilizada sobre o eletrodo com o auxílio de um filme de Nafion. O Nafion/Hemoglobina/Au/ECLI demonstrou excelente atividade electrocatalítica para a redução do ácido tricloroacético, além de boa reprodutibilidade e estabilidade (SUN *et al.*, 2010). Yuan e colaboradores (YUAN *et al.*, 2005) investigaram a redução do H_2O_2 usando eletrodo de platina, modificado com nanopartículas de prata e HRP imobilizada em um filme polimérico. O biossensor proposto apresentou linearidade na faixa de concentração de $1,0 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-2}$ mol L^{-1} para H_2O_2 com um limite de detecção de $2,0 \times 10^{-6}$ mol L^{-1} e demonstrou estabilidade e seletividade adequadas.

Nanopartículas metálicas também possuem larga aplicação como catalisadores em reações orgânicas (SHIJU e GULIANTS, 2009), uma vez que se tornou possível a obtenção de nanopartículas metálicas com dimensão ≤ 10 nm (em diâmetro). Entretanto, estes materiais são apenas cineticamente estáveis e existe uma tendência termodinâmica para aglomeração, o que acarretaria na diminuição da atividade catalítica.

Os principais métodos para a estabilização de nanopartículas metálicas em solução envolvem proteção estérea e/ou eletrostática, através do emprego de agentes estabilizantes, tais como polímeros, sais de amônio quaternário, surfactantes ou polioxoânions. Nesse contexto, LI, em particular os derivados do cátion BMI⁺ com ânions BF₄⁻, PF₆⁻ e

$N(Tf)_2^-$, vêm sendo empregados como estabilizantes de nanopartículas metálicas, bem como meio reacional para síntese das mesmas. Além das propriedades únicas citadas anteriormente, esses LI possuem uma estrutura pré-organizada, governada principalmente por ligações de hidrogênio. A estabilização e formação das nanopartículas em LI ocorrem através de uma reorganização dessa rede de ligações de hidrogênio e a geração de regiões nanoestruturadas incluindo as nanopartículas (DUPONT *et al.*, 2002 B; ZHOU *et al.*, 2005; MIGOWSKI *et al.*, 2007; REDEL *et al.*, 2008; SCHEEREN *et al.*, 2008; DASH e SCOTT, 2009; DUPONT e SCHOLTEN, 2010).

Nosso grupo de pesquisa vem utilizando esses novos materiais (nanopartículas dispersas em LI) desenvolvidos por Dupont e colaboradores para o desenvolvimento de biossensores de pasta de carbono (BRONDANI *et al.*, 2009 B; FERNANDES *et al.*, 2009).

Um biossensor contendo nanopartículas de platina dispersas em LI BMI.PF₆ (Pt-BMI.PF₆) e a enzima Lac foi proposto por Brondani e colaboradores (BRONDANI *et al.*, 2009 B). Técnicas voltamétricas (cíclica e de onda quadrada) foram usadas para avaliar o processo eletroquímico e quantificar adrenalina em formulações farmacêuticas. O biossensor contendo como aglutinante Pt-BMI.PF₆ apresentou uma maior resposta para a redução da *o*-quinona à adrenalina em comparação com o biossensor sem nanopartículas e o EPC. Alta condutividade do LI combinada com a transferência de elétrons facilitada pelas nanopartículas metálicas forneceu a este biossensor uma maior sensibilidade, ampla faixa de linearidade ($9,99 \times 10^{-7}$ a $2,13 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹), baixo limite de detecção ($2,93 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹), boa reprodutibilidade e estabilidade adequada.

Fernandes e coautores (FERNANDES *et al.*, 2009) elaboraram um biossensor contendo LI BMI.PF₆ com nanopartículas de irídio (Ir-BMI.PF₆). Nesse biossensor, a fruta de conde foi usada como fonte da enzima polifenol oxidase (PFO), que posteriormente foi imobilizada em QTS ionicamente reticulada com oxalato de sódio. A superioridade exibida pelo biossensor com Ir-BMI.PF₆ confirmou a contribuição catalítica do Ir-BMI.PF₆ e a eficiência na imobilização da enzima PFO. A Figura 11 mostra o esquema proposto para a imobilização da enzima no suporte biocompatível, juntamente com a “esfera protetora” formada pelo Ir-BMI.PF₆.

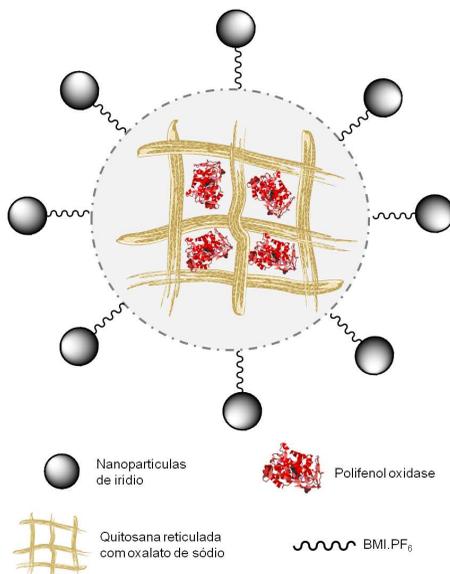


Figura 11. Representação da imobilização da enzima PFO em QTS reticulada com oxalato e a “esfera protetora” formada pelo LI contendo nanopartículas metálicas (Ir-BML.PF₆) (adaptada de FERNANDES *et al.*, 2009 e extraída de FRANZOI *et al.*, 2011).

Em adição, um sensor de pasta de carbono modificado com o complexo binuclear de níquel(II) ($[\text{Ni}_2(\text{HBPPAMFF})\text{m}(\text{OAc})_2(\text{H}_2\text{O})]\text{BPh}_4$) imobilizado sobre sílica funcionalizada foi proposto por Brondani (BRONDANI *et al.*, 2010). Juntamente ao complexo, foram incorporadas nanopartículas de Au dispersas em LI (Au-BML.PF₆). Este sensor biomimético foi então aplicado para determinação de fisetina em amostras de sucos de maçã e apresentou um limite de detecção de $5,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. O excelente desempenho analítico do sensor proposto foi atribuído às vantagens anteriormente citadas, tanto pela eficiente imobilização do material biológico (neste caso, um análogo sintético de enzima natural) como às propriedades únicas do LI e nanopartículas metálicas.

2.7. Compostos fenólicos

Compostos fenólicos apresentam como estrutura básica um ou mais anéis aromáticos hidroxilados, funções que lhes conferem o poder

antioxidante. Representam um grande grupo de compostos largamente distribuídos na natureza, sendo importantes constituintes de plantas e alimentos, principalmente frutas e vegetais. Três importantes grupos destes compostos são os fenóis simples, ácidos fenólicos e os flavonóides (ROBARDS e ANTOLOVICH, 1997; FILIPIAK, 2001), cujas fórmulas estruturais (para os dois primeiros) estão ilustradas na Figura 12.

Os fenóis simples apresentam somente um anel aromático com dois grupos hidroxilas e como exemplos, temos o catecol e a hidroquinona. Os ácidos fenólicos também contêm somente um anel aromático sendo divididos em dois subgrupos: os derivados do ácido benzóico, como os ácidos salicílico e *p*-hidroxibenzoico, e os derivados do ácido cinâmico, como os ácidos cafeico, clorogênico e sinápico (ROBARDS e ANTOLOVICH, 1997; FILIPIAK, 2001).

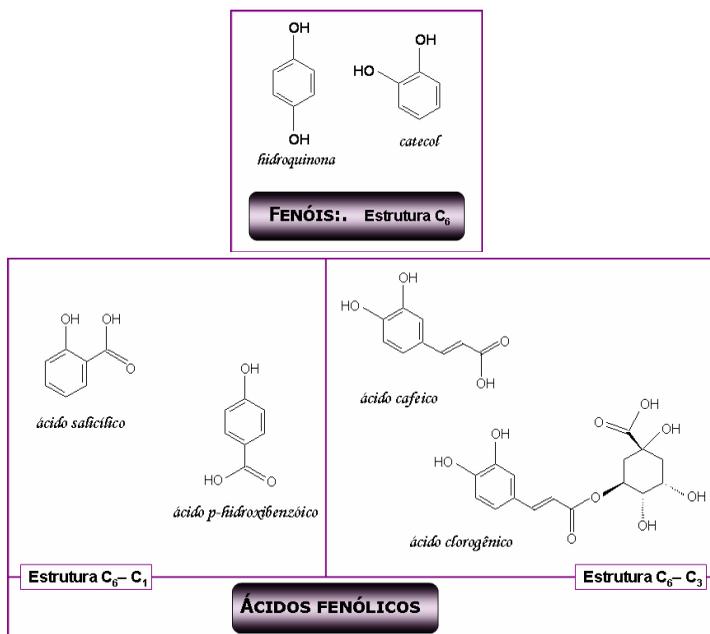


Figura 12. Estruturas de fenóis e ácidos fenólicos.

Os flavonóides compreendem compostos químicos caracterizados por um esqueleto de carbono C₆-C₃-C₆, onde C₆ são estruturas de anéis aromáticos que estão interligadas através de três átomos de carbono

ciclizados com oxigênio (ROBARDS e ANTOLOVICH, 1997; FILIPIAK, 2001; ROBARDS, 2003). Este grande grupo está dividido em subclasses e as mais importantes estão representadas na Figura 13. As subclasses com exemplos de seus representantes e suas respectivas fontes alimentares estão descritas na Tabela 3. Dentre essas, a diferenciação é possível através do número e natureza dos grupos substituintes nos anéis aromáticos (ROBARDS e ANTOLOVICH, 1997; ANTOLOVICH *et al.*, 2000; HARBORNE e WILLIAMS, 2000; ROBARDS, 2003).

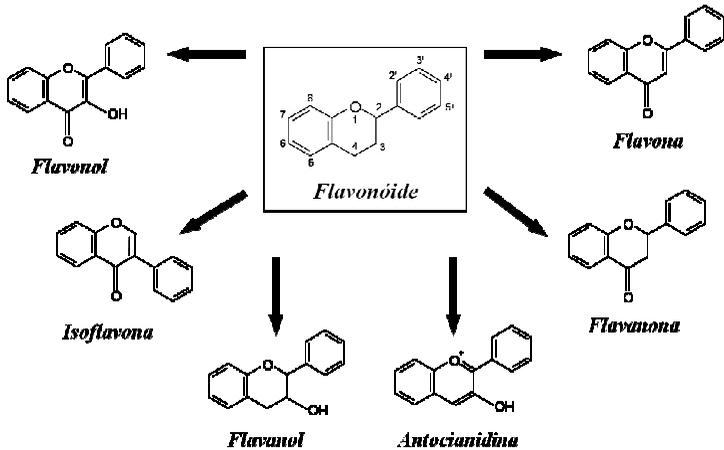


Figura 13. Estrutura básica de um flavonóide e suas subclasses.

Tabela 3. Principais subclasses dos flavonóides.

Subclasses	Exemplos	Fonte
Antocianidina	cianidina	frutas e flores
Flavanol	catequinas, epicatequinas	maçã, chá, cerveja
Flavanona	hesperidina	frutas cítricas
Flavona	apigenina, luteolina	chás, cereais, frutas, flores, vegetais
Flavanol	quercetina, rutina, kaempferol, miricetina, morina	cebola, maçã, chás, tomate, vinho tinto
Isoflavona	genisteína	legumes (soja)

Como proteção às plantas, os flavonóides podem agir contra danos causados pela radiação ultravioleta (UV) em folhas jovens, como antioxidantes e inibidores enzimáticos, promovendo a resistência das plantas a patógenos (fungos, insetos e bactérias). Pesquisas realizadas com relação aos flavonóides demonstram seu envolvimento com propriedades farmacológicas importantes, tais como: antioxidantes, vasodilatadoras, antiinflamatórias, antialérgicas, antivirais, cardioprotetoras, além de funcionarem como estimulantes do sistema imunológico. A ação antioxidante destes compostos no sistema biológico ocorre através da neutralização dos radicais livres gerados no organismo (HARBORNE e WILLIAMS, 2000).

Deste modo, uma dieta rica em frutas, vegetais e bebidas como chás e vinhos traz efeitos benéficos, contribuindo na prevenção de doenças degenerativas como o câncer e doenças cardiovasculares. Das seis principais classes de flavonóides, os flavonóis (miricetina, quercetina e kaempferol) e as flavonas (apigenina e luteolina) são os mais comumente encontrados em alimentos de origem vegetal e bebidas (MIEAN e MOHAMED, 2001; AHERNE e O'BRIEN, 2002; HOFFMANN-RIBANI, *et al.*, 2009; HUBER *et al.*, 2009).

2.7.1. Luteolina

Luteolina, (3',4',5,7-tetrahidroxiflavona), é um flavonóide amplamente encontrado em alimentos de origem vegetal, tais como aipo, pimenta verde, salsa e alcachofra e também em chá de camomila. Estudos têm mostrado que esta flavona (Figura 14) apresenta inúmeras propriedades biológicas, as quais são atribuídas, principalmente, as suas propriedades antiinflamatórias e antioxidantes (LEE *et al.*, 2009; LV *et al.*, 2009).

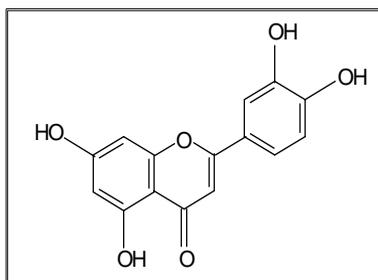


Figura 14. Estrutura química da luteolina.

O chá dos capítulos florais da camomila (*Matricaria recutita* L.) é uma bebida muito utilizada para fins medicinais, principalmente por sua ação antiinflamatória que está associada aos seus componentes, dentre os quais podemos destacar os flavonóides apigenina, luteolina e quercetina (QUEIROZ, 2008).

Luteolina tem sido determinada através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, *High-Performance Liquid Chromatography*) (MIEAN e MOHAMED, 2001; AHERNE e O'BRIEN, 2002; LI *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2006; BENETIS *et al.*, 2008; HOFFMANN-RIBANI *et al.*, 2009; HUBER *et al.*, 2009), cromatografia líquida (LC, *Liquid Chromatography*) (LUAN *et al.*, 2008), cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS, *Liquid chromatography coupled with Mass Spectrometry*) (YIN *et al.*, 2008), eletroforese capilar (CE, *Capillary Electrophoresis*) (CAO e YUAN, 2004) e CE com detecção eletroquímica (CE-ED, *Capillary Electrophoresis with Electrochemical Detection*) (CAO *et al.*, 2002).

A rapidez, o baixo custo das análises, a facilidade no manuseio da instrumentação e os baixos limites de detecção de técnicas eletroanalíticas aliados à seletividade de sensores quimicamente modificados com material biológico, como por exemplo as enzimas, podem representar uma alternativa extremamente viável aos tradicionais métodos, para detecção de luteolina em diferentes amostras.

2.7.2. Quercetina

A quercetina, 3,3',4',5,7-pentahidroxiflavona, (Figura 15) é um flavonóide amplamente distribuído em frutas, vegetais e bebidas. Cebola, alface, tomate, maçã, chás e vinho tinto são algumas fontes deste flavonol na dieta humana.

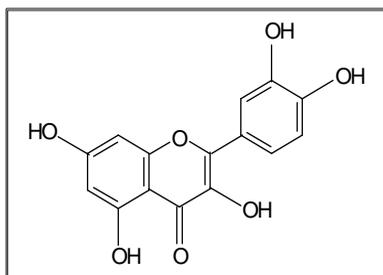


Figura 15. Estrutura química da quercetina.

Também encontra-se disponível no mercado, o que permite seu uso na forma isolada, entretanto restrições de emprego em produtos farmacêuticos e cosméticos têm sido frequentemente relacionados à sua reduzida hidrossolubilidade. A quercetina apresenta efeitos benéficos à saúde, incluindo proteção cardiovascular e atividades biológicas importantes, como: antioxidante, antialérgica, antiinflamatória e antiviral (AHERNE e O'BRIEN, 2002; BRETT e GHICA, 2003; HOFFMANN-RIBANI *et al.*, 2009).

Vários métodos têm sido desenvolvidos para a determinação de quercetina: HPLC (MIEAN e MOHAMED, 2001; WACH *et al.*, 2007; OLSZEWSKA, 2008; HOFFMANN-RIBANI *et al.*, 2009; HUBER *et al.*, 2009; KUMAR *et al.*, 2009), CE-ED (CHEN, *et al.*, 2000; CAO, *et al.*, 2001; CAO *et al.*, 2002; XU, *et al.*, 2007; CHEN, *et al.*, 2008 A e B), espectrofotometria (HASSAN, *et al.*, 1999; PEJIC, *et al.*, 2004) e também, técnicas eletroanalíticas utilizando eletrodos modificados (HE *et al.*, 2005; LIN *et al.*, 2006; XU e KIM, 2006; JIN *et al.*, 2009; CAO *et al.*, 2011).

2.8. Técnicas eletroanalíticas

Estudos sobre processos de oxidação e redução em vários meios, adsorção em superfícies e mecanismos de transferência de elétrons, inclusive com a utilização de eletrodos modificados, exemplificam algumas das numerosas aplicações das técnicas eletroanalíticas. A química eletroanalítica compreende um conjunto de métodos analíticos baseados nas propriedades elétricas como corrente, potencial, condutividade, resistência ou carga de um analito, o qual está imerso em solução numa cela eletroquímica (SKOOG *et al.*, 2002; SOUZA *et al.*, 2003; SKOOG *et al.*, 2008).

Essas técnicas apresentam a possibilidade de a medida ser realizada diretamente na amostra (sem etapas de pré-purificação ou de separações prévias), além de fornecerem limites de detecção relativamente baixos. Em adição, rapidez, baixo custo da instrumentação e dos reagentes utilizados e facilidade de operação, se comparados às técnicas espectroscópicas e cromatográficas, são vantagens que levaram ao desenvolvimento de técnicas eletroanalíticas cada vez mais sensíveis e adequadas para a quantificação de espécies de interesse em diferentes áreas de estudo, tais como medicina, bioquímica, química ambiental e de alimentos (SKOOG *et al.*, 2002; SOUZA *et al.*, 2003; SKOOG *et al.*, 2008).

2.8.1. Voltametria

A voltametria compreende um conjunto de técnicas eletroanalíticas que se baseiam nos fenômenos que ocorrem na interface entre a superfície do eletrodo de trabalho e a camada fina de solução adjacente a essa superfície. As informações sobre o analito são obtidas por meio da medição da magnitude da corrente elétrica que surge no eletrodo de trabalho em função da aplicação controlada de um potencial. O gráfico corrente *versus* potencial é denominado voltamograma (SKOOG *et al.*, 2002; SKOOG *et al.*, 2008).

A cela eletroquímica é constituída de três eletrodos (eletrodo de trabalho, eletrodo de referência e eletrodo auxiliar) imersos em uma solução contendo o analito e um eletrólito suporte (eletrólito não-reativo). O eletrodo de trabalho, cujo potencial varia linearmente com o tempo, tem suas dimensões pequenas para aumentar sua tendência a se tornar polarizado. O eletrodo de referência, cujo potencial permanece constante durante o experimento, é usado para medir o potencial do eletrodo de trabalho. Eletrodo de calomelano saturado (SCE, *Saturated Calomel Electrode*) ou de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl) são os de referência mais empregados. O eletrodo auxiliar, ou contra-eletrodo, que geralmente é um fio de platina, tem a função de conduzir eletricidade da fonte de sinal através da solução para o eletrodo de trabalho (SKOOG *et al.*, 2002; SKOOG *et al.*, 2008).

2.8.1.1. Voltametria de Onda Quadrada

A voltametria de onda quadrada (SWV, *Square Wave Voltammetry*) é uma técnica de pulso que oferece vantagens como elevada velocidade de execução, melhor resolução do pico e excelente sensibilidade. Neste tipo de voltametria, as medidas de corrente são realizadas com velocidades de varredura maiores que 100 mV s^{-1} e são feitas apenas ao final dos pulsos, onde a magnitude da corrente capacitiva já está minimizada. Esta metodologia possibilitou um aumento na sensibilidade da técnica, viabilizando a sua aplicação na análise de compostos orgânicos e inorgânicos (SKOOG *et al.*, 2002; SOUZA *et al.*, 2003; SKOOG *et al.*, 2008).

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 16 e é obtido pela sobreposição de uma sequência de pulsos de onda quadrada sobre um sinal na forma de escada.

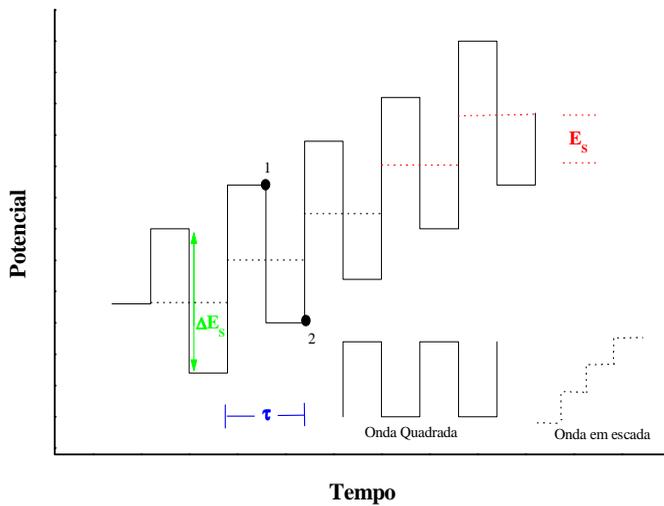


Figura 16. Forma de aplicação do potencial na SWV. A corrente é medida nas regiões 1 e 2, pulso direto e reverso, respectivamente (SKOOG *et al.*, 2008).

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 (SKOOG *et al.*, 2002; SOUZA *et al.*, 2003; SKOOG *et al.*, 2008).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho de tese tem como objetivo principal o desenvolvimento de sensores de pasta de carbono modificados com a enzima Lac imobilizada em QTS ou β -CD e com LI contendo nanopartículas metálicas dispersas. Após otimização, os biossensores serão aplicados na determinação de luteolina em chá de camomila e quercetina em formulação farmacêutica manipulada e em suco de maçã, utilizando a técnica de SWV.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1. Biossensores contendo nanopartículas de prata ou ouro em líquido iônico e lacase imobilizada em quitosana modificada

- Extrair a enzima Lac (*Aspergillus oryzae*) da microcápsula;
- Determinar a atividade enzimática e estabilidade da Lac por método espectrofotométrico;
- Modificar quimicamente a QTS com cloreto cianúrico;
- Imobilizar a enzima neste suporte modificado;
- Construir biossensores contendo a Lac imobilizada em QTS reticulada com cloreto cianúrico e diferentes aglutinantes (Nujol, LI e nanopartículas de prata ou ouro dispersas em LI);
- Caracterizar as pastas de carbono dos biossensores através da técnica de SEM;
- Otimizar o método através da avaliação de vários parâmetros experimentais, tais como, porcentagem de nanopartículas-LI, eletrólito suporte e pH, quantidade da enzima Lac e parâmetros de SWV;
- Investigar a repetibilidade, reprodutibilidade, estabilidade e seletividade dos biossensores;
- Comparar o desempenho dos diferentes biossensores desenvolvidos e aplicá-los na determinação de luteolina em amostras de chá de camomila.

3.2.2. Biossensores contendo nanopartículas de prata em líquido iônico e lacase imobilizada em β -ciclodextrina modificada

- Extrair a Lac e determinar sua atividade e estabilidade por método espectrofotométrico;
- Modificar quimicamente a β -CD com epícloridrina e caracterizar através de SEM;
- Imobilizar a enzima neste suporte modificado;
- Construir biossensores contendo a Lac imobilizada em β -CD reticulada com epícloridrina e diferentes aglutinantes (Nujol, LI e nanopartículas de prata dispersas em LI);
- Otimizar o método através de SWV e investigar a melhor porcentagem de nanopartículas-LI, eletrólito suporte e pH, quantidade da enzima Lac e parâmetros de SWV;
- Investigar a repetibilidade, reprodutibilidade, estabilidade e seletividade dos biossensores;
- Comparar o desempenho dos diferentes biossensores desenvolvidos e aplicá-los na determinação de quercetina em formulação farmacêutica manipulada e em suco de maçã;
- Comparar o teor de quercetina em formulação farmacêutica obtido com o biossensor proposto e o método espectrofotométrico.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Reagentes e Soluções

Reagentes de grau analítico foram adquiridos comercialmente e utilizados sem prévia purificação. Todas as soluções foram preparadas com água destilada e deionizada.

Enzima Lac (Denilite® II Base; 800 unidades g^{-1}) em microcápsulas, produzida por microorganismos geneticamente modificados *Aspergillus oryzae*, foi fornecida pela Novozymes.

Solução de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato, sal de diamônio) (Sigma) $5,0 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} , usada para determinação da atividade da Lac, foi preparada através da dissolução de 0,0068 g desse reagente em tampão acetato 0,1 mol L^{-1} (pH 5,0) em balão volumétrico de 25 mL.

QTS em pó com grau de desacetilação de 85% (Aldrich) e β -CD (Sigma, pureza $\geq 98\%$) foram usadas como suporte para imobilização da enzima. Cloreto cianúrico (ClCi) (Fluka) e epicloridrina (Epi) (Vetec) foram utilizados na modificação química da QTS e β -CD, respectivamente. Reagentes como, tolueno (Nuclear), etanol (Synth), boroidreto de sódio ($NaBH_4$, Aldrich) e acetona (Nuclear) também foram empregados no processo de modificação dos suportes.

Pó de grafite (Acheson 38, Fisher Scientific) e Nujol (Aldrich) foram utilizados na construção dos sensores. Os LI $BMI.PF_6$ e $BMI.N(Tf)_2$ (CASSOL *et al.*, 2006), bem como as nanopartículas de ouro e prata dispersas em LI ($Au-BMI.PF_6$, $Ag-BMI.PF_6$ e $Ag-BMI.N(Tf)_2 - 10$ mg de metal/mL de LI) (FRANZOI *et al.*, 2009 D; FRANZOI *et al.*, 2010 B), também foram aplicados no desenvolvimento dos biossensores. A síntese e caracterização de tais materiais foram realizadas pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Jairton Dupont, no Laboratório de Catálise Molecular (LAMOCA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

A solução tampão acetato 0,1 mol L^{-1} foi preparada pela dissolução de 8,204 g de acetato de sódio anidro (Nuclear) em água destilada e, em seguida, adicionado 5,7 mL de ácido acético concentrado (Vetec). A solução foi transferida para um balão de 1 L e seu volume completado com água destilada. O ajuste do pH da solução tampão (3,5, 4,0, 4,5, 5,0 e 5,5) foi realizado com ácido acético concentrado ou hidróxido de sódio ($NaOH$, F. Maia) 2,0 mol L^{-1} .

Para o preparo da solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} , 14,196 g de monohidrogenofosfato de sódio (Vetec) e 11,998 g de

dihidrogenofosfato de sódio (Vetec) foram dissolvidos em água destilada e, então, esta solução foi transferida para um balão de 1 L. O ajuste do pH da solução tampão fosfato (6,0, 6,5, 7,0 e 7,5) foi realizado com ácido fosfórico concentrado (Nuclear) ou NaOH 2,0 mol L⁻¹.

Os analitos avaliados foram adquiridos da Sigma-Aldrich e Fluka e as soluções foram preparadas diariamente pela dissolução de suas respectivas massas em solvente adequado. A Tabela 4 mostra o solvente e a concentração das soluções estoque.

Tabela 4. Analitos avaliados, solventes utilizados para preparação das soluções e respectivas concentrações.

Analitos	Solventes	Concentração (mol L ⁻¹)
Ácido ascórbico	tampão acetato pH 5,5	1,0x10 ⁻³
Ácido cafeico	tampão acetato pH 5,5	2,0x10 ⁻⁴
Ácido clorogênico	tampão acetato pH 5,5	1,0x10 ⁻³
Ácido sinápico	etanol/água (40/60%, v/v)	2,0x10 ⁻⁴
Apigenina	etanol/água (40/60%, v/v)	2,0x10 ⁻⁴
Catequina	etanol/água (40/60%, v/v)	2,0x10 ⁻⁴
Esculetina	etanol/água (40/60%, v/v)	1,0x10 ⁻³
Kaempferol	etanol	1,0x10 ⁻³
Luteolina	etanol/água (40/60%, v/v)	2,0x10 ⁻⁴
Miricetina	etanol	1,0x10 ⁻³
Morina	etanol/água (40/60%, v/v)	1,0x10 ⁻³
Quercetina	etanol	1,0x10 ⁻⁴
Rutina	etanol/tampão acetato pH 5,5 (40/60%, v/v)	1,0x10 ⁻³

As amostras de chá de camomila (*Matricaria recutita* L.) utilizadas para determinação do teor de luteolina foram adquiridas em farmácia local. Para a quantificação de quercetina foram testadas duas amostras diferentes: quercetina manipulada (obtida em farmácia de manipulação) e maçã vermelha Fuji (obtida em mercado). As amostras foram analisadas empregando-se os biossensores propostos. Um método comparativo (espectrofotométrico) foi desenvolvido para a amostra de quercetina manipulada.

4.2. Instrumentação

As medidas de pH foram obtidas empregando um pHmetro da Micronal modelo B-474, com um eletrodo de vidro combinado Micronal.

Para auxiliar na homogeneização das soluções dos substratos fenólicos foi utilizado um banho ultra-sônico Unique 1400A. As medidas espectrofotométricas, para a determinação da atividade da Lac, foram obtidas com um espectrofotômetro Micronal, modelo B572 e cubeta de quartzo (1 cm de caminho óptico).

A quantificação de quercetina em formulação farmacêutica manipulada foi realizada em um espectrofotômetro UV-vis Hewlett-Packard (Boise, ID, USA), modelo 8452A, com cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico.

As medidas voltamétricas de onda quadrada foram obtidas usando um Potenciostato/Galvanostato PGSTAT12 (Eco Chemie, Utrecht, The Netherlands) conectado a um *software* (GPES, versão 4.9.006, Eco Chemie) para aquisição e tratamento de dados. Para realização das análises, empregou-se uma cela de vidro (capacidade aproximada de 15 mL) sem compartimento divisório e com tampa de Teflon provida de orifícios circulares para encaixe dos eletrodos e adição das soluções. Um sistema de três eletrodos foi utilizado: biossensores construídos a partir da imobilização da Lac em diferentes suportes modificados, como eletrodos de trabalho, um eletrodo de Ag/AgCl ($3,0 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$), como eletrodo de referência e uma placa de platina ($0,5 \text{ cm}^2$), como eletrodo auxiliar. A representação esquemática da cela eletroquímica utilizada nos experimentos está ilustrada na Figura 17.

Análises elementares de carbono, hidrogênio e nitrogênio dos suportes QTS e QTS modificada com ClCi (QTSClCi) foram realizadas em um analisador CE Instruments (modelo EA 1110 CHNS-O).

As morfologias das pastas de carbono dos biossensores, da β -CD e da β -CD modificada com Epi (β -CDEpi) foram analisadas no Laboratório de Caracterização Microestrutural (LCM) do departamento de Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os materiais foram dispostos sobre a superfície de um porta-amostras contendo uma fita dupla face de carbono e em seguida foram recobertas com ouro para formar um filme condutor utilizando um metalizador (Blazers SCD 005, Liechtenstein). Um microscópio eletrônico de varredura (SEM-PHILIPS, modelo XL30) foi utilizado para análise dos materiais.

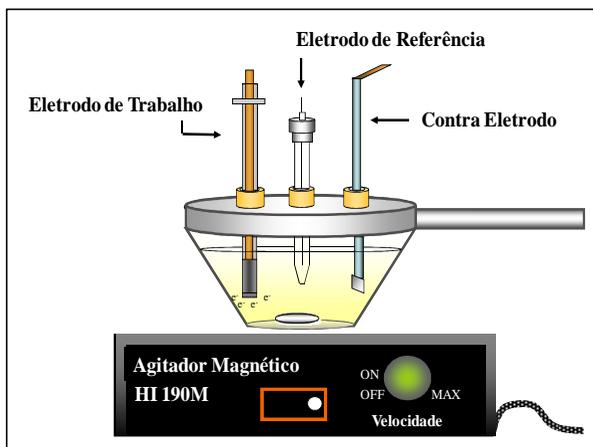


Figura 17. Representação esquemática da cela eletroquímica com os três eletrodos.

4.3. Metodologia

4.3.1. Extração da lacase da microcápsula

Para extração da Lac, uma massa de 5,0 g de microcápsulas contendo a enzima foi macerada em almofariz por 30 min. O material foi transferido para um béquer onde foi adicionado 50 mL de solução tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0). A solução permaneceu sob agitação por 20 min, sendo posteriormente filtrada. A enzima obtida foi armazenada em frasco âmbar, sob refrigeração, e usada na construção dos biossensores (FERNANDES *et al.*, 2008 B).

4.3.2. Determinação da atividade da lacase

A atividade da Lac foi determinada utilizando-se o ABTS como substrato, sendo o produto da reação enzimática medido em 420 nm. Inicialmente, 1,0 mL da solução enzimática foi transferida para um balão de 50 mL contendo tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0). Em uma cubeta de quartzo foram adicionados 2,8 mL de ABTS $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e 0,2 mL de Lac previamente diluída (FERNANDES *et al.*, 2008 B). A variação da absorbância devido à oxidação do ABTS foi acompanhada espectrofotometricamente, em triplicata, durante 4 min à temperatura ambiente.

A atividade enzimática (unidades mL⁻¹) definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μmol de ABTS por minuto (BOURBONNAIS *et al.*, 1998) foi determinada através da Equação 1:

$$\text{Atividade enzimática} = \frac{\Delta \text{Abs } t^{-1}}{\varepsilon \cdot b} \times V_T \times \frac{1}{V_E} \times 1000 \times FD \quad (\text{Equação 1})$$

$\Delta \text{Abs } t^{-1}$ = Variação da absorbância com o tempo (min⁻¹)

$\varepsilon_{420\text{nm}}$ = Absortividade molar (36.000 L mol⁻¹ cm⁻¹) (BOURBONNAIS *et al.*, 1998)

b = Caminho óptico (1 cm)

V_T = Volume utilizado no ensaio (mL)

V_E = Volume da solução de Lac (mL)

FD = Fator diluição (diluição da solução de Lac)

4.3.3. Reticulação da quitosana

A QTS usada como suporte para imobilização da enzima Lac foi quimicamente modificada com cloreto cianúrico (CICi) seguindo um procedimento previamente descrito na literatura (LOPES *et al.*, 2009). Para esta síntese, utilizou-se um condensador conectado a um balão de três bocas. No balão foram misturados 5,07 g de QTS e 50 mL de tolueno e, em seguida, adicionou-se vagorosamente 8,35 g de CICi, a 100 °C sob agitação mecânica. Após 24 h de reação sob aquecimento, o material obtido foi lavado com etanol, filtrado e seco em dessecador contendo sílica, por 12 h.

4.3.4. Reticulação da β-ciclodextrina

A modificação química da β-CD com epicloridrina (Epi) (β-CDEpi) foi realizada de maneira semelhante ao método descrito por Crini, porém com algumas modificações (CRINI *et al.*, 1998). Um balão contendo NaOH (20 mL, 50% m/m) e 2,5 mg de NaBH₄ foi submetido a 50 °C de aquecimento e, em seguida, 12,2 g de β-CD foram adicionadas. A esta mistura, acrescentou-se, gota a gota, uma alíquota de 8,5 mL de Epi sob contínua agitação. Após 2 h, acetona foi adicionada, mantendo-se a reação sob agitação a 50 °C por mais 10 min. Após resfriamento, o sólido obtido foi filtrado, lavado com acetona e água e, na sequência, seco em um dessecador, por 24 h.

4.3.5. Imobilização da enzima lacase

Com auxílio de uma micropipeta, alíquotas de 15 a 65 μL do extrato contendo de 0,22 a 0,95 unidades de Lac foram adicionadas sobre 40,0 mg de QTSCiCi, individualmente. Alíquotas de 10 a 50 μL do extrato contendo de 0,13 a 0,65 unidades da enzima Lac foram adicionadas sobre 40,0 mg de $\beta\text{-CDEpi}$. Após 2 min de homogeneização, os suportes foram secos à temperatura ambiente e, na sequência, utilizados para construção dos biossensores.

4.3.6. Construção dos biossensores

4.3.6.1. Biossensores contendo nanopartículas de prata ou ouro em líquido iônico e lacase imobilizada em quitosana modificada

Inicialmente, 40,0 mg de QTS/CiCi com 0,29 unidades de Lac (20%, m/m) foram homogeneizadas com 100,0 mg de grafite em pó (50%, m/m) em almofariz por 20 min. Em seguida, 30,0 mg de Nujol (15%, m/m) e 30,0 mg de Ag-BMI.PF₆ ou Au-BMI.PF₆ (15%, m/m) foram adicionados ao pó de grafite contendo a enzima e misturados por cerca de 20 min para produzir a pasta final. A pasta foi inserida em uma seringa plástica de 1 mL (1,0 mm de diâmetro interno) e um fio de cobre foi introduzido para obtenção do contato elétrico. Esses biossensores foram denominados como Lac-QTSCiCi/Nujol/Ag-BMI.PF₆-biossensor e Lac-QTSCiCi/Nujol/Au-BMI.PF₆-biossensor

Para efeitos de comparação, outros sensores foram preparados seguindo procedimento similar ao descrito anteriormente. Biossensores com a Lac imobilizada em QTSCiCi e sem nanopartículas metálicas foram construídos incorporando-se como aglutinantes Nujol/BMI.PF₆ (50:50%, m/m) ou somente Nujol, denominados respectivamente como Lac-QTSCiCi/Nujol/BMI.PF₆-biossensor e Lac-QTSCiCi/Nujol-biossensor. Também foi construído um biossensor com o aglutinante Nujol e Lac adicionada diretamente ao pó de grafite sem o suporte QTSCiCi, que foi denominado Lac/Nujol-biossensor. O EPC não modificado foi preparado através da homogeneização de grafite e Nujol.

Antes de cada medida, a superfície dos sensores foi polida manualmente, e quando necessário, foi realizada uma limpeza eletroquímica aplicando-se varreduras cíclicas sucessivas (entre os potenciais de 1,0 e -1,0 V) em solução tampão acetato. Os biossensores desenvolvidos eram estocados em local seco, a temperatura ambiente, quando não estavam sendo utilizados.

4.3.6.2. Biossensor contendo nanopartículas de prata em líquido iônico e lacase imobilizada em β -ciclodextrina modificada

Estes sensores/biossensores foram desenvolvidos conforme o método descrito no item 3.3.6.1, porém com alguns componentes diferentes. 40,0 mg de β -CD/Epi contendo 0,45 unidades de Lac (20%, m/m) foram misturados com 100,0 mg de grafite em pó (50%, m/m) por 20 min. Em seguida, adicionou-se 30,0 mg de Nujol (15%, m/m) e 30,0 mg de Ag-BMI.N(Tf)₂ (15%, m/m) (maceração por cerca de 20 min). Este eletrodo foi denominado como Lac- β -CDEpi/Nujol/Ag-BMI.N(Tf)₂-biossensor. Biossensores com a enzima imobilizada e sem Ag-BMI.N(Tf)₂ foram denominados como: Lac- β -CDEpi/Nujol/BMI.N(Tf)₂-biossensor e Lac- β -CDEpi/Nujol-biossensor.

Dois outros biossensores, ambos sem o suporte β -CDEpi para imobilizar a enzima foram construídos: Lac/Nujol/Ag-BMI.N(Tf)₂-biossensor e Lac/Nujol-biossensor e também o EPC tradicional.

A Figura 18 ilustra a construção dos biossensores contendo Lac imobilizada nos suportes modificados e nanopartículas dispersas em LI.

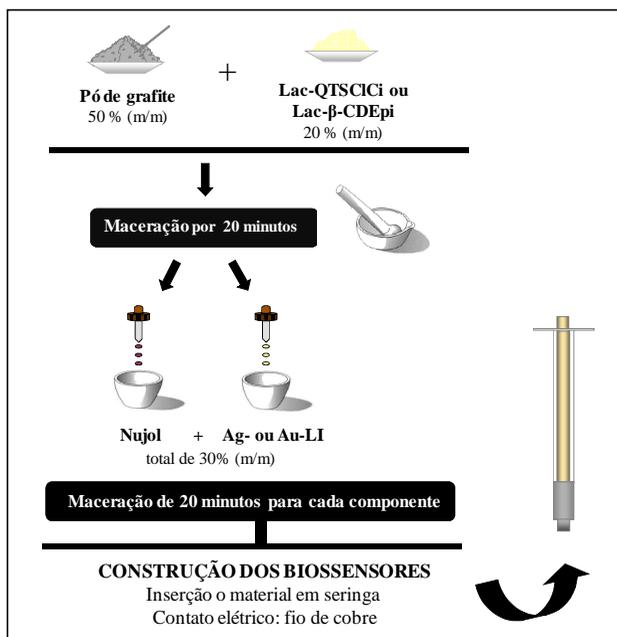


Figura 18. Esquema de construção dos biossensores.

4.3.7. Medidas eletroquímicas

Para a realização das medidas voltamétricas, 10 mL de solução tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,0) foram transferidos para a cela eletroquímica e, em seguida, com auxílio de uma micropipeta, alíquotas da solução padrão do substrato fenólico (luteolina ou quercetina) e de amostras comerciais (chá de camomila ou quercetina manipulada e suco de maçã) foram adicionadas. As medidas de SWV foram obtidas aplicando-se uma faixa de potencial entre 0,8 e 0,0 V *versus* Ag/AgCl (3,0 mol L⁻¹ KCl), frequência de 10–100 Hz, amplitude de pulso de 10–100 mV e incremento de 0,5–10,0 mV, após sucessivas adições do analito. Após um período de agitação de 60 s (para homogeneizar a solução), e sob temperatura ambiente, voltamogramas de onda quadrada foram registrados.

4.3.8. Preparação das amostras e determinação de luteolina

2,0 g de camomila de diferentes marcas (Matte Leão e Naturelife) foram adicionados em 40 mL de água quente (em torno de 60 °C). A camomila foi deixada em infusão por 20 min e, posteriormente, filtrada para obtenção do chá. O método da adição de padrão foi usado para determinação de luteolina em chá de camomila. Alíquotas de 100 µL das amostras previamente preparadas foram transferidas para a cela eletroquímica contendo 10 mL de tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,0) e quantificada por SWV com os sensores propostos, após sucessivas adições de solução padrão de luteolina. As medidas foram realizadas com o Lac-QTSCiCi/Nujol/Ag-BMI.PF₆-biossensor e Lac-QTSCiCi/Nujol/Au-BMI.PF₆-biossensor (n = 6).

4.3.9. Preparação das amostras e determinação de quercetina

A quercetina foi analisada em maçã vermelha Fuji e em formulação farmacêutica manipulada (quercetina em cápsula – 250 mg). Para a amostra manipulada, a preparação foi realizada mediante dissolução do conteúdo da cápsula em 100 mL de etanol. Para a amostra de maçã, 5,0 g da fruta fresca (polpa e casca) foram trituradas em liquidificador. Este extrato foi filtrado e o suco da fruta foi armazenado em geladeira para posterior análise.

Alíquotas de 100 µL das amostras foram transferidas para a cela eletroquímica contendo 10 mL de tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,0) e determinadas por SWV com os sensores propostos, após sucessivas

adições de solução padrão de quercetina. As medidas foram realizadas, em triplicata, com o Lac- β -CDEpi/Nujol/Ag-BMI.N(Tf)₂-biossensor.

Para comparação com os resultados obtidos usando o biossensor proposto, uma análise espectrofotométrica foi realizada para determinação de quercetina em formulação farmacêutica, mediante calibração com padrão externo. A absorbância de soluções de quercetina padrão com diferentes concentrações preparadas em etanol ($5,0 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) foi acompanhada em 370 nm.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Biossensores contendo nanopartículas de prata ou ouro em líquido iônico e lacase imobilizada em quitosana modificada

5.1.1. Estudo da atividade e estabilidade da lacase

Após extração da Lac (*Aspergillus oryzae*) da microcápsula, a sua atividade foi investigada por espectrofotometria acompanhando-se a oxidação do ABTS em comprimento de onda de 420 nm, conforme metodologia descrita na parte experimental. A análise foi realizada em triplicata.

Utilizando a parte linear do gráfico (Figura 19) pode-se calcular o coeficiente angular da reta que corresponde a $\Delta\text{Abs t}^{-1}$. A partir deste valor e da Equação 1 obteve-se um valor de atividade de Lac igual a 14,6 unidades por mL de solução enzimática.

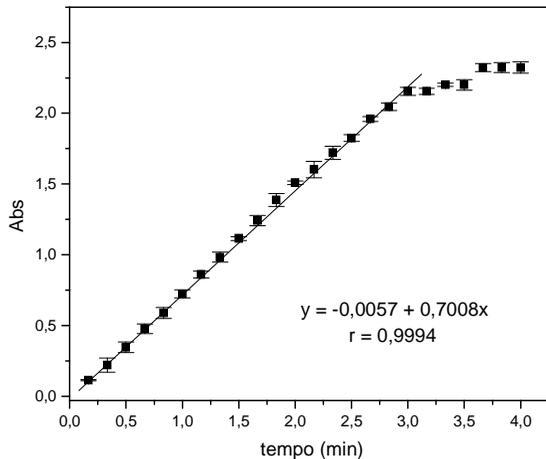


Figura 19. Gráfico Abs versus tempo para determinação da atividade enzimática da Lac.

Um estudo da atividade enzimática foi realizado com o objetivo de avaliar a estabilidade da Lac, quando estocada sob refrigeração (4 °C). Medidas espectrofotométricas foram realizadas em um período de 50 dias e os resultados estão apresentados na Figura 20. Durante 25 dias de estocagem, não foram observadas mudanças significativas na atividade da enzima. Após este período, houve uma diminuição gradual

dos valores de atividade. Deste modo, a cada 20-25 dias, a Lac foi novamente extraída para imobilização em suporte adequado e posterior construção dos biossensores.

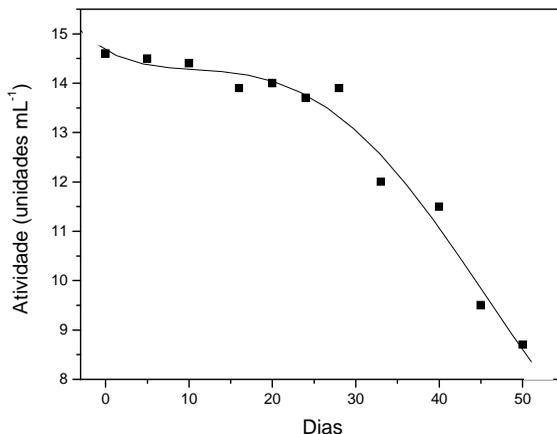


Figura 20. Estudo da estabilidade da Lac armazenada sob refrigeração (4 °C).

5.1.2. Reticulação da quitosana e imobilização da lacase

A imobilização da enzima consiste em uma etapa fundamental na construção de qualquer biossensor, com a finalidade de melhorar a estabilidade química desses componentes biológicos responsáveis pelo reconhecimento. Nesse contexto, a QTS surge como uma matriz promissora para imobilização, uma vez que possui características desejáveis, incluindo, biocompatibilidade e biodegradabilidade. Este biopolímero é formado por uma longa cadeia polimérica linear com grupamentos amino e hidroxila, fato este que possibilita sua modificação química. Essas modificações com agentes reticulantes proporcionam uma maior estabilidade e resistência à quitosana, e ainda diminuem consideravelmente a sua solubilidade (DURÁN *et al.*, 2002; KRAJEWSKA, 2004; OLIVEIRA e VIEIRA, 2006, FERNANDES *et al.*, 2008 B; MOCCELINI *et al.*, 2008, DIACONU *et al.*, 2010; de LIMA *et al.*, 2010).

Com os resultados obtidos por análise elementar, observou-se um aumento na porcentagem de nitrogênio para QTSCiC (8,20%) em comparação com a QTS (7,45%), sendo este um indicativo da modificação química do biopolímero precursor. Em adição, a QTSCiC demonstrou ser insolúvel em solução aquosa de ácido acético (5% v/v).

Um esquema proposto para a imobilização da Lac em QTSCiCi está ilustrado na Figura 21. Sugere-se que o CiCi possa estabelecer ligações covalentes com os grupos NH_2 disponíveis na QTS através da substituição de um (mais provável) ou mais átomos de cloro. Assim poderá ocorrer a ligação entre uma molécula de CiCi e uma unidade da QTS ou reticulação entre dois grupos da mesma molécula de CiCi e duas unidades monoméricas da QTS. Com esta modificação química, a enzima Lac pode ser aprisionada nessa matriz reticulada formada pelo CiCi e a QTS, que pode funcionar como um ambiente estável para imobilização da enzima, preservando suas características estruturais.

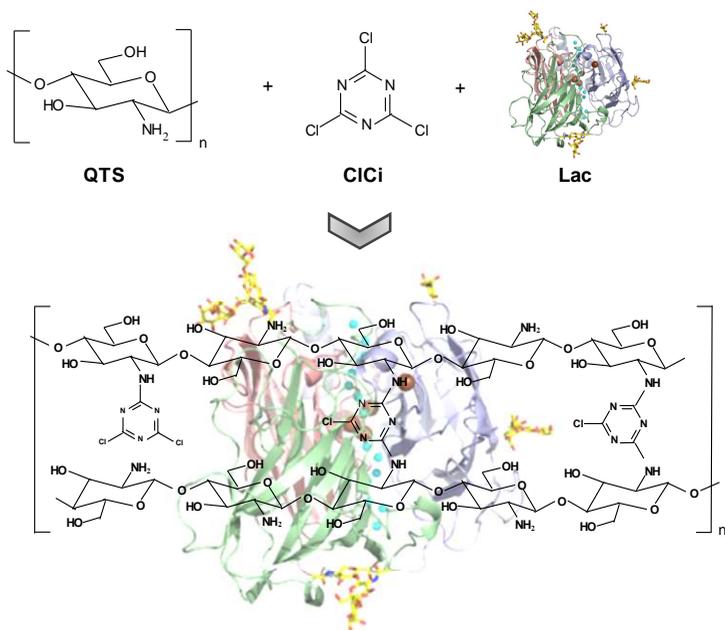


Figura 21. Esquema proposto para imobilização da Lac em QTSCiCi.

5.1.3. Morfologias das pastas

Diversos pesquisadores têm relatado que a morfologia das pastas de carbono difere em relação aos tipos de aglutinantes utilizados na construção dos eletrodos (LIU *et al.*, 2005; MALEKI *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2007; ZHANG e *t al.*, 2007; SUN *et al.*, 2007; FERNANDES *et al.*, 2009; FRANZOI *et al.*, 2009 C; FRANZOI *et al.*, 2011).

As imagens de SEM das pastas de carbono dos biossensores estão mostradas na Figura 22 e diferenças consideráveis podem ser observadas. O biossensor construído de forma tradicional, contendo Nujol como aglutinante (Figura 22A), apresenta uma superfície composta por flocos de carbono irregulares e isolados. A incorporação de Au-BMI.PF₆ (Figura 22B) no biossensor, proporcionou uma maior “uniformidade” e melhor compactação na formação da pasta de carbono. Além de funcionar como aglutinante, o LI possui viscosidade adequada e condutividade, facilitando a transferência de elétrons na superfície do eletrodo.

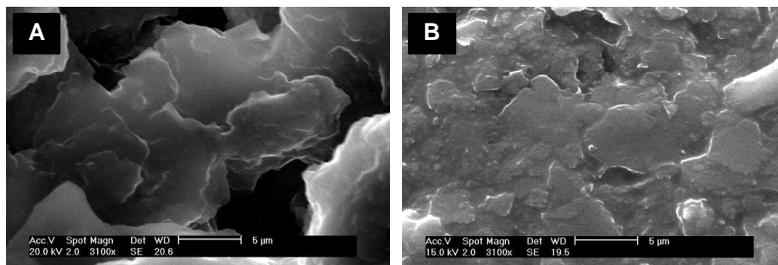


Figura 22. SEM das pastas de carbono dos biossensores contendo (A) Nujol e (B) Au-BMI.PF₆.

5.1.4. Reação enzimática na superfície do eletrodo

A enzima Lac tem sido objeto de intensa investigação devido às suas inúmeras aplicações, tais como, bioclareadores no setor de papel e celulose, em processos que visam modificar e melhorar a aparência de alimentos e bebidas, no tratamento de efluentes industriais, principalmente do setor têxtil (DURÁN *et al.*, 2002; MINUSSI *et al.*, 2002; MAYER e STAPLES, 2002; COUTO e HERRERA, 2006; WIDSTEN e KANDELBAUER, 2008; DWIVEDI *et al.*, 2011).

Reações catalisadas por estas enzimas são amplamente usadas para determinação e quantificação de diferentes compostos, particularmente de interesse farmacêutico. Com base nesta aplicação, nosso grupo de pesquisa vem empregando esta enzima para o desenvolvimento de biossensores (SANTHIAGO e VIEIRA, 2007; FERNANDES *et al.*, 2008 B; BRONDANI *et al.*, 2009 B; FRANZOI *et al.*, 2009 A e B, FRANZOI *et al.*, 2010).

A Figura 23 ilustra a representação esquemática da reação enzimática entre a luteolina e a Lac na superfície do biossensor

composto por: pó de grafite + Lac immobilizada em QTSCiCi + Nujol + Au-BMI.PF₆ (Lac-QTSCiCi/Nujol/Au-BMI.PF₆-biossensor). A Lac catalisa a oxidação de uma variedade de compostos fenólicos com a simultânea redução do oxigênio molecular à água. A luteolina na presença desta enzima é oxidada à sua respectiva *o*-quinona, que é então reduzida eletroquimicamente na superfície do biossensor, em potencial de 0,35 V *versus* Ag/AgCl. A corrente de pico resultante (redução eletroquímica de *o*-quinona a luteolina) é então relacionada com a concentração de luteolina na solução.

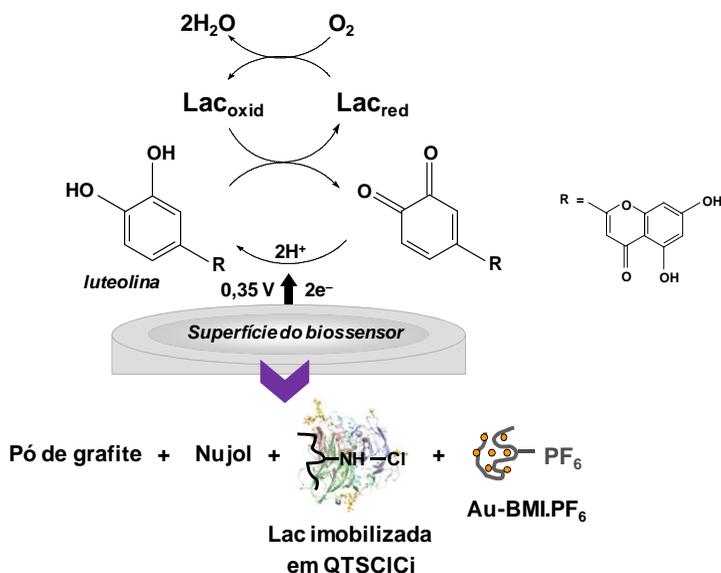


Figura 23. Representação esquemática da oxidação da luteolina catalisada pela Lac e a redução eletroquímica da *o*-quinona na superfície do Lac-QTSCiCi/Nujol/Au-BMI.PF₆-biossensor. Lac_{red}: lacase na forma reduzida e Lac_{oxi}: lacase na forma oxidada.

5.1.5. Comportamento eletroquímico da luteolina usando diferentes sensores

Nesse estudo foram avaliados dois aspectos importantes: a contribuição do LI e das nanopartículas, bem como o efeito da imobilização da enzima. O comportamento eletroquímico da luteolina utilizando diferentes sensores foi investigado por SWV em uma faixa de

potencial entre 0,8 e 0,0 V *versus* Ag/AgCl. Os voltamogramas obtidos usando: (a) EPC, (b) Lac/Nujol-biossensor, (c) Lac-QTSCiCi/Nujol-biossensor, (d) Lac-QTSCiCi/Nujol/BMI.PF₆-biossensor, (e) Lac-QTSCiCi/Nujol/Ag-BMI.PF₆-biossensor e (f) Lac-QTSCiCi/Nujol/Au-BMI.PF₆-biossensor em 4,8x10⁻⁶ mol L⁻¹ de luteolina em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,0) estão mostrados na Figura 24.

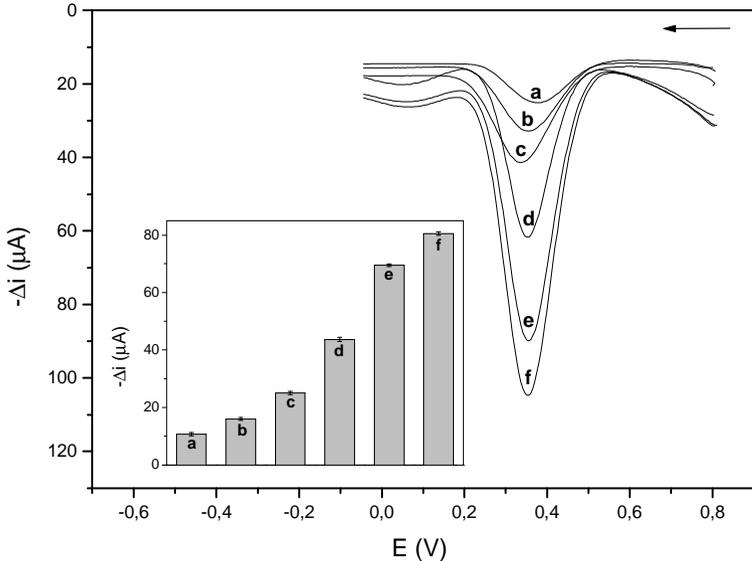


Figura 24. Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando (a) EPC, (b) Lac/Nujol-biossensor, (c) Lac-QTSCiCi/Nujol-biossensor, (d) Lac-QTSCiCi/Nujol/BMI.PF₆-biossensor, (e) Lac-QTSCiCi/Nujol/Ag-BMI.PF₆-biossensor e (f) Lac-QTSCiCi/Nujol/Au-BMI.PF₆-biossensor em solução contendo 4,8x10⁻⁶ mol L⁻¹ de luteolina em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,0); frequência de 50 Hz; amplitude de 100 mV e incremento de 5,0 mV. Inseto: valores das correntes de pico. O experimento foi realizado em triplicata.

A pequena resposta fornecida pelo EPC (a) é elevada com a adição da enzima Lac (b), sendo este comportamento relacionado às suas propriedades catalíticas. Entretanto, a maior resposta obtida com o Lac-QTSCiCi/Nujol-biossensor (c) confirma a eficiente imobilização da Lac no suporte modificado, que fornece um ambiente para sua estabilização, diferentemente do que ocorre em (b), onde a enzima está fracamente adsorvida. A incorporação do BMI.PF₆ como aglutinante parcial na construção do biossensor (d) proporcionou um aumento na

corrente de redução da *o*-quinona para luteolina, devido à sua propriedade condutora.

Respostas superiores foram conseguidas usando os biossensores contendo nanopartículas metálicas dispersas em BMI.PF₆ (e e f). As excelentes propriedades das nanopartículas metálicas associadas às dos LI favorecem a transferência de elétrons entre a enzima e a superfície do eletrodo. O mesmo comportamento foi observado por outros autores para biossensores contendo Au-BMI.PF₆, Pt-BMI.PF₆ e Ir-BMI.PF₆ (BRONDANI *et al.*, 2009 B; FERNANDES *et al.*, 2009; BRONDANI *et al.*, 2010). Em adição, o Lac-QTSCiCi/Nujol/Au-BMI.PF₆-biossensor (f) apresentou uma reposta de corrente 13,7% maior, a um potencial de 0,35 V, em comparação com o Lac-QTSCiCi/Nujol/Ag-BMI.PF₆-biossensor (e). Esse efeito pode ser atribuído à melhor estabilização e dispersão das nanopartículas de ouro no LI BMI.PF₆ (REDEL *et al.*, 2008; DASH e SCOTT, 2009).

5.1.6. Otimização do método

Porcentagem de LI ou nanopartículas-LI, eletrólito suporte e pH, concentração da enzima Lac, parâmetros de SWV como frequência, amplitude de pulso e incremento foram investigados a fim de otimizar o método. Para fins representativos, os resultados de otimização apresentados referem-se aos obtidos com Lac-QTSCiCi/Nujol/Au-BMI.PF₆-biossensor, sendo que os outros biossensores (contendo Lac-QTSCiCi/Nujol/BMI.PF₆ e Lac-QTSCiCi/Nujol/Ag-BMI.PF₆) forneceram os mesmos valores ótimos para os parâmetros estudados.

5.1.6.1. Porcentagem de líquido iônico contendo nanopartículas

Recentemente, a melhor proporção entre os componentes da pasta de carbono foi reportada e definida pela razão 50:20:15:15% (m/m/m/m) de pó de grafite:Lac em microcápsulas:Nujol:LI ou nanopartículas-LI (BRONDANI *et al.*, 2009 B; FRANZOI *et al.*, 2009 B e C; FRANZOI *et al.*, 2010). A composição 50:20% (m/m) de pó de grafite:Lac-suporte foi empregada, entretanto investigou-se a influência das diferentes proporções entre os aglutinantes, Nujol:LI e Nujol:LI contendo nanopartículas.

As seguintes proporções de Nujol:Au-BMI.PF₆ foram avaliadas: (a) 100:0, (b) 75:25, (c) 50:50, (d) 25:75 e (e) 0:100% (m/m). Neste estudo foram comparadas as respostas analíticas destes biossensores para a determinação de luteolina. Conforme mostrado na Figura 25,

pode-se notar um aumento na corrente de pico até a razão Nujol: Au-BMI.PF₆ de 50:50%, pois a adição do LI como aglutinante em um sensor de pasta de carbono modifica a estrutura da pasta proporcionando um aumento na taxa de transferência de elétrons, devido à sua alta condutividade. Entretanto, a incorporação do LI em alta proporção provocou uma diminuição na resposta fornecida pelo biossensor. Este comportamento foi similar ao obtido em estudos anteriores (BRONDANI *et al.*, 2009 A e B; FRANZOI *et al.*, 2009 B e C; MAGUERROSKI *et al.*, 2009; FRANZOI *et al.*, 2010; BRONDANI *et al.*, 2010). Musameh e Wang (MUSAMEH e WANG, 2008) reportaram que a melhor proporção do LI BMI.PF₆ em um EPC foi de 30-40%. Em porcentagens maiores, observaram um aumento na capacitância e resistência do eletrodo.

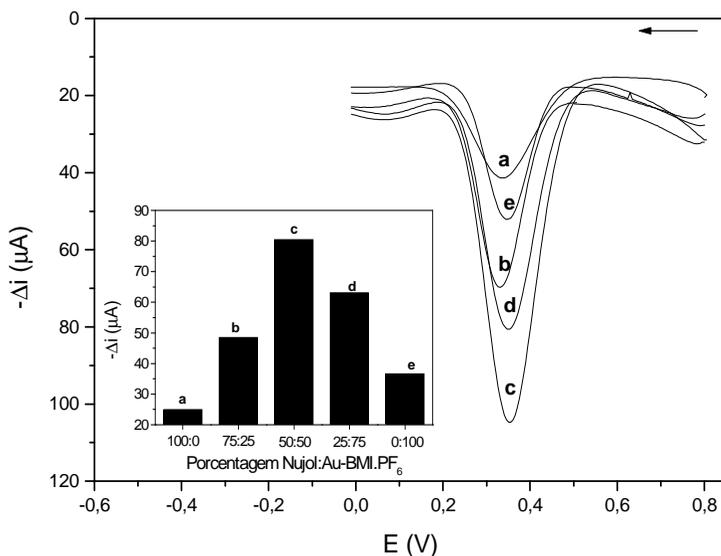


Figura 25. Voltamogramas de onda quadrada usando Nujol:Au-BMI.PF₆ nas proporções (a) 100:0, (b) 75:25, (c) 50:50, (d) 25:75 e (e) 0:100% (m/m) no biossensor imerso em solução tampão acetato pH 4,0 contendo $4,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de luteolina em frequência de 50 Hz, amplitude de 100 mV e incremento de 5,0 mV. Inserido: valores de corrente para cada composição do biossensor.

Assim, a razão 50:50% (m/m) de Nujol:BMI.PF₆, Ag-BMI.PF₆ ou Au-BMI.PF₆ foi usada para subsequentes construções dos biossensores e de uma forma mais geral a composição destes eletrodos por ser

expressa como: 50:20:15:15% (m/m/m/m) de pó de grafite: QTSCiCi para imobilizar a Lac:Nujol:LI ou nanopartículas-LI.

5.1.6.2. Quantidade de enzima

A influência da quantidade de Lac (0,22 a 0,95 unidades) imobilizada em QTSCiCi foi avaliada para o desenvolvimento dos biossensores e está apresentada na Figura 26.

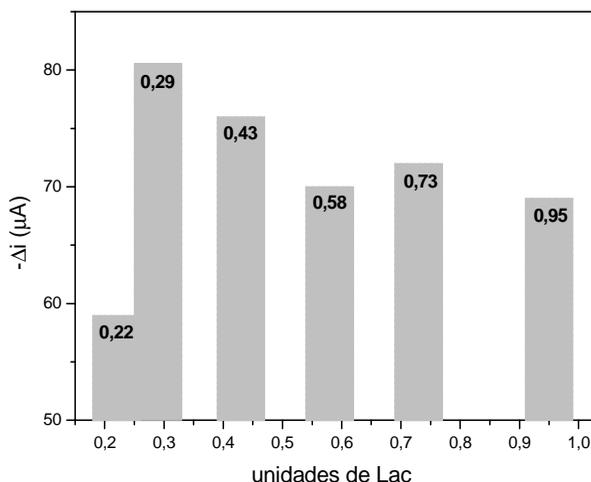


Figura 26. Efeito da quantidade de Lac (unidades) na resposta do Lac-QTSCiCi/Nujol/Au-BMI.PF₆-biossensor utilizando solução contendo $4,8 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de luteolina em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,0).

A resposta analítica do Lac-QTSCiCi/Nujol/Au-BMI.PF₆-biossensor em solução de luteolina $4,8 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ aumentou até a quantidade equivalente a 0,29 unidades de Lac, e após este valor, houve uma leve diminuição no valor da resposta. Portanto, 0,29 unidades de Lac foi usada para os próximos estudos.

5.1.6.3. Eletrólito suporte e pH

O pH exerce grande influência sobre as reações enzimáticas. Após a otimização da composição dos biossensores, o efeito do eletrólito suporte/pH foi investigado, em triplicata, na faixa entre 3,5 e 7,5 sobre a resposta do biossensores em solução de luteolina $4,8 \times 10^{-6}$

mol L⁻¹ em tampão acetato (pH 3,5–5,5) ou fosfato (pH 6,0–7,5) 0,1 mol L⁻¹ e está mostrado na Figura 27.

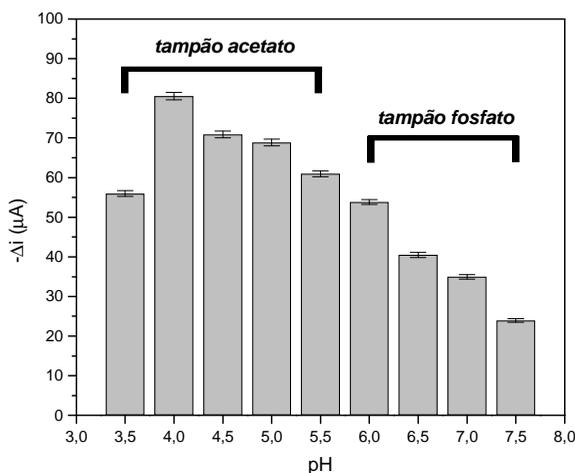


Figura 27. Efeito do pH/eletrólito suporte sobre a resposta do Lac-QTSCiCi/Nujol/Au-BMI.PF₆-biossensor utilizando solução de luteolina 4,8x10⁻⁶ mol L⁻¹.

Pode ser observada uma maior resposta para o analito em tampão acetato pH 4,0, resultado similar aos previamente publicados utilizando biossensores contendo a enzima Lac (FRANZOI *et al.*, 2009 A e B; FRANZOI *et al.*, 2010). Solução tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ em pH 4,0 será o eletrólito suporte para os estudos posteriores.

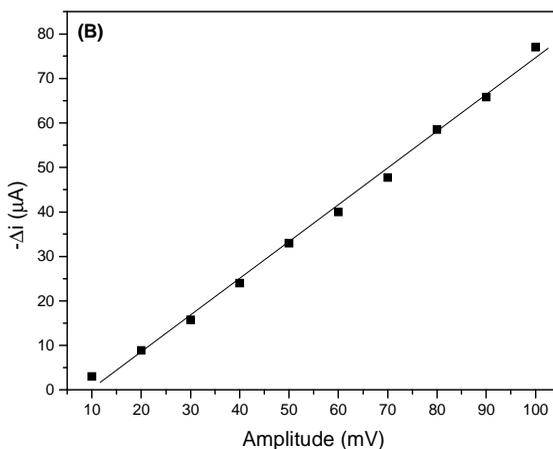
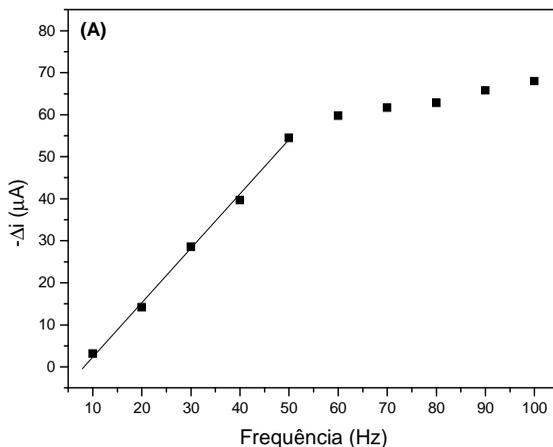
5.1.6.4. Parâmetros da voltametria de onda quadrada

A investigação da frequência, amplitude de pulso e incremento é de fundamental importância, pois a partir da otimização dos mesmos é possível aumentar a sensibilidade da técnica. Conseqüentemente, estes parâmetros foram avaliados sobre a resposta do Lac-QTSCiCi/Nujol/Au-BMI.PF₆-biossensor em solução de luteolina 4,8x10⁻⁶ mol L⁻¹ (tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ e pH 4,0).

A Figura 28A mostra o estudo da frequência em um intervalo de 10 a 100 Hz, fixando a amplitude em 80 mV e o incremento em 3,0 mV. A frequência de 50 Hz foi selecionada, pois apresentou o maior valor de corrente, mantendo-se praticamente constante em frequências superiores.

Fixando a frequência em 50 Hz e o incremento em 3,0 mV, investigou-se a amplitude de pulso em uma faixa de 10 a 100 mV. A intensidade do pico catódico aumentou linearmente até a amplitude máxima utilizada, 100 mV, como mostra a Figura 28B.

O efeito da variação do incremento foi realizado em intervalo de 0,5 a 10,0 mV, fixando a frequência em 50 Hz e a amplitude em 100 mV. De acordo com a Figura 28C, houve um aumento significativo da resposta analítica até 5,0 mV, e após este valor, a corrente manteve-se constante.



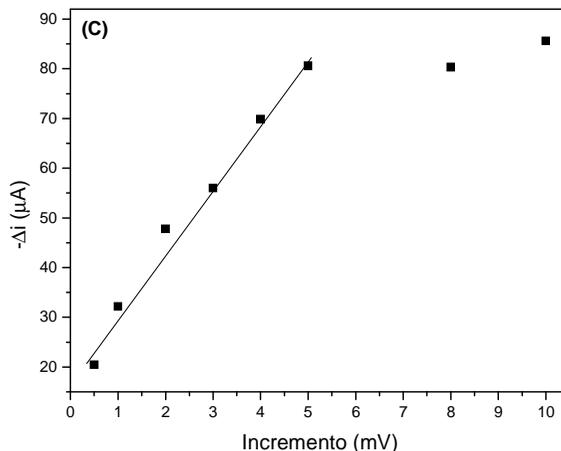


Figura 28. Investigação dos parâmetros de SWV: (A) Frequência, (B) Amplitude e (C) Incremento sobre a resposta do Lac-QTSCiCi/Nujol/Au-BMI.PF₆-biossensor utilizando solução com $4,8 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de luteolina em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,0).

A Tabela 5 relaciona os parâmetros analíticos e as faixas investigadas, e os melhores valores encontrados (valores selecionados) utilizando os biossensores propostos (Lac-QTSCiCi/Nujol/BMI.PF₆-biossensor, Lac-QTSCiCi/Nujol/Ag-BMI.PF₆-biossensor e Lac-QTSCiCi/Nujol/Au-BMI.PF₆-biossensor) para a otimização do método.

Tabela 5. Parâmetros avaliados para otimização do método.

Parâmetro	Faixa investigada	Valor ótimo
Nujol:LI ou Nujol:nanopartículas- LI (% , m/m)	100:0 – 0:100	50:50
Lac (unidades)	0,22 – 0,95	0,29
Eletrólito suporte/pH	Tampão acetato (pH 3,5 – 5,5) Tampão fosfato (pH 6,0 – 7,5)	Tampão acetato pH 4,0
Frequência (Hz)	10 – 100	50
Amplitude (mV)	10 – 100	100
Incremento (mV)	0,5 – 10,0	5,0

5.1.7. Curva analítica da luteolina

Sob condições experimentais otimizadas, os voltamogramas de onda quadrada foram investigados em uma faixa de potencial entre 0,8 e 0,0 V *versus* Ag/AgCl. Para este estudo, foram adicionados volumes sucessivos da solução estoque de luteolina $2,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ na cela eletroquímica contendo 10 mL de eletrólito suporte (tampão acetato 0,1 mol L⁻¹; pH 4,0). A Figura 29 apresenta os voltamogramas de onda quadrada e as curvas analíticas obtidos para luteolina empregando o (A) Lac-QTSCiCi/Nujol/Ag-BMI.PF₆-biossensor e (B) Lac-QTSCiCi/Nujol/Au-BMI.PF₆-biossensor. Pode-se notar um aumento na resposta de corrente com a concentração de luteolina.

A curva analítica do Lac-QTSCiCi/Nujol/Ag-BMI.PF₆-biossensor (Figura 29A) apresentou linearidade de $9,9 \times 10^{-8}$ a $5,8 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de luteolina ($-\Delta i = -0,265 + 1,468 \times 10^7$ [luteolina]; $r = 0,9998$), onde Δi é a corrente de pico em μA e [luteolina] é a concentração de luteolina em mol L⁻¹. O limite de detecção (3 x desvio padrão do intercepto/inclinação) encontrado foi de $5,3 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹.

A curva analítica obtida para o do Lac-QTSCiCi/Nujol/Au-BMI.PF₆-biossensor (Figura 27B) foi linear na mesma faixa: de $9,9 \times 10^{-8}$ a $5,8 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de luteolina ($-\Delta i = 0,761 + 1,659 \times 10^7$ [luteolina]; $r = 0,9999$), com limite de detecção de $2,8 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹.

Ambos biossensores apresentaram a mesma faixa linear, entretanto o Au-BMI.PF₆-biossensor forneceu um menor limite de detecção e uma maior sensibilidade de calibração (maior inclinação da curva analítica). Este comportamento pode ser devido à melhor estabilização das nanopartículas de ouro no LI, como descrito previamente.

Para investigar a contribuição das nanopartículas metálicas, estudos de SWV (voltamogramas de onda quadrada e a curva analítica para a luteolina) empregando o Lac-QTSCiCi/Nujol/BMI.PF₆-biossensor também foram realizados (dados não mostrados). Este biossensor apresentou uma menor faixa linear ($6,0 \times 10^{-7}$ a $5,8 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹), um maior limite de detecção ($9,8 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹) e menor sensibilidade ($7,324 \times 10^6$ $\mu\text{A mol}^{-1}$ L). A condutividade do LI combinada com a transferência de elétrons facilitada pelas nanopartículas metálicas proporcionou um melhor desempenho aos biossensores contendo Ag- e Au-BMI.PF₆.

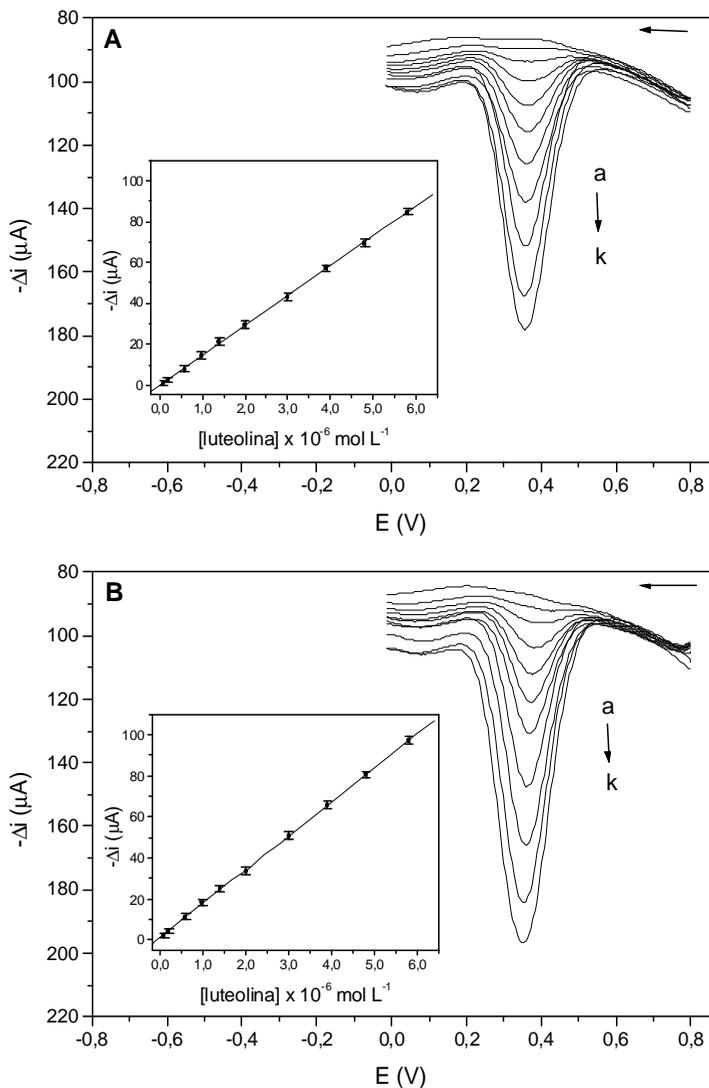


Figura 29. Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando (A) Lac-QTSClCi/Nujol/Ag-BMI.PF₆-biossensor e (B) Lac-QTSClCi/Nujol/Au-BMI.PF₆-biossensor em: (a) solução tampão acetato (0,1 mol L⁻¹; pH 4,0) e soluções de luteolina nas concentrações: (b) 9,9x10⁻⁸; (c) 2,0x10⁻⁷; (d) 6,0x10⁻⁷; (e) 9,9x10⁻⁷; (f) 1,4x10⁻⁶; (g) 2,0x10⁻⁶; (h) 3,0x10⁻⁶; (i) 3,9x10⁻⁶; (j) 4,8x10⁻⁶ e (k) 5,8x10⁻⁶ mol L⁻¹ em frequência de 50 Hz, amplitude de 100 mV e incremento de 5,0 mV. Insetido: curvas analíticas correspondentes. Experimentos realizados em triplicata.

5.1.8. Repetibilidade, reprodutibilidade e estabilidade dos biossensores

O estudo de repetibilidade foi realizado para avaliar o grau de concordância entre os resultados de cinco medidas sucessivas utilizando o mesmo biossensor em solução tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0) contendo luteolina $4,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. O desvio padrão relativo das correntes registradas foi de 2,1% para o Lac-QTSCiCi/Nujol/Ag-BMI.PF₆-biossensor e de 1,3% para Lac-QTSCiCi/Nujol/Au-BMI.PF₆-biossensor.

A reprodutibilidade das respostas de corrente de três biossensores (de cada tipo), preparados independentemente e de forma idêntica, foi estudada em solução contendo $4,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de luteolina. Uma excelente reprodutibilidade foi obtida, com desvio padrão relativo de 3,1% (Lac-QTS/CiCi/Nujol/Ag-BMI.PF₆-biossensor) e 2,8% (Lac-QTS/CiCi/Nujol/Au-BMI.PF₆-biossensor).

Outros parâmetros importantes nas determinações analíticas são a estabilidade e o tempo de vida útil do biossensor. Assim, estes foram investigados para os biossensores propostos com medidas realizadas durante um período de 70 dias (aproximadamente 250 determinações para cada quantidade de pasta de carbono usada na seringa) sendo armazenado à temperatura ambiente quando não utilizado. A Figura 30 demonstra que durante um período de 28 dias, nenhuma mudança significativa foi observada (95% da resposta inicial).

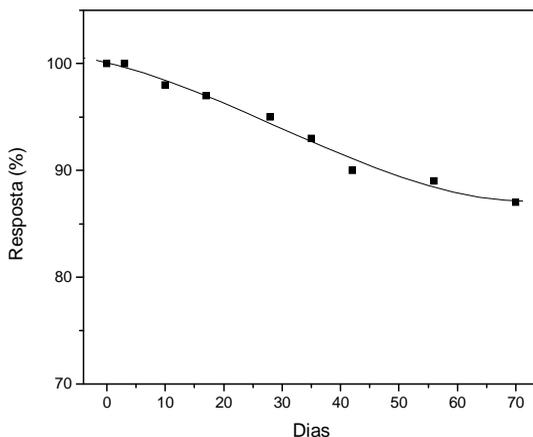


Figura 30. Estudo da estabilidade do Lac-QTSCiCi/Nujol/Au-BMI.PF₆-biossensor em solução tampão acetato contendo luteolina $4,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

Ao final dos 70 dias, o Lac-QTSCiCi/Nujol/Au-BMI.PF₆-biossensor apresentou 87% da resposta inicial. Este elevado tempo de vida do biossensor pode ser atribuído à eficiente imobilização da enzima no suporte de QTSCiCi. Um comportamento semelhante foi obtido com o Lac-QTSCiCi/NujolAg-BMI.PF₆-biossensor (84% da resposta inicial).

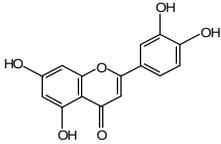
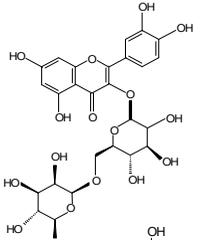
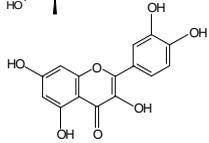
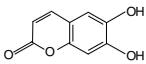
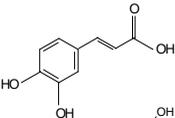
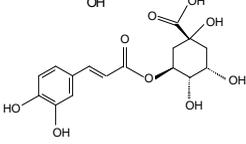
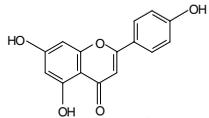
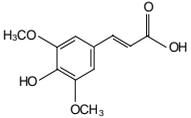
5.1.9. Seletividade e interferentes

Para investigar a seletividade do Lac-QTSCiCi/Nujol/Au-BMI.PF₆-biossensor, um estudo foi realizado avaliando sua resposta frente a diferentes compostos fenólicos. As respostas foram obtidas em solução tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,0) contendo diferentes substratos em duas concentrações (4,8x10⁻⁵ e 4,8x10⁻⁶ mol L⁻¹). A Tabela 6 mostra a estrutura, o potencial de pico catódico (E_{pc}) e resposta relativa (RR) (%) dos compostos analisados na concentração de 4,8x10⁻⁵ mol L⁻¹.

O biossensor apresentou uma resposta significativamente maior para a luteolina, sendo este analito selecionado para detecção em amostras de chá de camomila. Respostas inferiores foram obtidas para rutina, quercetina, esculetina, ácido cafeico e ácido clorogênico e nenhuma resposta foi observada para apigenina e ácido sinápico. Em concentração de 4,8x10⁻⁶ mol L⁻¹, observou-se um comportamento decrescente similar na resposta: luteolina > rutina > quercetina > esculetina > ácido cafeico, e não foram detectados, ácido clorogênico, apigenina e ácido sinápico. O biossensor demonstrou alta seletividade, pois mesmo produzindo respostas para vários analitos, pode-se distinguir claramente a resposta para a luteolina. O Lac-QTSCiCi/Nujol/Ag-BMI.PF₆-biossensor demonstrou um comportamento semelhante.

O efeito provocado na resposta do biossensor foi investigado através de sucessivas adições dos compostos detectados (rutina, quercetina, esculetina, ácido cafeico e ácido clorogênico) em uma solução contendo 4,8x10⁻⁶ mol L⁻¹ de luteolina. Para isto, as respostas de corrente obtidas foram comparadas: solução de luteolina + possível interferente e solução de luteolina.

Tabela 6. Respostas relativas do Lac-QTSCiCi/Nujol/Au-BMI.PF₆-biossensor para diferentes compostos fenólicos e a concentração tolerada para os possíveis interferentes na determinação de luteolina.

Análito	Estrutura	E _{pc} (V)	RR (%)	CT* (x 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹)
Luteolina		0,35	100	—
Rutina		0,31	24,7 ± 0,3	9,6 ± 0,1
Quercetina		0,33	19,3 ± 0,4	15,4 ± 0,3
Esculetina		0,36	14,2 ± 0,2	20,7 ± 0,3
Ácido cafeico		0,25	9,6 ± 0,1	39,8 ± 0,2
Ácido clorogênico		0,22	4,9 ± 0,1	64,5 ± 0,3
Apigenina		—	NR	—
Ácido sinápico		—	NR	—

*n = 3; RR = resposta relativa; CT = concentração tolerada; NR = nenhuma resposta foi observada.

A Tabela 6 apresenta as concentrações toleradas para cada analito (CT), ou seja, representam as concentrações que provocam uma variação de $\pm 5\%$ na resposta obtida para a luteolina. A partir deste valor, esses compostos podem atuar como possíveis interferentes na determinação deste flavonóide. Como citado anteriormente, o chá de camomila é composto por diferentes substâncias fenólicas, principalmente luteolina, apigenina e quercetina. A apigenina, que é o flavonóide mais abundante na camomila (QUEIROZ, 2008), não deverá interferir nas determinações, uma vez que não foi detectada pelo biossensor. Já a quercetina, em concentrações maiores que $1,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, poderá atuar como interferente.

5.1.10. Estudo de recuperação

Um estudo de recuperação de luteolina em duas amostras comerciais foi executado, com adição de três alíquotas de solução padrão dessa flavona em diferentes concentrações ($3,0 \times 10^{-6}$, $3,9 \times 10^{-6}$ e $5,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$). Os resultados encontrados foram comparados com as concentrações adicionadas e apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Recuperação de luteolina em amostras de chá de camomila usando os biossensores propostos.

Amostras	Adicionado ^a	Encontrado ^a		Recuperação (%)	
		(I)*	(II)*	(I)	(II)
Matte Leão	3,0	2,7 ± 0,1	2,8 ± 0,1	90,0	93,3
	3,9	4,1 ± 0,1	4,0 ± 0,1	105,1	102,6
	5,8	5,9 ± 0,1	5,7 ± 0,1	101,7	98,3
Naturelife	3,0	2,9 ± 0,2	2,8 ± 0,01	96,7	93,3
	3,9	3,8 ± 0,1	4,0 ± 0,2	97,4	102,6
	5,8	6,1 ± 0,1	5,9 ± 0,2	105,2	101,7

^a = luteolina ($\times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$); *n = 3; (I) = Lac-QTSCiCi/Nujol/Ag-BMI.PF₆-biossensor; (II) = Lac-QTSCiCi/Nujol/Au-BMI.PF₆-biossensor. Recuperação: (valor encontrado/valor adicionado) x 100.

A recuperação variou entre 90,0 e 105,1% para o Lac-QTSCiCi/Nujol/Ag-BMI.PF₆-biossensor e de 93,3 a 105,2% para o Lac-

QTSCiCi/Nujol/Au-BMI.PF₆-biossensor. Estes resultados demonstram uma exatidão satisfatória dos biossensores desenvolvidos e indicam a ausência de efeitos de matriz nestas determinações.

5.1.11. Determinação de luteolina em de chá de camomila

A fim de avaliar a aplicabilidade dos biossensores, determinou-se a concentração de luteolina (mg L⁻¹) em amostras de chá de camomila. As amostras foram preparadas conforme previamente descrito e quantificadas pelo método da adição de padrão. Os resultados dessas análises estão demonstrados na Tabela 8.

Tabela 8. Determinação de luteolina em chás de camomila usando os biossensores propostos.

Amostras	Luteolina (mg L ⁻¹)	
	Lac-QTSCiCi/Nujol/Ag-BMI.PF ₆ -biossensor*	Lac-QTSCiCi/Nujol/Au-BMI.PF ₆ -biossensor*
	X = 8,92 ± 0,12	X = 9,06 ± 0,14
Matte Leão	$t_C = 1,96$	
	$F_C = 1,36$	
	X = 5,22 ± 0,12	X = 5,31 ± 0,11
Naturelife	$t_C = 1,32$	
	$F_C = 1,19$	

*n = 6; X = média ± desvio padrão; t_C = valor de t calculado; F_C = valor de F calculado.

Para investigar se há concordância entre os resultados fornecidos pelos biossensores, foram aplicados os testes F e t (SKOOG *et al.*, 2002; SKOOG *et al.*, 2008). Os menores valores de F calculados (F_C) em comparação com o F teórico (F_T) (5,05) demonstram que os biossensores fornecem precisões comparáveis, isto é, desvios padrões comparáveis em um nível de confiança de 95%. Os valores de t calculados (t_C) também foram inferiores ao valor teórico (t_T) (2,23), para uma média de seis medidas (nível de confiança de 95%), indicando que estatisticamente não há diferença significativa entre os teores de luteolina determinados pelos biossensores para a mesma amostra. Em

adição aos bons resultados obtidos nos estudos de seletividade, interferentes e recuperação, o método proposto mostrou-se satisfatório para determinação de luteolina em chá de camomila.

A diferença entre os teores de luteolina encontrados (entre as marcas testadas) pode ser atribuída à diferente composição dos chás, sendo que no Matte Leão há um predomínio dos capítulos florais da camomila, diferentemente do Naturelife, onde predominam as folhas. Estudos fitoquímicos demonstraram que os flavonóides estão distribuídos por toda planta, porém os seus capítulos florais concentram uma maior quantidade destes compostos (QUEIROZ, 2008).

São poucos os trabalhos reportados na literatura para determinação de luteolina, sendo que não existe um método oficial para sua detecção. A Tabela 9 apresenta as técnicas comumente empregadas e a técnica utilizada neste trabalho, bem como as características analíticas, como faixas lineares e limites de detecção.

Tabela 9. Faixas lineares e limites de detecção para o analito luteolina empregando diferentes técnicas analíticas.

Técnica analítica	Faixa linear (mol L ⁻¹)	LD (mol L ⁻¹)	Referência
HPLC	1,3x10 ⁻⁷ – 1,5x10 ⁻⁵	6,4x10 ⁻⁹	LI <i>et al.</i> , 2005
HPLC	3,4x10 ⁻⁷ – 2,7x10 ⁻⁵	4,1x10 ⁻⁸	LI <i>et al.</i> , 2006
LC	2,0x10 ⁻⁷ – 9,8x10 ⁻⁶	6,5x10 ⁻⁸	LUAN <i>et al.</i> , 2008
CE	3,5x10 ⁻⁶ – 3,5x10 ⁻⁴	1,3x10 ⁻⁶	CAO e YUAN, 2004
CE-MS	4,4x10 ⁻⁸ – 4,4x10 ⁻⁶	1,3x10 ⁻⁸	YIN <i>et al.</i> , 2008
CE-ED (EDC)	3,5x10 ⁻⁶ – 7,0x10 ⁻⁴	6,6x10 ⁻⁷	CAO <i>et al.</i> , 2002
SWV (Nujol/Ag- BMI.PF ₆ ⁻ biossensor)	9,9x10 ⁻⁸ – 5,8x10 ⁻⁶	5,3x10 ⁻⁸	Este trabalho
SWV (Lac- QTSCiCi/Nujol/ Au-BMI.PF ₆ ⁻ biossensor)	9,9x10 ⁻⁸ – 5,8x10 ⁻⁶	2,8x10 ⁻⁸	Este trabalho

LD = limite de detecção; EDC = eletrodo de disco de carbono.

Pode-se observar que os limites de detecção obtidos, através da técnica eletroanalítica de SWV, com os biossensores são comparáveis ou melhores que os apresentados pelas outras técnicas, exceto quando comparados com o obtido através da análise de HPLC (LI *et al.*, 2005). Deste modo, o método proposto neste trabalho representa uma ótima opção para determinação de luteolina. A contribuição catalítica da enzima Lac eficientemente imobilizada associada à condutividade dos LI contendo nanopartículas dispersas, que facilitam a transferência de elétrons, proporcionou um excelente desempenho aos biossensores desenvolvidos.

5.2. Biossensor contendo nanopartículas de prata em líquido iônico e lacase imobilizada em β -ciclodextrina modificada

5.2.1. Estudo da atividade e estabilidade da lacase

Estes estudos foram realizados de modo semelhante ao relatado no item 5.1.1. O valor de atividade da Lac obtido foi de 13,0 unidades por mL de solução enzimática (Figura 31A) e esta atividade foi mantida sem consideráveis alterações entre 20-25 dias de estocagem (Figura 31B).

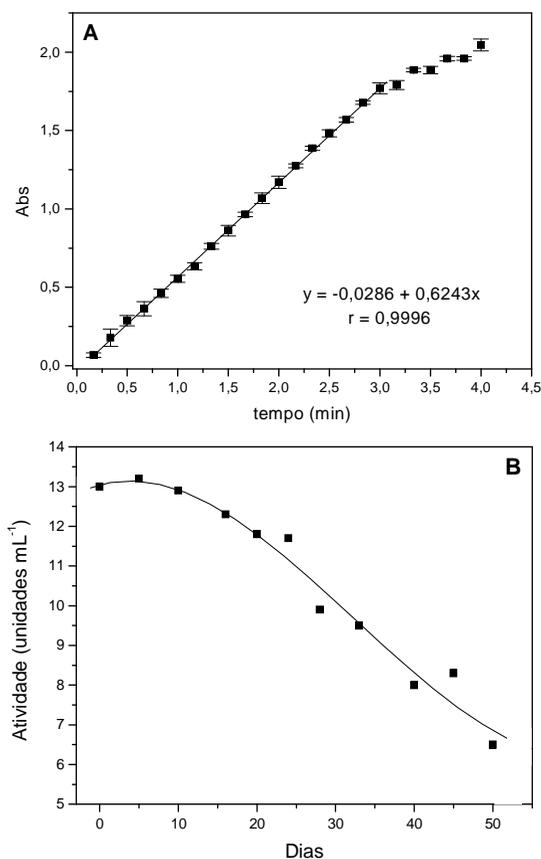


Figura 31. (A) Gráfico Abs *versus* tempo para determinação da atividade enzimática da Lac e (B) Estudo da estabilidade da Lac armazenada sob refrigeração (4 °C).

5.2.2. Reticulação da β -ciclodextrina e imobilização da enzima

Estratégias para imobilização de enzimas são interessantes para a obtenção de biossensores com maior tempo de uso, uma vez que a retenção deste componente biológico em um suporte adequado promove a sua estabilização e, conseqüentemente, proporciona um melhor desempenho ao dispositivo. Neste sentido, a Epi foi utilizada como agente reticulante para formar uma rede polimérica com a β -CD, e o suporte formado β -CDEpi, foi então aplicado como matriz para imobilização da enzima Lac.

A Figura 32 mostra as diferenças significativas entre as imagens de SEM da β -CD antes (A) e após modificação química (B). A imagem da β -CD revela uma estrutura formada por cristais maiores, com diferentes tamanhos e relativamente dispersos, conforme previamente reportado (PINTO *et al.*, 2005). Entretanto, a incorporação da Epi proporcionou um aspecto finamente rugoso à superfície da β -CD. A aparência da matriz polimérica β -CDEpi sugere que a modificação ocorreu de forma eficiente.

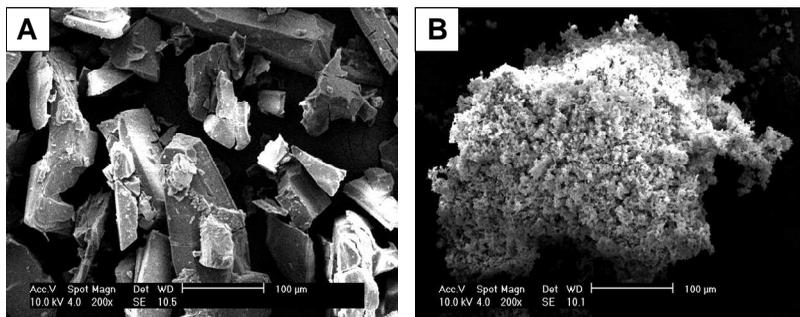


Figura 32. Imagens de SEM da (A) β -CD e (B) β -CDEpi.

A Figura 33 sugere um esquema proposto para a imobilização da Lac em β -CDEpi. A Epi é um reagente bifuncional que pode reagir com os grupos OH de moléculas de β -CD, formando uma ponte entre as mesmas e/ou reagir entre si, numa reação de polimerização (Crini, *et al.*, 1998). Deste modo, a enzima Lac pode ser imobilizada nesta polimérica insolúvel em água, fornecendo um ambiente propício para sua estabilização.

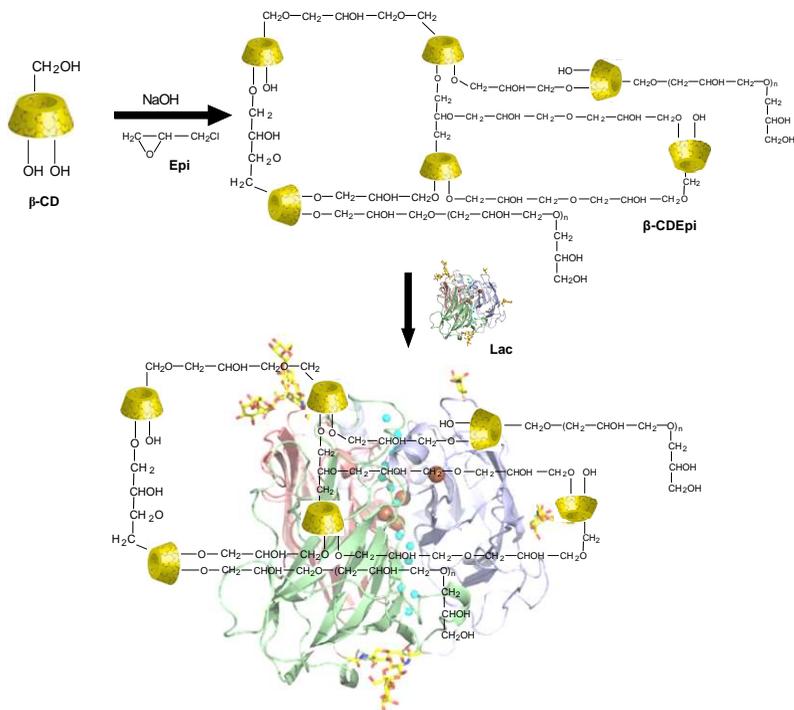


Figura 33. Esquema proposto para imobilização da Lac em β -CDEpi (Crini, *et al.*, 1998).

5.2.3. Reação enzimática na superfície do eletrodo

Semelhante ao processo enzimático relatado anteriormente, a Lac catalisa a oxidação da quercetina à sua correspondente *o*-quinona, na presença de oxigênio molecular. Então, esta *o*-quinona é reduzida eletroquimicamente para quercetina na superfície do eletrodo a um potencial de 0,29 V *versus* Ag/AgCl, conforme ilustrado na Figura 34. O valor de corrente obtido é usado como sinal analítico para quantificação de quercetina.

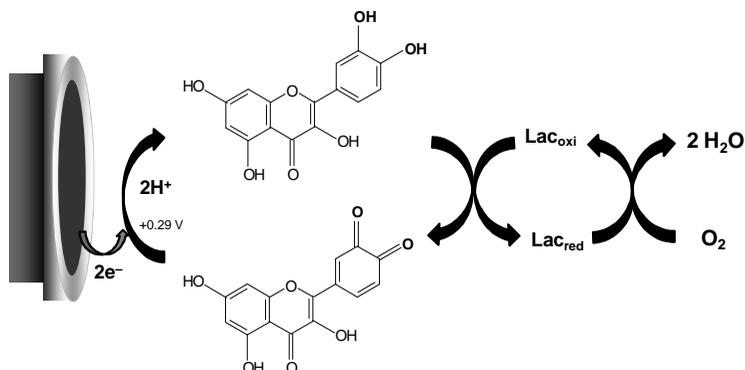


Figura 34. Esquema da reação de oxidação da quercetina catalisada pela enzima Lac e sua subsequente redução na superfície do eletrodo. Lac_{red} : lacase na forma reduzida e Lac_{oxi} : lacase na forma oxidada.

5.2.4. Comportamento eletroquímico da quercetina usando diferentes sensores

Na primeira parte deste trabalho de tese, a incorporação da enzima Lac eficientemente imobilizada em QTSCiCi e Ag-BMI.PF₆ ou Au-BMI.PF₆ como aglutinantes proporcionou aos biossensores uma maior reposta analítica frente a luteolina. O efeito de diferentes composições dos sensores também foi avaliado para a quercetina e as etapas de construção estão ilustradas na Figura 35A. SWV foi a técnica analítica empregada para a investigação do comportamento eletroquímico de uma solução de quercetina $4,2 \times 10^{-6}\text{ mol L}^{-1}$ em tampão acetato $0,1\text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0), em uma faixa de potencial entre 0,8 e 0,0 V *versus* Ag/AgCl. A Figura 35B mostra os voltamogramas e os valores de corrente obtidos com a redução da o-quinona para quercetina (valores da corrente resultante estão inseridos na Figura 35B).

A adição da enzima Lac (b) mostra um aumento no sinal analítico quando comparado com a pobre resposta fornecida pelo EPC (a), uma vez que esta enzima catalisa a reação de oxidação da quercetina. A maior resposta observada com o Lac- β -CDEpi/Nujol-biossensor (c) confirma a eficiência do processo de imobilização. O suporte β -CDEpi pode fornecer um meio favorável para melhorar e/ou manter as características da enzima Lac.

O LI BMI.N(Tf)₂ utilizado como aglutinante forma uma ponte

condutora entre as camadas de carbono que facilita a transferência de elétrons entre a enzima e a superfície do eletrodo, deste modo uma resposta superior foi obtida com o Lac- β -CDEpi/Nujol/BMI.N(Tf)₂-biossensor (d).

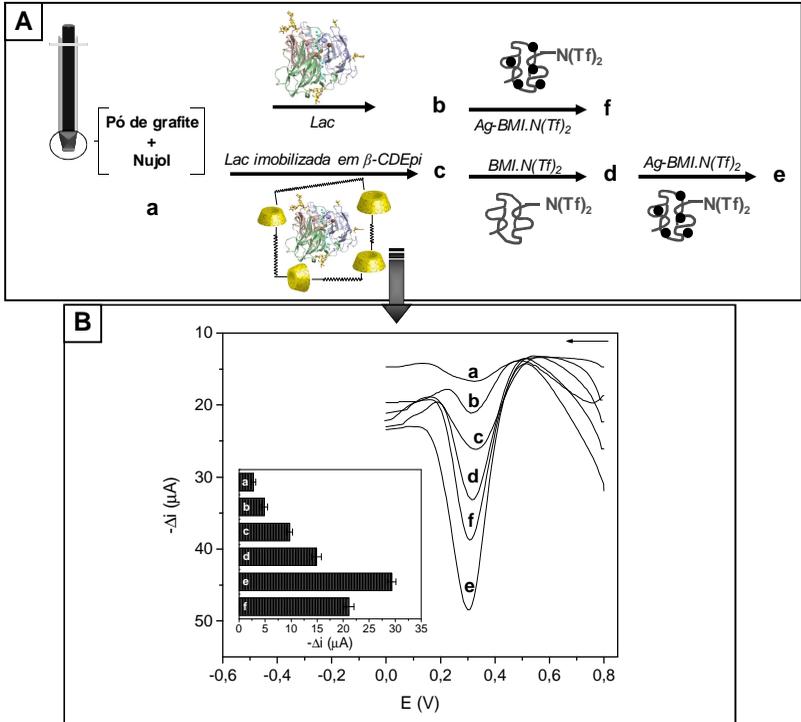


Figura 35. (A) Representação esquemática da construção dos diferentes sensores e (B) Voltamogramas de onda quadrada usando (a) EPC, (b) Lac/Nujol-biossensor, (c) Lac- β -CDEpi/Nujol-biossensor, (d) Lac- β -CDEpi/Nujol/BMI.N(Tf)₂-biossensor, (e) Lac- β -CDEpi/Nujol/Ag-BMI.N(Tf)₂-biossensor e (f) Lac/Nujol/Ag-BMI.N(Tf)₂-biossensor em solução contendo $4,2 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de quercetina em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,0); frequência de 60 Hz; amplitude de 100 mV e incremento de 8,0 mV. Inseto: valores das correntes de pico. O experimento foi realizado em triplicata.

Uma corrente de pico muito maior foi obtida com o Lac- β -CDEpi/Nujol/Ag-BMI.N(Tf)₂-biossensor (e), devido ao efeito sinérgico da combinação entre as nanopartículas de Ag e o LI BMI.N(Tf)₂. A superioridade do Lac- β -CDEpi/Nujol/Ag-BMI.N(Tf)₂-biossensor

frente ao Lac/Nujol/Ag-BMI.N(Tf)₂-biossensor (f) reafirma a importância da imobilização da Lac no desempenho do sensor. Em adição, maior sinal analítico fornecido pelo Lac/Nujol/Ag-BMI.N(Tf)₂-biossensor (f) em comparação ao Lac/Nujol-biossensor (b) pode ser atribuído às propriedades condutoras dos LI e das nanopartículas metálicas, bem como a formação de um microambiente estável para imobilização da enzima.

5.2.5. Otimização do método

Para otimização do método proposto, partiu-se da seguinte composição: 50:20:15:15% (m/m/m/m) de pó de grafite:β-CDEpi para imobilizar a Lac:Nujol: BMI.NTf₂ ou Ag-BMI.N(Tf)₂. Os resultados apresentados referem-se ao Lac-β-CDEpi/Nujol/Ag-BMI.N(Tf)₂-biossensor, pois o Lac-β-CDEpi/Nujol/BMI.N(Tf)₂-biossensor forneceu os mesmos valores ótimos para os parâmetros estudados.

Os estudos para avaliar o efeito das diferentes quantidades entre os aglutinantes (Nujol: BMI.N(Tf)₂ ou Ag-BMI.N(Tf)₂ - 100:0, 50:50, 25:75 0:100% (m/m)) também foram realizados, contudo os dados não serão mostrados, uma vez que a proporção ótima foi de 50:50% (m/m).

5.2.5.1. Quantidade de enzima

A influência de diferentes quantidades de Lac imobilizada em β-CD/Epi, entre 0,10 a 0,65 unidades, foi investigada durante a construção dos biossensores. De acordo com a Figura 36, a resposta analítica do Lac-β-CDEpi/Nujol/Ag-BMI.N(Tf)₂-biossensor em solução de quercetina $4,2 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ aumentou até 0,45 unidades de Lac, e após este valor, permaneceu praticamente constante. Assim, selecionou-se 0,45 unidades de Lac para o desenvolvimento dos biossensores.

5.2.5.2. Eletrólito suporte e pH

Este estudo foi investigado, em triplicata, utilizando-se solução de quercetina $4,2 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ em tampão acetato ou fosfato (0,1 mol L⁻¹) variando o pH de 3,5 a 7,5, como apresentado na Figura 37. A resposta máxima de corrente foi encontrada em tampão acetato pH 4,0, sendo este resultado o mesmo obtido na primeira parte do trabalho.

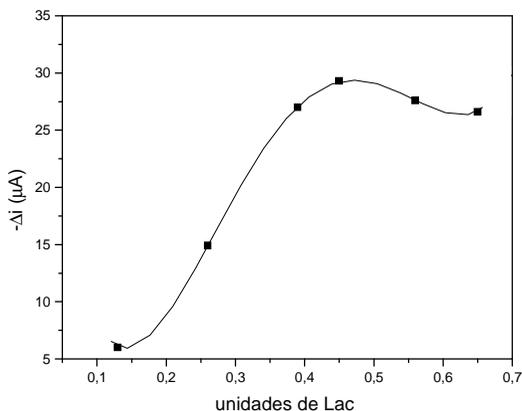


Figura 36. Efeito da quantidade de Lac (unidades) na resposta do Lac-β-CDEpi/Nujol/Ag-BMLN(Tf)₂-biossensor utilizando solução contendo $4,2 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de quercetina em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,0).

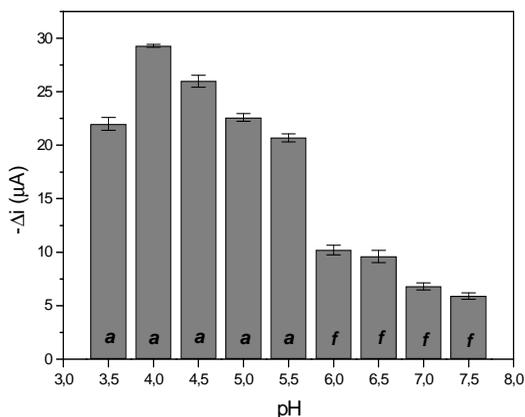
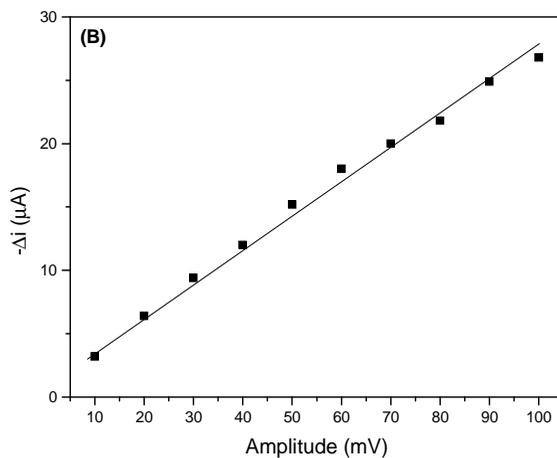
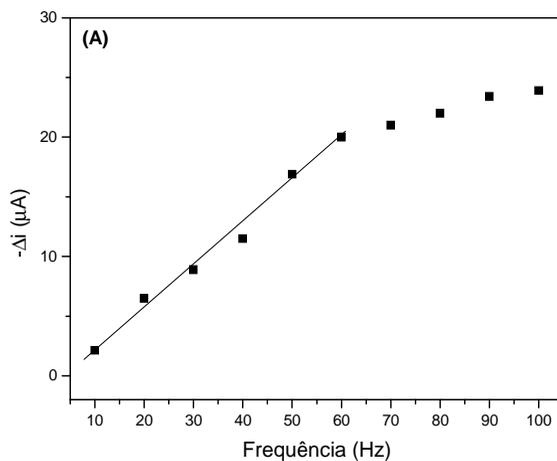


Figura 37. Efeito do pH/eletrólito suporte sobre a resposta do Lac-β-CDEpi/Nujol:Ag-BMLN(Tf)₂-biossensor utilizando solução de quercetina $4,2 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (a – tampão acetato e f – tampão fosfato).

5.2.5.3. Parâmetros da voltametria de onda quadrada

Sob as condições previamente selecionadas, os parâmetros de SWV: frequência (10 – 100 Hz), amplitude (10 – 100 mV) e incremento (0,5 – 10 mV) foram estudados empregando o Lac-β-CDEpi/Nujol:Ag-

BMLN(Tf)₂-biossensor em solução de quercetina $4,2 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ e pH 4,0). De acordo com os resultados obtidos e mostrados na Figura 38, os seguintes parâmetros foram utilizados nos estudos posteriores: frequência de 60 Hz (Figura 38A), amplitude de 100 mV (Figura 38B) e incremento de 8,0 mV (Figura 38C).



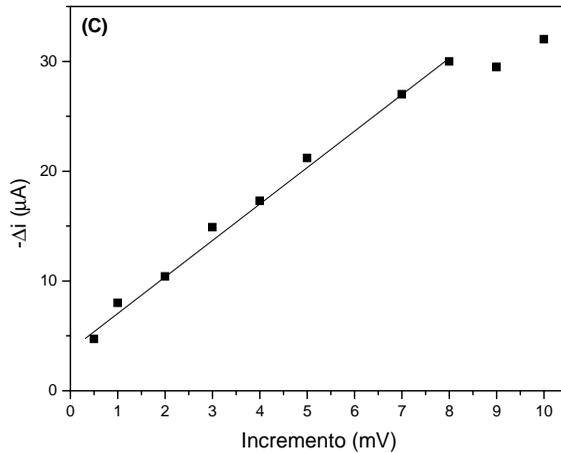


Figura 38. Investigação dos parâmetros de SWV: (A) Frequência (amplitude = 80 mV e incremento = 5,0 mV) (B) Amplitude (frequência = 60 mV e incremento = 5,0 mV) e (C) Incremento (frequência = 60 mV e amplitude = 100 mV) sobre a resposta analítica do Lac- β -CDEpi/Nujol:Ag-BMI.N(Tf)₂-biossensor utilizando solução contendo $4,2 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de quercetina em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,0).

A Tabela 10 apresenta os parâmetros analíticos investigados, as faixas e os valores selecionados para o Lac- β -CDEpi/Nujol/BMI.N(Tf)₂-biossensor e o Lac- β -CDEpi/Nujol/Ag-BMI.N(Tf)₂-biossensor.

Tabela 10. Parâmetros avaliados para otimização do método.

Parâmetro	Faixa investigada	Valor ótimo
Nujol: BMI.N(Tf) ₂ ou Nujol: Ag- BMI.N(Tf) ₂ (% m/m)	100:0 – 0:100	50:50
Lac (unidades)	0,22 – 0,95	0,45
Eletrólito suporte/pH	Tampão acetato (pH 3,5 – 5,5) Tampão fosfato (pH 6,0 – 7,5)	Tampão acetato pH 4,0
Frequência (Hz)	10 – 100	60
Amplitude (mV)	10 – 100	100
Incremento (mV)	0,5 – 10,0	8,0

5.2.6. Curva analítica da quercetina

A Figura 39 mostra o perfil dos voltamogramas de onda quadrada obtidos (potencial entre 0,8 e 0,0 V *versus* Ag/AgCl) com o Lac- β -CDEpi/Nujol/Ag-BMI.N(Tf)₂-biossensor em diferentes concentrações de quercetina e um pico de redução pode ser observado em 0,29 V. A curva analítica (inserida na Figura 39) demonstrou uma faixa linear de $1,0 \times 10^{-7}$ a $7,4 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de quercetina ($-\Delta i = -0,675 + 7,523 \times 10^6$ [quercetina]; $r = 0,9996$), onde Δi é a corrente de pico resultante em μ A e [quercetina] é a concentração de quercetina em mol L⁻¹. O limite de detecção (3 x desvio padrão do intercepto/inclinação) obtido foi de $3,9 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹.

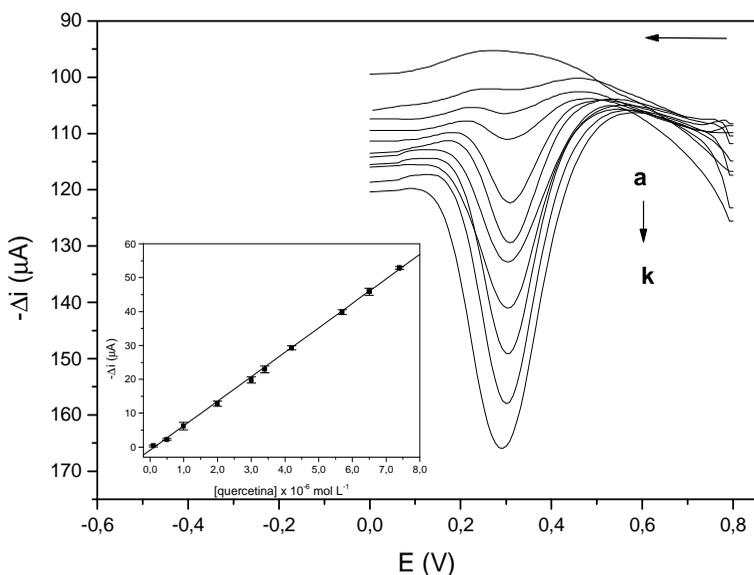


Figura 39. Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando Lac- β -CDEpi/Ag-BMI.N(Tf)₂-biossensor em: (a) solução tampão acetato (0,1 mol L⁻¹; pH 4,0) e soluções de quercetina nas seguintes concentrações: (b) $1,0 \times 10^{-7}$; (c) $5,0 \times 10^{-7}$; (d) $9,9 \times 10^{-7}$; (e) $2,0 \times 10^{-6}$; (f) $3,0 \times 10^{-6}$; (g) $3,4 \times 10^{-6}$; (h) $4,2 \times 10^{-6}$; (i) $5,7 \times 10^{-6}$; (j) $6,5 \times 10^{-6}$ e (k) $7,4 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ em frequência de 60 Hz, amplitude de 100 mV e incremento de 8,0 mV. Inserido: curva analítica. Experimento realizado em duplicata.

O maior limite de detecção ($1,1 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹) e menor

sensibilidade de calibração (inclinação da curva analítica = $6,956 \times 10^6 \mu\text{A mol}^{-1} \text{L}$) fornecidos pelo Lac- β -CD/Epi/Nujol/BMI.N(Tf)₂-biossensor (dados não mostrados) confirmam a contribuição das nanopartículas de prata na transferência de elétrons na superfície do biossensor.

5.2.7. Repetibilidade, reprodutibilidade e estabilidade dos biossensores

A repetibilidade entre os valores de corrente obtidos usando Lac- β -CDEpi/Nujol/Ag-BMI.N(Tf)₂-biossensor foi analisada em solução tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0) contendo quercetina $4,2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, através de seis medidas sucessivas. O desvio padrão relativo encontrado foi de 2,0%. A reprodutibilidade foi investigada considerando três biossensores preparados independentemente. Um desvio padrão relativo de 3,8% foi obtido com o biossensor proposto, o que indica uma ótima reprodutibilidade.

A estabilidade de diferentes biossensores, Lac/Nujol-biossensor, Lac- β -CDEpi/Nujol-biossensor e Lac- β -CDEpi/Nujol/Ag-BMI.N(Tf)₂-biossensor, foi avaliada através do monitoramento da resposta de corrente remanescente após um período de 60 dias de estocagem à temperatura ambiente e com medidas realizadas em solução de quercetina $4,2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 40).

Primeiramente, pode ser notado que após 60 dias o Lac- β -CDEpi/Nujol-biossensor apresentou 84% de sua resposta inicial, enquanto que somente 65% da resposta foi mantida pelo Lac/Nujol-biossensor. Esta diferença pode ser justificada pelo fato do Nujol-biossensor não oferecer um meio apropriado para retenção da atividade e estabilidade da Lac. A melhor estabilidade operacional do Lac- β -CD/Epi/Nujol-biossensor demonstra que a β -CD/Epi é uma excelente matriz para imobilização e estabilização da Lac.

Com a incorporação das Ag-BMI.N(Tf)₂ na construção do biossensor observou-se uma perda menos significativa na resposta analítica, somente 7% durante todo o período analisado. Este comportamento mostra que as nanopartículas associadas ao LI oferecem um microambiente favorável para execução do processo biocatalítico, melhorando a estabilidade enzimática e ainda promovendo a transferência de elétrons entre a enzima e a superfície do eletrodo. Diversos pesquisadores têm relatado as grandes vantagens em utilizar LI, nanopartículas ou a associação entre ambos no desenvolvimento de biossensores com características analíticas superiores (DING *et al.*,

2008; PINGARRÓN *et al.*, 2008; SHANGGUAN *et al.*, 2008; BRONDANI *et al.*, 2009 B; FERNANDES *et al.*, 2009; BRONDANI *et al.*, 2010; SHIDDIKY e TORRIERO, 2011; FRANZOI *et al.*, 2010).

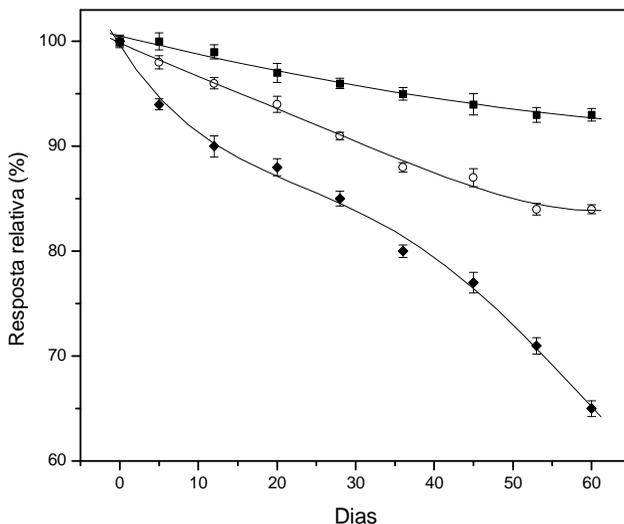


Figura 40. Estudo da estabilidade dos diferentes biossensores: (—■—) Lac-β-CDEpi/Nujol/Ag-BMI.N(Tf)₂-biossensor; (—○—) Lac-β-CDEpi/Nujol-biossensor e (—◆—) Lac/Nujol-biossensor usando $4,2 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de quercetina em solução tampão acetato (pH 4,0). Experimentos realizados em duplicata.

5.2.8. Seletividade e interferentes

A seletividade é importante em termos de uso prático dos biossensores. Neste experimento, compostos fenólicos como: quercetina, rutina, apigenina, miricetina, kaempferol, morina, catequina, ácido cafeico e ácido ascórbico foram estudados para investigar a seletividade do Lac-β-CDEpi/Nujol/Ag-BMI.N(Tf)₂-biossensor. As respostas foram obtidas em solução tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0) contendo os substratos em concentração $4,2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. A resposta analítica (corrente de pico) do biossensor decresceu na ordem: quercetina > rutina > miricetina > ácido ascórbico > ácido cafeico > catequina. Nenhuma resposta foi observada para apigenina, kaempferol e morina. Assim, como o biossensor demonstrou uma maior resposta para quercetina, este flavonóide foi selecionado para investigação e quantificação em duas amostras: formulação farmacêutica manipulada e

suco de maçã (obtido da fruta fresca).

O efeito de diversas substâncias (as mesmas que foram investigadas no estudo da seletividade) foi analisado pela comparação da resposta analítica fornecida pelo biossensor proposto na proporção 1:1 quercetina:possível interferente em relação à solução de quercetina $4,2 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. Como esperado, apigenina, kaempferol e morina não causaram interferência, fato que confirma os resultados obtidos no estudo da seletividade. Os compostos rutina, miricetina, ácido ascórbico, ácido cafeico e catequina foram detectados pelo biossensor, entretanto, a resposta obtida correspondeu a menos que 11% da resposta para quercetina.

Hoffmann-Ribani e colaboradores (HOFFMANN-RIBANI *et al.*, 2009) investigaram o conteúdo de flavonóis (miricetina, quercetina e kaempferol) e flavonas (luteolina e apigenina) em uma variedade de frutas brasileiras e somente quercetina pode ser quantificada em jaboticaba, laranja e maçã. Como descrito anteriormente, estes flavonóides são os principais constituintes de algumas frutas e verduras, sendo a quercetina o componente majoritário na maioria destes gêneros alimentícios (MIEAN e MOHAMED, 2001; AHERNE e O'BRIEN, 2002; HOFFMANN-RIBANI, *et al.*, 2009; HUBER *et al.*, 2009).

Com base nos dados obtidos e nos relatados na literatura, o Lac- β -CDEpi/Nujol/Ag-BMI.NTf₂-biossensor demonstrou elevada seletividade e a presença de outras substâncias não mostrou interferência significativa no método proposto para determinação de quercetina. Os estudos de seletividade e interferentes foram realizados em duplicata.

5.2.9. Estudo de recuperação

Um estudo de recuperação em duas amostras comerciais foi realizado, em triplicata, com adição de soluções padrão de quercetina em diferentes concentrações ($2,0 \times 10^{-6}$, $4,2 \times 10^{-6}$ e $6,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹). Conforme os dados apresentados na Tabela 11, os coeficientes de recuperação variaram entre 95,0 e 102,4% para o Lac- β -CDEpi/Nujol/Ag-BMI.N(Tf)₂-biossensor, demonstrando a ausência de efeitos de matriz nestas determinações.

Tabela 11. Recuperação de quercetina em diferentes amostras usando o Lac- β -CDEpi/Nujol/Ag-BMI.N(Tf)₂-biossensor.

Amostras	Quercetina ($\times 10^{-6}$ mol L ⁻¹)		Recuperação (%)
	Adicionado*	Encontrado*	
Formulação farmacêutica manipulada	2,0	2,0 \pm 0,1	100,0
	4,2	4,1 \pm 0,2	97,6
	6,5	6,4 \pm 0,2	98,5
Suco de maçã	2,0	1,9 \pm 0,2	95,0
	4,2	4,3 \pm 0,1	102,4
	6,5	6,6 \pm 0,2	101,5

*n = 3.

5.2.10. Determinação de quercetina em formulação farmacêutica e em suco de maçã

O método proposto foi avaliado aplicando-o na determinação de quercetina em formulação farmacêutica manipulada e em suco de maçã. A quantidade de quercetina foi determinada, em triplicata, usando o biossensor proposto e um método espectrofotométrico (este último somente para amostra farmacêutica). Os resultados das quantificações estão relacionados na Tabela 12.

O menor valor de F_C em comparação com o F_T (19,00) demonstra que os dois métodos têm precisões equivalentes (nível de confiança de 95%). Aplicando o teste t para os resultados obtidos com o método espectrofotométrico e o biossensor, o valor de t_C foi menor que o valor de t_T (2,78), para uma média de três medidas em um nível de confiança de 95%, demonstrando que não há diferença significativa entre as médias de quercetina determinadas na amostra farmacêutica. Em adição, os baixos erros relativos demonstram boa concordância entre os resultados obtidos com os métodos e o valor rotulado. Portanto, pode-se concluir que esta metodologia é adequada para a determinação de quercetina em formulação farmacêutica manipulada.

Quercetina também foi quantificada em suco de maçã e a concentração obtida foi de 6,6 \pm 0,8 mg por 100 g de fruta fresca. Este valor pode ser comparado ao reportado por Hoffmann-Ribani e

colaboradores (HOFFMANN-RIBANI *et al.*, 2009) em maçã vermelha (Fuji) utilizando HPLC como técnica analítica: $7,5 \pm 1,1$ mg por 100 g de fruta fresca. Na ausência de um método oficial, a alta seletividade apresentada pelo biossensor, que minimiza a interferência de várias outras substâncias presentes, associada aos ótimos valores de recuperação, são características importantes que podem viabilizar a sua utilização na determinação de quercetina em amostras mais complexas.

Tabela 12. Determinação de quercetina em diferentes amostras usando o Lac- β -CDEpi/Nujol/Ag-BMI.N(Tf)₂-biossensor.

Amostra	Quercetina			Erro relativo (%)		
	Rotulado	Método espectrofotométrico*	Biossensor*	Er ₁	Er ₂	Er ₃
Formulação manipulada (mg cápsula ⁻¹)	250	242,1 ± 0,8	241,3 ± 0,5	-3,2	+0,3	-3,5
		$t_c =$	1,39			
		$F_c =$	2,56			
Suco de maçã (mg 100g ⁻¹)	—	—	6,6 ± 0,8	—	—	—

*n = 3; t_c = valor de t calculado; F_c = valor de F calculado; Er₁: método espectrofotométrico *versus* valor rotulado; Er₂: biossensor *versus* método espectrofotométrico; Er₃: biossensor *versus* valor rotulado.

A Tabela 13 reúne alguns trabalhos reportados na literatura para determinação de quercetina, onde estão apresentadas as diferentes técnicas utilizadas, os eletrodos e suas composições, bem como as faixas lineares e os limites de detecção.

O limite de detecção fornecido pelo biossensor através de SWV ($3,9 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹) é inferior aos obtidos com as técnicas analíticas de HPLC, e CE-ED, exceto quando comparado com o obtido pela análise de HPLC proposta por Kumar (KUMAR *et al.*, 2009). Entretanto, as técnicas eletroanalíticas apresentam vantagens como rapidez, baixo custo das análises, facilidade no manuseio da instrumentação frente às tradicionais técnicas cromatográficas. Além disso, a metodologia proposta empregando Lac- β -CDEpi/Nujol/Ag-BMI.N(Tf)₂-biossensor demonstrou um limite de detecção menor ou comparável em relação aos obtidos com outras técnicas eletroanalíticas utilizando eletrodos modificados.

Tabela 13. Faixas lineares e limites de detecção para quercetina empregando diferentes técnicas analíticas.

Técnica	Faixa linear (mol L ⁻¹)	LD (mol L ⁻¹)	Referência
HPLC	2,1x10 ⁻⁶ – 8,4x10 ⁻²	2,5x10 ⁻⁷	OLSZEWSKA, 2008
HPLC	3,0x10 ⁻⁸ – 3,0x10 ⁻⁶	7,3x10 ⁻¹¹	KUMAR <i>et al.</i> , 2009
CE-ED (EDC)	5,0x10 ⁻⁷ – 1,0x10 ⁻³	2,2x10 ⁻⁷	CHEN, <i>et al.</i> , 2000
CE-ED (EDC)	1,0x10 ⁻⁶ – 1,0x10 ⁻⁴	4,0x10 ⁻⁷	CAO, <i>et al.</i> , 2001
CE	5,9x10 ⁻⁶ – 5,9x10 ⁻⁴	2,7x10 ⁻⁶	CAO, <i>et al.</i> , 2004
CE-ED (Eletrodo/CNT-PE)	1,0x10 ⁻⁶ – 1,0x10 ⁻³	6,6x10 ⁻⁷	XU, <i>et al.</i> , 2007
CE-ED (EDC)	1,0x10 ⁻⁶ – 1,0x10 ⁻³	4,5x10 ⁻⁶	CHEN, <i>et al.</i> , 2008 A
CE-ED (EDC)	1,0x10 ⁻⁶ – 1,0x10 ⁻³	9,0x10 ⁻⁷	CHEN, <i>et al.</i> , 2008 B
DPV (CNTPE)	1,0x10 ⁻⁷ – 1,0x10 ⁻⁶	3,0x10 ⁻⁸	HE <i>et al.</i> , 2005
DPV (CNTPE)	5,0x10 ⁻⁸ – 5,0x10 ⁻⁶	2,0x10 ⁻⁸	LIN <i>et al.</i> , 2006
SWV (GE/Nafion-CNT)	2,0x10 ⁻⁸ – 1,7x10 ⁻⁶	–	XU e KIM, 2006
SWV (GCE/CNT-β-CD)	1,5x10 ⁻⁶ – 7,5x10 ⁻⁶	–	JIN <i>et al.</i> , 2009
Cronoamperometria (GCE/HRP-β-CD-LI)	7,0x10 ⁻⁷ – 8,6x10 ⁻⁵	6,7x10 ⁻⁸	CAO <i>et al.</i> , 2011
SWV (Lac-β-CDEpi/Nujol/Ag-BMI.N(Tf) ₂ -biossensor)	1,0x10 ⁻⁷ – 6,5x10 ⁻⁶	3,9 x10 ⁻⁸	Este trabalho

LD = limite de detecção; DPV = Voltametria de pulso diferencial; EDC = eletrodo de disco de carbono; Eletrodo/CNT-PE = eletrodo contendo nanotubos de carbono e poliestireno; CNTPE = eletrodo de pasta de nanotubos de carbono; GE/Nafion-CNT = eletrodo de ouro modificado com Nafion e nanotubos de carbono; GCE/CNT-β-CD = eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono e β-ciclodextrina; GCE/HRP-β-CD-LI = eletrodo de carbono vítreo modificado com β-ciclodextrina e líquido iônico para imobilização da peroxidase.

A incorporação de diferentes materiais na modificação dos tradicionais EPC foi realizada com o intuito de melhorar a seletividade, bem como a detectabilidade e sensibilidade do método. O bom desempenho analítico do biossensor proposto pode ser atribuído à eficiência catalítica e a alta seletividade das enzimas empregadas na construção destes eletrodos, bem como à condutividade do LI em conjunto com as nanopartículas metálicas que promovem a transferência de elétrons.

6. CONCLUSÕES

No presente trabalho apresentou-se o desenvolvimento e aplicação de novos biossensores para determinação de luteolina e quercetina em amostras comerciais através de SWV.

A enzima Lac, aplicada como material biológico de reconhecimento, foi extraída da microcápsula e demonstrou estabilidade adequada durante 20-25 dias de estocagem. A modificação química da QTS e β -CD foi realizada com sucesso, e estes suportes modificados forneceram um ambiente estável para imobilização da enzima, proporcionando um maior tempo de vida útil e estabilidade ao biossensor. A incorporação das nanopartículas metálicas dispersas em LI (Ag-BMI.PF₆, Au-BMI.PF₆ e Ag-BMI.NTf₂), em proporção adequada, também colaborou para um desempenho superior aos biossensores, propiciando uma melhora significativa no sinal analítico. Este material não atuou somente como um aglutinante, também facilitou a transferência de elétrons entre a enzima e superfície do eletrodo e demonstrou ter um papel fundamental na estabilização do material biológico.

Esses biossensores (com a enzima eficientemente imobilizada e LI contendo nanopartículas metálicas) em conjunto com a técnica eletroanalítica apresentaram linearidade em um intervalo de concentração de $9,9 \times 10^{-8}$ a $5,8 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e $1,0 \times 10^{-7}$ a $6,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, baixos limites de detecção (na ordem de 10^{-8} mol L⁻¹) e elevada sensibilidade de calibração. Recuperações entre 90,0 e 105,1% (para luteolina em amostras de chá de camomila) e entre 95,0 e 102,4% (para quercetina em formulação farmacêutica e suco de maçã) demonstraram uma exatidão satisfatória dos biossensores desenvolvidos e indicam a ausência de efeitos de matriz nestas determinações. Pode-se destacar ainda que os biossensores propostos exibiram excelente seletividade, boa repetibilidade e reprodutibilidade, mínima influência devido à presença de possíveis interferentes e elevada estabilidade durante 60 dias.

Além de todas as vantagens supracitadas, o baixo custo, simplicidade e rapidez na construção e aplicação dos biossensores aliados às características da técnica de SWV, demonstram que essa metodologia é uma alternativa atraente e adequada para determinação de luteolina e quercetina em amostras comerciais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R. N.; Carbon paste electrodes. **Analytical Chemistry**, 30, 1576, 1958.
- ANDRIYKO, Y.; ANDRIIKO, A.; BABUSHKINA, O. B.; NAUER, G. E. Electrochemistry of TiF_4 in 1-butyl-2,3-dimethylimidazolium tetrafluoroborate. **Electrochimica Acta** 55, 1081–1089, 2010.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.; ROBARDS, K.; RYAN, D., Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. **Analyst** 125, 989–1009, 2000.
- AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. **Nutrition** 18, 75–81, 2002.
- BENETIS, R.; RADUSIENE, J.; JAKSTAS, V.; JANULIS, V.; PUODZIUNIENE, G.; MILASIUŠ, A. Quantitative HPLC determination of phenolic compounds in yarrow. **Pharmaceutical Chemistry Journal** 42, 153–156, 2008.
- BOURBONNAIS, R.; LEECH, D.; PAICE, M. G. Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. **Biochimica et Biophysica Acta** 1379, 381–390, 1998.
- BRETT, A. M. O.; GHICA, M.-E. Electrochemical oxidation of quercetin. **Electroanalysis** 15, 1745–1750, 2003.
- 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.
- BRONDANI, D.; DUPONT, J.; SPINELLI, A.; VIEIRA, I. C. Development of biosensor based on ionic liquid and corn peroxidase immobilized on chemically crosslinked chitin. **Sensors and Actuators B** 138, 236–243, 2009 A.
- BRONDANI, D.; SCHEEREN, C. W.; DUPONT, J.; VIEIRA, I. C. Biosensor based on platinum nanoparticles dispersed in ionic liquid and lacase for determination of adrenaline. **Sensors and Actuators B** 140,

252–259, 2009 B.

BRONDANI, D.; VIEIRA, I. C.; PIOVEZAN, C.; DA SILVA, J. M. R.; NEVES, A.; DUPONT, J.; SCHEEREN, C. W. Sensor for fisetin based on gold nanoparticles in ionic liquid and binuclear nickel complex immobilized in silica. **Analyst** 135, 1015–1022, 2010.

BUZZEO, M. C.; EVANS, R. G.; COMPTON, R. C. Non-haloaluminate room temperature ionic liquids in electrochemistry – a review. **Chemical Physics and Physical Chemistry** 5, 1106–1120, 2004.

CAL, K.; CENTKOWSKA, K. Use of cyclodextrins in topical formulations: Practical aspects. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** 68, 467–478, 2008.

CAMPBELL, F. W.; COMPTON, R. G. The use of nanoparticles in electroanalysis: an updated review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry** 396, 241–259, 2010.

CAO, Y.; ZHANG, X.; FANG, Y.; YE, J. Determination of active ingredients of apocynum venetum by capillary electrophoresis with electrochemical detection. **Mikrochimica Acta** 137, 57–62, 2001.

CAO, Y.; CHU, Q.; FANG, Y.; YE, J. Analysis of flavonoids in *Ginkgo biloba* L. and its phytopharmaceuticals by capillary electrophoresis with electrochemical detection. **Analytical & Bioanalytical Chemistry** 374, 294–299, 2002.

CAO, Y. H.; WANG, Y.; YUAN, Q. Analysis of flavonoids and phenolic acid in propolis by capillary electrophoresis. **Chromatographia** 59, 135–140, 2004.

CAO, A.; AI, H.; DING, Y.; DAI, C.; FEI, J. Biocompatible hybrid film of β -cyclodextrin and ionic liquids: A novel platform for electrochemical biosensing. **Sensors and Actuators B** 2011, DOI: 10.1016/j.snb.2011.01.022.

CASSOL, C. C.; EBELING, G.; FERRERA, B.; DUPONT, J. A simple and practical method for the preparation and purity determination of halide-free imidazolium ionic liquids. **Advanced Synthesis Catalysis**

348, 243–248, 2006.

CHEN, G.; ZHANG, H.; YE, J. Determination of rutin and quercetin in plants by capillary electrophoresis with electrochemical detection. **Analytica Chimica Acta** 423, 69–76, 2000.

CHEN, Z.; ZHANG, L.; CHEN, G. Microwave-assisted extraction followed by capillary electrophoresis-ampereometric detection for the determination of antioxidant constituents in *Folium Eriobotryae*. **Journal of Chromatography A** 1193, 178–181, 2008 A.

CHEN, Z.; ZHANG, L.; CHEN, G. Simultaneous determination of flavones and phenolic acids in the leaves of *Ricinus communis* Linn. by capillary electrophoresis with amperometric detection. **Journal of Chromatography B** 863, 101–106, 2008 B.

CHERNYSHOV, D. V.; SHVEDENE, N. V.; ANTIPOVA, E. R.; PLETNEV, I. V. Ionic liquid-based miniature electrochemical sensors for the voltammetric determination of catecholamines. **Analytica Chimica Acta** 621, 178–184, 2008.

CHUM, H. L.; KOCH, V. R.; MILLER, L. L.; OSTERYOUNG, R. A. An electrochemical scrutiny of organometallic iron complexes and hexamethylbenzene in a room temperature molten salt. **Journal of American Chemical Society** 97, 3264–3265, 1975.

CONSORTI, C. S.; de SOUZA, R. F.; DUPONT, J.; SUAREZ, P. A. Z. Líquidos iônicos contendo o cátion dialquilimidazólio: estrutura, propriedades físico-químicas e comportamento em solução. **Química Nova** 24, 830–837, 2001.

COUTO, S. R.; HERRERA, J. L. T. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. **Biotechnology Advances** 24, 500–513, 2006.

CRESPILHO, F. N.; REZENDE, M. O. O. Eletrodos de pasta de carbono modificados com ácidos húmicos: estudo e determinação de metais em meio aquoso. **Química Nova** 27, 964–969, 2007.

CRINI, G.; CONSENTINO, C.; BERTINI, S.; NAGGI, A.; TORRI, G.; VECCHI, C.; JANUS, L.; MORCELLET, M. Solid state NMR

spectroscopy study of molecular motion in cyclomaltoheptaose (β -cyclodextrin) crosslinked with epichlorohydrin. **Carbohydrate Research** 308, 37–45, 1998.

CRINI, G. Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment. **Progress in Polymer Science** 30, 38–70, 2005.

CRINI, G.; BADOT, P. M. Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: A review of recent literature. **Progress in Polymer Science** 33, 399–447, 2008.

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

DASH, P.; SCOTT, R. W. J. 1-Methylimidazole stabilization of gold nanoparticles in imidazolium ionic liquids. **Chemical Communication** 812–814, 2009.

DEL VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry** 39, 1033–1046, 2004.

DIACONU, M.; LITESCU, S. C.; RADU, G. L. Laccase–MWCNT–chitosan biosensor—A new tool for total polyphenolic content evaluation from in vitro cultivated plants. **Sensors and Actuators B** 145, 800–806, 2010.

DI FUSCO, M.; TORTOLINI, C.; DERIUA, D.; MAZZEI, F. Laccase-based biosensor for the determination of polyphenol index in wine. **Talanta** 81, 235–240, 2010.

DING, C.; ZHANG, M.; ZHAO, F.; ZHANG, S. Disposable biosensor and biocatalysis of horseradish peroxidase based on sodium alginate film and room temperature ionic liquid. **Analytical Biochemistry** 378, 32–37, 2008.

DUPONT, J.; SUAREZ, P. A. Z.; UMPIERRE, A. P.; de SOUZA, R. F. Pd(II)-dissolved in ionic liquids: a recyclable catalytic system for the

selective biphasic hydrogenation of dienes to monoenes. **Journal of the Brazilian Chemical Society** 11, 293–297, 2000.

DUPONT, J.; de SOUZA, R. F., SUAREZ, P. A. Z. Ionic liquid (molten salt) phase organometallic catalysis. **Chemical Reviews** 102, 3667–3692, 2002 A.

DUPONT, J.; FONSECA, G. S.; UMPIERRE, A. P.; FICHTNER, P. F. P.; TEIXEIRA, S. R. Transition-metal nanoparticles in imidazolium ionic liquids: recyclable catalysts for biphasic hydrogenation reactions. **Journal of American Chemical Society** 124, 4228–4229, 2002 B.

DUPONT, J.; SCHOLTEN, J. D. On the structural and surface properties of transition-metal nanoparticles in ionic liquids. **Chemical Society Reviews** 39, 1780–1804, 2010.

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.

EARLE, M. J.; SEDDON, K. R. Ionic liquids. Green solvents for the future. **Pure and Applied Chemistry** 72, 1391–1398, 2000.

FATIBELLO FILHO, O.; CAPELATO, M. D. Biossensores. **Química Nova** 15, 28–39, 1992.

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.

FERNANDES, S. C.; OSÓRIO, R. E.-M. B.; ANJOS, A.; NEVES, A.; MICKE, G. A.; VIEIRA, I. C. Determination of catechin in green tea using a catechol oxidase biomimetic sensor. **Journal of Brazilian Chemical Society** 19, 1215–1223, 2008 A.

FERNANDES, S.C.; OLIVEIRA, I.R.W.Z.; FATIBELLO FILHO, O.; SPINELLI, A.; VIEIRA, I.C., Biosensor based on laccase immobilized on microspheres of chitosan crosslinked with tripolyphosphate. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 133, p. 202–207, 2008 B.

FERNANDES, S.C.; MOCCELINI, S. K.; SCHEEREN, C. W.; MIGOWSKI, P.; DUPONT, J.; HELLER, M.; MICKE, G. A.; VIEIRA, I. C. Biosensor for chlorogenic acid based on an ionic liquid containing iridium nanoparticles and polyphenol oxidase. **Talanta** 79, 222–228, 2009.

FILIPIAK, M., Electrochemical analysis of polyphenolic compounds. **Analytical Sciences** 17, i1667–i1670, 2001.

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.

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, 973–977, 2008.

FRANZOI, A. C.; PERALTA, R. A.; NEVES, A.; VIEIRA, I. C. Biomimetic sensor based on $Mn^{III}Mn^{II}$ complex as manganese peroxidase mimetic for determination of rutin. **Talanta** 78, 221–226, 2009 A.

FRANZOI, A. C.; DUPONT, J.; SPINELLI, A.; VIEIRA, I. C. Biosensor based on laccase and an ionic liquid for determination of rosmarinic acid in plant extracts. **Talanta** 77, 1322–1327, 2009 B.

FRANZOI, A. C.; MIGOWSKI, P.; DUPONT, J.; VIEIRA, I. C. Development of biosensors containing laccase and imidazolium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ionic liquid for the determination of rutin. **Analytica Chimica Acta** 639, 90–95, 2009 C.

FRANZOI, A. C.; VIEIRA, I. C.; DUPONT, J.; SCHEEREN, C. W.; de OLIVEIRA, L. F. Biosensor for luteolin based on silver or gold nanoparticles in ionic liquid and laccase immobilized in chitosan modified with cyanuric chloride. **Analyst** 134, 2320–2328, 2009 D.

FRANZOI, A. C.; VIEIRA, I. C.; DUPONT, J. Biosensors of laccase based on hydrophobic ionic liquids derived from imidazolium cation. **Journal of Brazilian Chemical Society** 21, 1451–1458, 2010 A.

FRANZOI, A. C.; VIEIRA, I. C.; SCHEEREN, C. W.; DUPONT, J. Development of quercetin biosensor through Immobilizing laccase in a modified β -cyclodextrin matrix containing Ag nanoparticles in ionic liquid. **Electroanalysis** 22, 1376–1385, 2010 B.

FRANZOI, A. C.; BRONDANI, D.; ZAPP, E.; MOCCELINI, S. K.; FERNANDES, S. C.; VIEIRA, I. C.; DUPONT, J. Incorporação de líquidos iônicos e nanopartículas metálicas na construção de sensores eletroquímicos. **Química Nova** 2011, aceito para publicação.

GALE, R. J.; GILBERT, B.; OSTERYOUNG, R. A. Raman spectra of molten aluminum chloride: 1-butylpyridinium chloride systems at ambient temperatures. **Inorganic Chemistry** 17, 2728–2729, 1978.

GHILANE, J.; MARTIN, P.; FONTAINE, O.; LACROIX, J.-C.; RANDRIAMAHAZAKA, H. Modification of carbon electrode in ionic through the reduction of phenyl diazonium salt. Electrochemical evidence in ionic liquid. **Electrochemistry Communications** 10, 1060–1063, 2008.

GOLEDZINOWISKI, M.; BIRSS, V. I.; GALUSZKA, J. Oligomerization of low molecular weight olefins in ambient temperature molten salt. **Industrial & Engineering Chemistry Research** 32, 1795–1796, 1993.

GRIESHABER, D.; MACKENZIE, R.; VÖROS, J.; REIMHULT, E. Electrochemical biosensors - sensor principles and architecture. **Sensors** 8, 1400–1458, 2008.

GUO, S. J.; WANG, E. Synthesis and electrochemical applications of gold nanoparticles. **Analytica Chimica Acta** 598, 181–192, 2007

HAKULINEN, N.; KRUIUS, K.; KOIVULA, A.; ROUVINEN, J., A crystallographic and spectroscopic study of the effect of X-ray radiation on the crystal structure of *Melanocarpus albomyces* laccase. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 350, 929–934, 2006.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A., Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry** 55, 481–504, 2000.

HASSAN, H. N. A.; BARSOUM, B. N.; HABIB, I. H. I. Simultaneous spectrophotometric determination of rutin, quercetin and ascorbic acid in drugs using a Kalman Filter approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 20, 315–320, 1999.

HAYASHI, K.; NEMOTO, Y.; AKUTO, K.; SAKURAI, Y. Alkylated imidazolium salt electrolyte for lithium cells. **Journal of Power Sources** 146, 689–692, 2005.

HOWARTH, J.; HANLON, K.; FAYNE, D.; McCORMAC, P. Moisture stable dialkylimidazolium salts as heterogeneous and homogeneous lewis acids in the Diels-Alder reaction. **Tetrahedron Letters** 38, 3097–3100, 1997.

HE, J.-B.; LIN, X.-Q.; PAN, J. Multi-wall carbon nanotube paste electrode for adsorptive stripping determination of quercetin: a comparison with graphite paste electrode via voltammetry and chronopotentiometry. **Electroanalysis** 17, 1681–1686, 2005.

HOFFMANN-RIBANI, R.; HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Flavonols in fresh and processed Brazilian fruits. **Journal of Food Composition and Analysis** 22, 263–268, 2009.

HUBER, L. S.; HOFFMANN-RIBANI, R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Quantitative variation in Brazilian vegetable sources of flavonols and flavones. **Food Chemistry** 113, 1278–1282, 2009.

IGNATOV, S.; SHISHNIASHVILI, D.; GE, B; SCHELLER, F.W.; LISDAT, F. Amperometric biosensor based on a functionalized gold electrode for the detection of antioxidants **Biosensors & Bioelectronics** 17, 191–199, 2002.

JIANRONG C.; YUQING M.; NONGYUE H.; XIAOHUA, W.; SIJIAO, L. Nanotechnology and biosensors. **Biotechnology Advances** 22, 505–518, 2004.

JIN, J.-H.; KIM, H.; JUNG, S. Electrochemical selectivity enhancement

by using monosuccinyl β -cyclodextrin as a dopant for multi-wall carbon nanotube-modified glassy carbon electrode in simultaneous determination of quercetin and rutin. **Biotechnology Letters** 31, 1739–1744, 2009.

KALCHER, K.; KAUFFMANN, J.-M.; WANG, J.; ŠVANCARA, I.; VYTRÁS, K.; NEUHOLD, C.; YANG, Z. Sensors based on carbon paste in electrochemical analysis: A review with particular emphasis on the period 1990–1993. **Electroanalysis** 7, 5–22, 1995.

KOSSEVA, M. R.; PANESAR, P. S.; KAUR, G.; KENNEDY, J.F. Use of immobilised biocatalysts in the processing of cheese whey. **International Journal of Biological Macromolecules** 45, 437–447, 2009.

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

KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive & Functional Polymers** 46, 1–27, 2000.

KUMAR, A.; MALIK, A. K.; TEWARY, D. K. A new method for determination of myricetin and quercetin using solid phase microextraction–high performance liquid chromatography–ultra violet/visible system in grapes, vegetables and red wine samples. **Analytica Chimica Acta** 631, 177–181, 2009.

LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Química Nova** 32, 672–678, 2009.

LEE, J. K.; KIM, S. Y.; KIM, Y. S.; LEE, W.-H.; HWANG D. H.; LEE, J. Y. Suppression of the TRIF-dependent signaling pathway of Toll-like receptors by luteolin. **Biochemical Pharmacology** 77, 1391–1400, 2009.

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

LEWANDOWSKI, A.; ŚWIDERSKA-MOCEK, A. Ionic liquids as

electrolytes for Li-ion batteries—an overview of electrochemical studies. **Journal of Power Sources** 194, 601–609, 2009.

LI, L.; JIANG, H.; WU, H.; ZENG, S. Simultaneous determination of luteolin and apigenin in dog plasma by RP-HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 37, 615–620, 2005.

LI, L. P.; JIANG, H. D. Determination and assay validation of luteolin and apigenin in human urine after oral administration of tablet of *Chrysanthemum morifolium* extract by HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 41, 261–265, 2006.

de LIMA, F.; LUCCA, B. G.; BARBOSA, A. M. J.; FERREIRA, V. S.; MOCCELINI, S. K.; FRANZOI, A. C.; VIEIRA, I. C. Biosensor based on pequi polyphenol oxidase immobilized on chitosan crosslinked with cyanuric chloride for thiodicarb determination. **Enzyme and Microbial Technology** 47, 153–158, 2010.

LIN, X.-Q.; HE, J.-B.; ZHA, Z.-G. Simultaneous determination of quercetin and rutin at a multi-wall carbon-nanotube paste electrodes by reversing differential pulse voltammetry. **Sensors and Actuators B** 119, 608–614, 2006.

LIU, J.-F.; JÖNSSON, J.A.; JIANG, G.-B. Application of ionic liquids in analytical chemistry. **Trends in Analytical Chemistry** 24, 20–27, 2005 A.

LIU, H.; HE, P.; LI, Z.; SUN, C.; SHI, L.; LIU, Y.; ZHU, G.; LI, J. An ionic liquid-type carbon paste electrode and its polyoxometalate-modified properties. **Electrochemistry Communications** 7, 1357-1363, 2005 B.

LIU, H.; HE, P.; LI, Z.; LIU, Y.; LI, J. A novel nickel-based mixed rare-earth oxide/activated carbon supercapacitor using room temperature ionic liquid electrolyte. **Electrochimica Acta** 51, 1925-1931, 2006.

LOPES, E. C. N.; SOUSA, K. S.; AIROLDI, C. Chitosan–cyanuric chloride intermediary as a source to incorporate molecules – Thermodynamic data of copper/biopolymer interactions. **Thermochimica Acta** 483, 21–28, 2009.

LUAN, L.-J.; GAN, F.-P.; WU, Y.-J. Simultaneous determination of three flavonoids in rat plasma by RP-LC after oral administration of the total flavonoids of *Scutellaria barbata*. **Chromatographia** 68, 823–828, 2008.

MAGUERROSKI, K. S.; FERNANDES, S. C.; FRANZOI, A. C.; VIEIRA, I. C. Pine nut peroxidase immobilized on chitosan crosslinked with citrate and ionic liquid used in the construction of a biosensor. **Enzyme and Microbial Technology** 44, 400–405, 2009.

MALEKI, N.; SAFAVI, A.; TAJABADI, F. High-performance carbon composite electrode based on an ionic liquids as a binder. **Analytical Chemistry** 78, 3820–3826, 2006.

MALEKI, N.; SAFAVI, A.; TAJABADI, F., Investigation of the role of ionic liquids in imparting electrocatalytic behavior to carbon paste electrode. **Electroanalysis** 19, 2247–2250, 2007.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme Microbial Technology** 40, 1451–1463, 2007.

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

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.

MERKOÇI, A. Nanobiomaterials in electroanalysis. **Electroanalysis** 19, 739–741, 2007.

MIEAN, K. H.; MOHAMED, S. Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 49, 3106–3112, 2001.

MIGOWSKI, P.; DUPONT, J. Catalytic applications of metal nanoparticles in imidazolium ionic liquids. **Chemistry European Journal** 13, 32–39, 2007.

MIKKELSEN, S. R.; CORTÓN, E. **Bioanalytical Chemistry**. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2004. 375 p.

MINUSSI, R.C.; PASTORE, G.M.; DURÁN, N., Potential applications of laccase in the food industry. **Trends in Food Science & Technology** 13, 205–216, 2002.

MOCCELINI, S. K.; SPINELLI, A.; VIEIRA, I. C. Biosensors based on bean sprout homogenate immobilized in chitosan microspheres and silica for determination of chlorogenic acid. **Enzyme and Microbial Technology** 43, 381–387, 2008.

MONIRUZZAMAN, M.; NAKASHIMA, K.; KAMIYA, N.; GOTO, M. Recent advances of enzymatic reactions in ionic liquids. **Biochemical Engineering Journal** 48, 295–314, 2010.

MUSAMEH, M. M.; KACHOOSANGI, R. T.; COMPTON, R. G. Enhanced stability and sensitivity of ionic liquid-carbon paste electrodes at elevated temperatures. **Analyst** 133, 133–138, 2008.

MUSAMEH, M. M.; WANG, J. Sensitive and stable amperometric measurements at ionic liquid-carbon paste microelectrodes. **Analytica Chimica Acta** 606, 45–49, 2008.

NILADEVI, K. N.; PREMA, P. Immobilization of laccase from *Streptomyces psammoticus* and its application in phenol removal using packed bed reactor. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 24, 1215–1222, 2008.

OGOSHI, T.; HARADA, A. Chemical sensors based on cyclodextrin derivatives. **Sensors** 8, 4961–4982, 2008.

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.

OLSZEWSKA, M. Separation of quercetin, sexangularetin, kaempferol and isorhamnetin for simultaneous HPLC determination of flavonoid aglycones in inflorescences, leaves and fruits of three *Sorbus* species. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 48, 629–635,

2008.

O'MAHONY, A. M.; SILVESTER, D. S.; ALDOUS, L.; HARDACRE, C.; COMPTON, R. G. Effect of water on the electrochemical window and potential limits of room-temperature ionic liquids. **Journal of Chemical & Engineering Data** 53, 2884–2891, 2008.

OZMEN, E. Y.; SEZGIN, M.; YILMAZ, M. Synthesis and characterization of cyclodextrin-based polymers as a support for immobilization of *Candida rugosa* lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** 57, 109–114, 2009 A.

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.

PEJIC, N.; KUNTIC, V.; VUJIC, Z.; MICIC, S. Direct spectrophotometric determination of quercetin in the presence of ascorbic acid. **IL FARMACO** 59, 21–24, 2004.

PENG, J.-F.; LIU, J.-F.; HU, X.-L.; JIANG, G.-B. Direct determination of chlorophenols in environmental water samples by hollow fiber supported ionic liquid membrane extraction coupled with high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A** 1139, 165–170, 2007.

PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. S.; KUBOTA, L. T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações analíticas. **Química Nova** 25, 1012–1021, 2002.

PERSSON, M.; BORNSCHEUER, U. T., Increased stability of an esterase from *Bacillus stearothermophilus* in ionic liquids as compared to organic solvents. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** 22, 21–27, 2003.

PINGARRÓN, J. M.; YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; GONZÁLEZ-CORTÉS. Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. **Electrochimica Acta** 53, 5848–5866, 2008.

PINTO, L. M. A.; FRACETO, L. F. SANTANA, M. H. A.; PERTINHEZ, T. A.; OYAMA JR., S.; de PAUL, E. Physico-chemical

characterization of benzocaine- β -cyclodextrin inclusion complexes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 39, 956–963, 2005.

PIONTEK, K.; ANTORINI, M.; CHOINOWSKI, T. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *Journal of Biological Chemistry* 277, 37663–37669, 2002.

QUEIROZ, M. B. R. **Desenvolvimento e estudo da estabilidade de gel com extrato de *Matricaria recutita* L. e avaliação da atividade antiinflamatória tópica comparada com gel de diclofenaco sódico.** 2008. 121p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília – DF, 2008.

RAMÍREZ-BERRIOZABAL, M.; GALICIA, L.; GUTIÉRREZ-GRANADOS, S.; CORTES, J. S.; HERRASTI, P. selective electrochemical determination of uric acid in the presence of ascorbic acid using a carbon paste electrode modified with β -cyclodextrin. *Electroanalysis* 20, 1678–1683, 2008.

van RANTWIJK, F.; SHELDON, R. A. Biocatalysis in ionic liquids. *Chemical Reviews* 107, 2757–2785, 2007.

REDEL, E.; THOMANN, E.; JANIAC, C. First correlation of nanoparticle size-dependent formation with the ionic liquid anion molecular volume. *Inorganic Chemistry* 47, 14–16, 2008

REN, X.; CHEN, D.; MENG, X.; TANG, F.; DU, A.; ZHANG, L. Amperometric glucose biosensor based on a gold nanorods/cellulose acetate composite film as immobilization matrix. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 72, 188–192, 2009.

ROA-MORALES, G.; RAMÍREZ-SILVA, M. T.; GONZÁLEZ, R. L.; GALICIA, L.; ROMO, R. Electrochemical characterization and determination of mercury using carbon paste electrodes modified with cyclodextrins. *Electroanalysis* 17, 695–700, 2005.

ROBINSON, J.; OSTERYOUNG, R. A. An electrochemical and spectroscopic study of some aromatic hydrocarbons in the room

temperature molten salt system aluminum chloride-*n*-butylpyridinium chloride. **Journal of American Chemical Society** 101, 323–327, 1979.

RIVA, S. Laccases: blue enzymes for green chemistry. **TRENDS in Biotechnology** 24, 219–226, 2006.

ROBARDS, K.; ANTOLOVICH, M, Analytical chemistry of fruit bioflavonoids: A review. **Analyst** 122, 11R–34R, 1997.

ROBARDS, K. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. **Journal of Chromatography A** 1000, 657–691, 2003.

ROMO, A.; PENÑAS, F. J.; ISASI, J. R.; GARCÍA-ZUBIRI, I. X.; GONZÁLEZ-GAITANO, G. Extraction of phenols from aqueous solutions by β -cyclodextrin polymers. Comparison of sorptive capacities with other sorbents. **Reactive & Functional Polymers** 68, 406–413, 2008.

SAFAVI, A.; MALEKI, N.; MORADLOU, O.; TAJABADI, F. Simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid, and uric acid using carbon ionic liquid electrode. **Analytical Biochemistry** 359, 224–229, 2006.

SAFAVI, A.; MALEKI, N.; TAJABADI, F. Highly stable electrochemical oxidation of phenolic compounds at carbon ionic liquid electrode. **Analyst** 132, 54–58, 2007.

SANTHIAGO, M.; VIEIRA, I. C. L-Cysteine determination in pharmaceutical formulations using a biosensor based on laccase from *Aspergillus oryzae*. **Sensors and Actuators B** 128, 279–285, 2007.

SANZ, V. C.; MENA, M. L.; GONZÁLEZ-CORTÉS, A.; YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; PINGARRÓN, J. M. Development of a tyrosinase biosensor based on gold nanoparticles-modified glassy carbon electrodes. Application to the measurement of a bioelectrochemical polyphenols index in wines. **Analytica Chimica Acta** 528, 1–8, 2005.

SCHEEREN, C. W.; DOMINGOS, J. B.; MACHADO, G.; DUPONT, J. Hydrogen reduction of Adams' catalyst in ionic liquids: formation and stabilization of Pt(0) nanoparticles. **Journal of Physical Chemistry C**

112, 16463–16469, 2008.

SHANGGUAN, X.; ZHANG, H.; ZHENG, J. Direct electrochemistry of glucose oxidase based on its direct immobilization on carbon ionic liquid electrode and glucose sensing. **Electrochemistry Communications** 10, 1140–1143, 2008.

SHARIFI, A.; BARAZANDEH, M.; ABAEE, M. S.; MIRZAEI, M. [Omim][BF₄], a green and recyclable ionic liquid medium for the one-pot chemoselective synthesis of benzoxazinones. **Tetrahedron Letters** 51, 1852–1855, 2010.

SHIDDIKY, M. J. A.; TORRIERO, A. A. J. Application of ionic liquids in electrochemical sensing systems. **Biosensors and Bioelectronics** 26, 1775–1787, 2011.

SHIJU, N. R.; GULIANTS, V. V. Recent developments in catalysis using nanostructured materials. **Applied Catalysis A: General** 356, 1–17, 2009.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5.ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836 p.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. 8.ed. São Paulo: Cengage Learning, 2008. 999 p.

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

SUN, W.; YANG, M.; JIAO, K. Electrocatalytic oxidation of dopamine at an ionic liquid modified carbon paste electrode and its analytical application. **Analytical & Bioanalytical Chemistry** 389, 1283–1291, 2007.

SUN, W.; LI, Y.; YANG, M. LI, J.; JIAO, K. Application of carbon ionic liquid electrode for the electrooxidative determination of catechol. **Sensors and Actuators B: Chemical** 133, 387–392, 2008 A.

SUN, W.; JIANG, Q.; YANG, M.; JIAO, K., Electrochemical behaviors

of hydroquinone on a carbon paste electrode with ionic liquid as binder. **Bulletin of the Korean Chemical Society** 29, 915–920, 2008 B.

SUN, W.; LI, Y.; YANG, M.; LIU, S.; JIAO, K. Direct electrochemistry of single-stranded DNA on an ionic liquid modified carbon paste electrode. **Electrochemistry Communications** 10, 298–301, 2008 C.

SUN, G.; LI, K.; SUN, C. Electrochemical performance of electrochemical capacitors using Cu(II)-containing ionic liquid as the electrolyte. **Microporous and Mesoporous Materials** 128, 56–61, 2010.

SUN, W.; QIN, P.; ZHAO, R.; JIAO, K. Direct electrochemistry and electrocatalysis of hemoglobin on gold nanoparticle decorated carbon ionic liquid electrode. **Talanta** 80, 2177–2181, 2010.

ŠVANCARA, I.; SCHACHL, K. Testing of unmodified carbon paste electrodes. **Chemické Listy** 93, 490–499, 1999.

ŠVANCARA, I.; VYTRÁS, K.; BAREK, J.; ZIMA, J., Carbon paste electrodes in modern electroanalysis. **Critical Reviews in Analytical Chemistry** 31, 311–345, 2001.

ŠVANCARA, I.; VYTRÁS, K.; KALCHER, K.; WALCARIUS, A.; WANG, J. Carbon paste electrodes in facts, numbers, and notes: a review on the occasion of the 50-years jubilee of carbon paste in electrochemistry and electroanalysis. **Electroanalysis** 21, 7–28, 2009 A.

ŠVANCARA, I.; WALCARIUS, A.; KALCHER, K.; VYTRÁS, K. Carbon paste electrodes in the new millennium. **Central European Journal of Chemistry** 7, 598–656, 2009 B.

VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**. New York: John Wiley & Sons Inc., 1990. 1223p.

XU, G.-R.; KIM, S. Selective determination of quercetin using carbon nanotube-modified electrodes. **Electroanalysis** 18, 1786–1792, 2006.

XU, J.; ZHANG, H.; CHEN, G. Carbon nanotube/polystyrene composite electrode for microchip electrophoretic determination of rutin

and quercetin in Flos Sophorae Immaturus. **Talanta** 73, 932–937, 2007.

ZHANG, Y.; ZHENG, J. B. Comparative investigation on electrochemical behavior of hydroquinone at carbon ionic liquid electrode, ionic liquid modified carbon paste electrode and carbon paste electrode. **Electrochimica Acta** 52, 7210–7216, 2007.

ZHANG, X.; GUO, Q.; CUI, D. Recent advances in nanotechnology applied to biosensors. **Sensors**, 9, 1033–1053, 2009.

ZHAO, H.; MALHOTRA, S. V. Applications of ionic liquids in organic synthesis. **Aldrichimica Acta** 35, 75–83, 2002.

ZHAO, D.; ZHAO, L.; ZHU, C.; TIAN, Z.; SHEN, X. Synthesis and properties of water-insoluble β -cyclodextrin polymer crosslinked by citric acid with PEG-400 as modifier. **Carbohydrate Polymers** 78, 125–130, 2009.

ZHENG, J.; ZHANG, Y.; YANG, P. An ionic liquid-type carbon paste electrode for electrochemical investigation and determination of calcium dobesilate. **Talanta** 73, 920–925, 2007.

ZHOU, Y. Recent advances in ionic liquids for synthesis of inorganic nanomaterials. **Current Nanoscience**, 1, 35–42, 2005.

ZHU, M.; HAN, S.; YUAN, S. β -Cyclodextrin polymer as the immobilization matrix for peroxidase and mediator in the fabrication of a sensor for hydrogen peroxide. **Journal of Electroanalytical Chemistry** 480, 255–261, 2000.

WACH, A.; PYRZYŃSKA, K.; BIESAGA, M. Quercetin content in some food and herbal samples. **Food Chemistry** 100, 699–704, 2007.

WANG, F.; HU, S. Electrochemical sensors based on metal and semiconductor nanoparticles. **Microchimica Acta** 165, 1–22, 2009.

WEI, D.; IVASKA, A. Applications of ionic liquids in electrochemical sensors. **Analytica Chimica Acta** 607, 126–135, 2008.

WIDSTEN, P.; KANDELBAUER, A. Laccase applications in the forest

products industry: A review. **Enzyme and Microbial Technology** 42, 293–307, 2008.

WILKES, J. S.; LEVISKY, J. A.; WILSON, R. A.; HUSSEY, C. L. Dialkylimidazolium chloroaluminate melts: a new class of a room-temperature ionic liquids for electrochemistry, spectroscopy and synthesis. **Inorganic Chemistry** 21, 1263–1264, 1982.

WILKES, J. S.; ZAWOROTKO, M. J., Air and water stable 1-ethyl-3-methylimidazolium based ionic liquids. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications** 965–967, 1992.

WU, Z.; ZHAO, F.; VARCOE, J. R.; THUMSER, A. E.; AVIGNONE-ROSSA, 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.

YANG, Z.; PAN, W., Ionic liquids: green solvents for nonaqueous biocatalysis. **Enzyme and Microbial Technology** 37, 19–28, 2005.

YIN, R.; CHEN, X.; HAN, F.; SHEN, Z.; CHENG, W.; BI, K. LC-MS determination and pharmacokinetic study of luteolin-7-*O*- β -D-glucoside in rat plasma after administration of the traditional chinese medicinal preparation kudiezi injection. **Chromatographia** 67, 961–965, 2008.

YUAN, R.; LIU, Y.; LI, Q.-F.; CHAI, Y.-Q.; MO, C.-L.; ZHONG, X.; TANG, D.-P.; DAI, J.-Y. Electrochemical characteristics of a platinum electrode modified with a matrix of polyvinyl butyral and colloidal Ag containing immobilized horseradish peroxidase. **Analytical and Bioanalytical Chemistry** 381, 762–768, 2005.

