



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

VINICIUS JOSÉ DA SILVA

**SENSOR ELETROQUÍMICO PARA DETERMINAÇÃO DE ESCULETINA
BASEADO EM NANOCOMPÓSITO CONSTITUÍDO DE GRAFENO E
NANOPARTÍCULAS DE OURO ESTABILIZADAS EM HEPARINA**

Florianópolis

2023

Vinicius José da Silva

**SENSOR ELETROQUÍMICO PARA DETERMINAÇÃO DE ESCULETINA
BASEADO EM NANOCOMPÓSITO CONSTITUÍDO DE GRAFENO E
NANOPARTÍCULAS DE OURO ESTABILIZADAS EM HEPARINA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Profª. Dra. Iolanda da Cruz Vieira

Florianópolis

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Silva, Vinícius José da

Sensor eletroquímico para determinação de esculetina baseado em nanocompósito de grafeno e nanopartículas de ouro estabilizadas em heparina / Vinícius José da Silva ; orientadora, Iolanda da Cruz Vieira, 2023.
69 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Química. 2. Esculetina. 3. Nanopartículas de ouro. 4. Heparina. 5. Voltametria de Onda Quadrada. I. Vieira, Iolanda da Cruz. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Vinicius José da Silva

**SENSOR ELETROQUÍMICO PARA DETERMINAÇÃO DE ESCULETINA
BASEADO EM NANOCOMPÓSITO CONSTITUÍDO DE GRAFENO E
NANOPARTÍCULAS DE OURO ESTABILIZADAS EM HEPARINA**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado, em 27 de fevereiro de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Almir Spinelli, Dr.

UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Eduardo Zapp, Dr.

UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina – Campus Blumenau

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Química.

Prof. Giovanni Finoto Caramori, Dr.

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Química

Profa. Iolanda da Cruz Vieira, Dra.

Orientadora

Florianópolis, 2023.

Dedico esta dissertação aos meus pais,
José e Roselâne, e ao meu namorado Rafael.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente aos meus pais, José e Roselâne, por sempre terem me apoiado nos estudos e são meus maiores incentivadores desde a graduação.

Ao meu namorado Rafael pelo incentivo, amor e compreensão.

À Prof^a Dr^a Iolanda da Cruz Vieira pela orientação, pelo incentivo e pela paciência em todos os momentos no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Biossensores (LaBios): João, Edinho, Aline, Luan, Emanuela, Nathalia, Guinther e Pãmyla pela amizade, auxílio e contribuição.

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC (LCME-UFSC) e à Dra. Juliana Dreyer por realizar a análise das amostras.

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e a todos os professores do Departamento de Química que de alguma forma contribuíram para a minha formação.

Aos professores Almir Spinelli e Eduardo Zapp por aceitarem fazer parte da banca examinadora.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao CNPq pelo suporte financeiro.

Realmente, o mundo está cheio de perigos, mas ainda há muita coisa bonita, e embora atualmente o amor e a tristeza estejam misturados em todas as terras, talvez o primeiro ainda cresça com mais força. (TOLKIEN, 1954)

RESUMO

Este trabalho descreve o desenvolvimento e a caracterização de um sensor a partir da modificação de um eletrodo de carbono vítreo (GCE) com um nanocompósito constituído de grafeno e nanopartículas de ouro estabilizadas em heparina (AuNP-Hep-Gr) para a determinação de esculetina (ESC). As AuNPs estabilizadas em heparina foram caracterizadas por espectroscopia UV-Vis e microscopia eletrônica de transmissão. As diferentes proporções de grafeno (Gr) junto à suspensão de AuNP-Hep foram avaliadas e os eletrodos modificados a partir de cada proporção foram caracterizados por espectroscopia de impedância eletroquímica e voltametria cíclica. O comportamento eletroquímico da ESC foi estudado na presença das diferentes arquiteturas eletródicas contendo Gr e AuNP-Hep. Observou-se a oxidação da ESC em +0,61 V e redução em +0,58 V (*vs.* Ag/AgCl), a reação de oxirredução ocorreu com a transferência de dois mols de prótons e dois mols de elétrons por mol de ESC. Usando parâmetros otimizados da voltametria de onda quadrada foi obtida a curva de calibração com faixa linear de 0,1 a 20,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($R^2 = 0,992$), com limite de detecção e quantificação de 46,0 e 140,0 nmol L^{-1} , respectivamente. O eletrodo AuNP-Hep-Gr/GCE apresentou resultados satisfatórios para a repetibilidade e estabilidade, ainda que interferências tenham sido observadas na presença de grandes concentrações de ácido ascórbico ou quercetina. Este sensor foi aplicado com sucesso na determinação e recuperação de ESC em amostras de geleia de amora e chá preparados a partir de pó de folhas e chá comercial de amora branca.

Palavras-chave: Esculetina, nanopartículas de ouro, grafeno, heparina, voltametria de onda quadrada.

ABSTRACT

This work describes the development and characterization of a sensor based on the modification of a glassy carbon electrode (GCE) with a nanocomposite consisting of graphene and gold nanoparticles stabilized in heparin (AuNP-Hep-Gr) for the determination of esculetin (ESC). AuNPs stabilized in heparin were characterized by UV-Vis spectroscopy and transmission electron microscopy. The different proportions of graphene (Gr) decorated to AuNP-Hep were evaluated and characterized by electrochemical impedance spectroscopy and cyclic voltammetry. The electrochemical behavior of ESC was studied in the presence of different electrode architectures containing Gr and AuNP-Hep. ESC oxidation was observed at +0.61 V and reduction at +0.58 V (vs. Ag/AgCl), the redox reaction occurred with the transfer of two moles of protons and two moles of electrons per mole of ESC. Using optimized parameters of square wave voltammetry, a calibration curve was obtained with a linear range from 0.1 to 20.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($R^2 = 0.992$), with a detection and quantification limit of 46.0 and 140.0 nmol L^{-1} , respectively. The AuNP-Hep-Gr/GCE electrode showed satisfactory results for repeatability and stability, although interferences were observed in the presence of high concentrations of ascorbic acid or quercetin. This sensor was successfully applied in the determination and recovery of ESC in samples of blackberry jam and tea prepared from white blackberry leaf powder and commercial tea.

Keywords: Esculetin, gold nanoparticles, graphene, heparin, square wave voltammetry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura de esculetina (6,7-di-hidroxicumarina)	19
Figura 2 – Esquema simplificado da esculetina no organismo	21
Figura 3 – Imagens de TEM de AuNP com diferentes morfologias: (A) esférica, (B) cúbica, (C) em formato de estrela, (D) bastão e (E) bipiramidal.....	26
Figura 4 – Representação do dissacarídeo majoritário da heparina.....	27
Figura 5 – Esquema da preparação das nanopartículas de ouro utilizando heparina como estabilizante e borohidreto de sódio como agente redutor.....	32
Figura 6 – Espectro de absorção UV-Vis da solução de (a) H ₂ AuCl ₄ e da dispersão de (b) AuNP-Hep.....	35
Figura 7 – Imagens de TEM com diferentes ampliações (A)100, (B)500 e (C)1000 x; (D) Histograma de distribuição do tamanho das AuNP-Hep.....	36
Figura 8 – Imagens de TEM de folhas de grafeno em heparina com diferentes ampliações (A) 50 e (B) 500 x.....	37
Figura 9 – (A-C) Imagens de TEM de AuNP-Hep-Gr com diferentes ampliações; (D) Histograma de distribuição do tamanho das nanopartículas estabilizadas em heparina na presença de grafeno.....	38
Figura 10 – (A) Circuito de Randles; (B) EIS para (a) GCE; (b) AuNP-Hep/GCE e (c) AuNP-Hep-Gr/GCE utilizando [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} 5,0 mmol L ⁻¹ em KCl 0,1 mol L ⁻¹ em faixa de frequência que compreende de 0,1 a 100.000 Hz; (C) Voltametria cíclica em sistema [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} 5,0 mmol L ⁻¹ em KCl 0,1 mol L ⁻¹ com (a) GCE; (b) AuNP-Hep/GCE e (c) AuNP-Hep-Gr/GCE.....	39
Figura 11 – (A) Espectroscopia de impedância eletroquímica referente a (a) 0,5; (b) 1,0; (c) 1,5 e (d) 2,0 mg de grafeno utilizando [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} 5,0 mmol L ⁻¹ em KCl 0,1 mol L ⁻¹ em faixa de frequência que compreende de 0,1 a 100.000 Hz; (B) Gráfico de barras representando as resistências das diferentes proporções de Gr; (C) Voltametria cíclica referente a (a) 0,5; (b) 1,0; (c) 1,5 e (d) 2,0 mg de grafeno utilizando [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} 5,0 mmol L ⁻¹ em KCl 0,1 mol L ⁻¹	41
Figura 12 – Voltamogramas cíclicos para eletrodos AuNP-Hep-Gr/GCE com diferentes massas de Gr (a) 0,5, (b) 1,0, (c) 1,5 e (d) 2,0 mg em solução tampão BR (0,1 mol L ⁻¹ ; pH 2,0) com esculetina (25,0 μmol L ⁻¹) e registrados a 100 mVs ⁻¹	42

Figura 13 – Voltamogramas cíclicos para a esculetina ($25,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) registrados em 100 mVs^{-1} com os eletrodos: (a) GCE, (b) AuNP-Hep/GCE, (c) Hep-Gr/GCE e (d) AuNP-Hep-Gr/GCE em solução tampão B-R ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 2,0).....	43
Figura 14 – (A) Voltamogramas cíclicos gerados com uso de AuNP-Hep-Gr/GCE em diferentes valores de pH (2,0, 3,0, 4,0 e 4,5) de solução tampão B-R ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 2,0) contendo esculetina ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) e registrados a 100 mVs^{-1} e (B) Variação dos picos de (a) oxidação e (b) redução em função do pH.....	44
Figura 15 – Voltamogramas cíclicos em eletrólitos de suporte (a) B-R, (b) Fosfato e (c) Clark-Lubs de pH 2,0 e concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ na presença de esculetina ($10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) utilizando o eletrodo AuNP-Hep-Gr/GCE	45
Figura 16 – (A) Voltamogramas cíclicos com velocidades de varredura entre 30 e 150 mVs^{-1} , solução tampão B-R ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 2,0) e ESC ($7,2 \mu\text{mol L}^{-1}$); (B) Gráfico $\log I_{po}$ vs. $\log v$	46
Figura 17 – Representação do processo redox da esculetina na superfície do eletrodo modificado AuNP-Hep-Gr/GCE.....	47
Figura 18 – Comparação da intensidade de corrente adquirida empregando (a) LSV, (b) DPV e (c) SWV em solução tampão B-R ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 2,0) com esculetina ($0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$).....	48
Figura 19 – Voltamogramas de onda quadrada com as variações dos parâmetros (A) Frequência, (B) Amplitude e (C) Incremento.....	49
Figura 20 – (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando os parâmetros otimizados com as seguintes concentrações de esculetina: (a) 0,1; (b) 0,2; (c) 0,298; (d) 0,396; (e) 0,495; (f) 0,592; (g) 0,787; (h) 1,11; (i) 2,74; (j) 7,00; (k) 10,1; (l) 14,3; (m) 17,4 e (n) $20,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ e (B) Curva de calibração obtida ($n = 3$).....	50
Figura 21 – Voltamograma da primeira varredura (a) e da vigésima varredura (b) utilizando AuNP-Hep-Gr/GCE em solução tampão B-R ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 2,0).....	52
Figura 22 – Gráfico de colunas representando a corrente de pico de esculetina em percentual na presença de outros compostos cinco vezes mais concentrados.....	53
Figura 23 – Voltamogramas de onda quadrada em frequência de 60 Hz, amplitude de 50 mV e incremento de 1,0 mV em solução tampão B-R ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 2,0) e curvas de	

adição de padrão das amostras de (B) chá comercial, (D) chá de pó de folhas de amora branca e (F) geleia de amora.....54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Técnicas para a determinação de esculetina e limites de detecção.....	22
Tabela 2 – Modificações empregadas em sensores para determinação de esculetina em amostras.....	24
Tabela 3 – Sensores voltamétricos contendo AuNP e materiais carbonáceos	29
Tabela 4 – Comparação de diferentes eletrodos aplicados na determinação de esculetina.....	51
Tabela 5 – Determinação e recuperação do teor de polifenóis expresso em concentração de esculetina em amostras de chá e pó de folhas de amora e geleia de amora usando AuNP-Hep-Gr/GCE (n = 3).....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE	Acetilcolinesterase
AuNP	Nanopartículas de ouro
AuNP-Hep	Nanopartículas de ouro estabilizadas em heparina
AuNP-Hep-Gr/GCE	Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de ouro estabilizadas em heparina e depositadas em grafeno
BACE1	Beta-secretase 1
BChE	Butirilcolinesterase
B-R	Solução tampão Britton-Robinson
CV	(do inglês, <i>cyclic voltammetry</i>) Voltametria Cíclica
DPV Diferencial	(do inglês, <i>differential pulse voltammetry</i>) Voltametria de Pulso
EFSA	(do inglês, <i>European Food Safety Authority</i>) Autoridade europeia para a segurança alimentar
EIS	(do inglês, <i>electrochemical impedance spectroscopy</i>) Espectroscopia de impedância eletroquímica
E_p	Potencial de pico
E_{p/2}	Potencial de meia onda
ET-G	Esculetina-7-O-glicuronídeo
F	Constante de Faraday
GCE	(do inglês, <i>glassy carbon electrode</i>) Eletrodo de Carbono Vítreo
GO	(do inglês, <i>graphene oxide</i>) Óxido de grafeno
Gr	Grafeno
HDL	(do inglês, <i>high density lipoprotein</i>) Lipoproteína de alta densidade
Hep	Heparina
HPLC	(do inglês, <i>high performance liquid chromatography</i>) Cromatografia líquida de alta eficiência
I_p	Corrente de pico

I_{pa}	Corrente de pico anódico
I_{pc}	Corrente de pico catódico
LC	(do inglês, <i>liquid chromatography</i>) – Cromatografia líquida
LDL	(do inglês, <i>low density lipoprotein</i>) – Lipoproteína de baixa densidade
LOD	(do inglês, <i>limit of detection</i>) – Limite de detecção
LOQ	(do inglês, <i>limit of quantitation</i>) – Limite de quantificação
LSV Linear	(do inglês, <i>linear sweep voltammetry</i>) – Voltametria de Varredura
R	Constante dos gases ideais
R_{ct} carga	(do inglês, <i>resistance to charge transfer</i>) – Resistência a transferência de carga
SWV	(do inglês, <i>square wave voltammetry</i>) – Voltametria de Onda Quadrada
T	Temperatura
TEM de transmissão	(do inglês, <i>transmission electron microscopy</i>) – Microscopia eletrônica
UGT1A6	UDP-glucuronosiltransferase 1-6
UGT1A9	UDP-glucuronosiltransferase 1-9
v	Velocidade varredura

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	ESCULETINA	19
2.2	MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE ESCULETINA	21
2.3	SENSORES ELETROQUÍMICOS	23
2.4	NANOPARTÍCULAS DE OURO	25
2.5	HEPARINA.....	26
2.6	GRAFENO	28
3	OBJETIVOS	30
3.1	OBJETIVO GERAL.....	30
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1	REAGENTES, SOLUÇÕES E MATERIAIS	31
4.2	SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO ESTABILIZADAS EM HEPARINA..	31
4.3	PREPARO DE SUSPENSÃO DE NANOCOMPÓSITO CONSTITUÍDO DE GRAFENO E NANOPARTÍCULAS DE OURO ESTABILIZADAS EM HEPARINA	32
4.4	PREPARAÇÃO DO SENSOR ELETROQUÍMICO.....	32
4.5	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ELETROQUÍMICA DE NANOPARTÍCULAS DE OURO ESTABILIZADAS EM HEPARINA e GRAFENO	33
4.6	PREPARO DE AMOSTRAS	34
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO ESTABILIZADAS EM HEPARINA	35
5.2	CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DE NANOPARTÍCULAS DE OURO ESTABILIZADAS EM HEPARINA E ANCORADAS EM GRAFENO.....	38
5.3	COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DA ESCULETINA	42
5.4	TÉCNICA ELETROANALÍTICA.....	47

5.5	CURVA DE CALIBRAÇÃO.....	50
5.6	CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS.....	51
5.7	ESTUDO DE INTERFERENTES	52
5.8	DETERMINAÇÃO DE ESCULETINA E ESTUDO DE RECUPERAÇÃO	53
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	56
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	57
	REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

A esculetina (ESC) é uma molécula derivada de cumarina encontrada em muitas plantas e, assim como outras hidroxycumarinas (esculina, fraxina e fraxetina) tem despertado cada vez mais atenção devido aos seus efeitos terapêuticos, que incluem propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, e benefícios para o controle de diabetes, obesidade e disfunção renal, além de inibir o crescimento de células cancerosas e prevenir doenças neurológicas (LIANG *et al.*, 2017; JEONG *et al.*, 2018).

Kwak e colaboradores (2021) e Jiao e colaboradores (2021), através de estudos farmacocinéticos, analisaram o uso de ESC como agente terapêutico a partir de administração oral, ambos os estudos demonstraram alta capacidade de adsorção e distribuição do agente no organismo, apresentando biodisponibilidade de 19%. Li e colaboradores (2022) demonstram que micelas de ESC são mais eficazes que ESC livre, apresentando biodisponibilidade três vezes maior e sendo mais efetivo no controle de doenças como hiperglicemia.

O consumo de ervas que contêm esculetina é mais comum na medicina tradicional chinesa a partir da ingestão de chás (ZUO *et al.*, 2020). No entanto, os efeitos fitoterápicos relacionados, principalmente, à esculetina, têm despertado interesse da indústria farmacêutica que vem adotando plantas comuns na medicina tradicional chinesa. Da mesma forma, aos poucos, a indústria alimentícia tem incorporado matéria-prima considerada funcional em alimentos fortificados ou enriquecidos na obtenção de nível terapêutico (CHEN *et al.*, 2021; GARCÍA-MARTÍNEZ *et al.*, 2021; POLUMACKANYCZ; WESOŁOWSKI; VIAPIANA, 2021).

Dessa forma é de suma importância o desenvolvimento de métodos analíticos simples e precisos para a determinação de esculetina nos mais diversos itens consumíveis. Viável pelo tratamento simplificado de amostras e baixa produção de resíduos, além de baixo custo e alta sensibilidade, a voltametria se sobressai quando comparada a outras técnicas analíticas.

O desenvolvimento de uma metodologia utilizando técnicas voltamétricas se baseia, muitas vezes, na modificação de um eletrodo de trabalho, normalmente de carbono vítreo (GCE – do inglês, *glassy carbon electrode*), visando maior seletividade e sensibilidade em relação a um ou mais analitos. Devido ao tamanho nanométrico, as nanopartículas de ouro (AuNP), possuem propriedades catalíticas e eletrônicas que contribuem como material modificador de um sensor eletroquímico. Entretanto, é de suma importância assegurar-se da preservação do tamanho das nanopartículas com o emprego de um agente estabilizante, como a heparina,

durante a síntese, impedindo, assim, a coalescência através dos efeitos eletrostáticos e estéricos, promovidos pela extensa cadeia do polissacarídeo e pelas cargas negativas distribuídas ao longo da cadeia. Propondo a formação de um nanocompósito carbonáceo, o grafeno se torna uma opção viável por sua extensa área superficial e excelente condutividade elétrica, aumentando, assim, a sensibilidade do sensor.

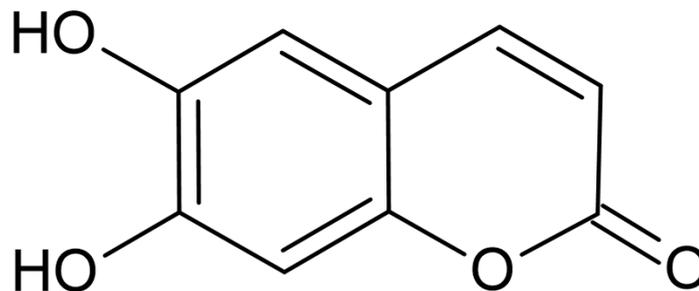
Dessa forma, o presente trabalho tem como proposta o desenvolvimento de uma metodologia para determinação de esculetina em amostras de chá e pó de folhas de amora branca (*Morus Alba*) e geleia de amora através da modificação de um eletrodo de carbono vítreo com nanocompósito constituído de grafeno e nanopartículas de ouro estabilizadas em heparina (AuNP-Hep-Gr/GCE).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ESCULETINA

A ESC pertence ao grupo de compostos fenólicos conhecido como benzo- α -pironas e possui dois grupos hidroxil nos carbonos 6 e 7, como mostra a Figura 1, responsáveis pela atividade antioxidante e fotoprotetora (ANTHONY *et al.*, 2012; REHMAN *et al.*, 2015). É encontrada, principalmente, em cascas, folhas ou raízes de plantas como *Citrus limonia*, *Matricaria chamomilla*, *Morus Alba*, *Ipomea batatas*, *Ocimum basilicum*, *Anethum graveolens*, *Radicula armoracia*, *Foeniculum vulgare*, *Plantago major*, *Aesculus hippocastanum* e *Salvia officinalis*, além de outras plantas associadas, principalmente, à medicina tradicional oriental (KIM *et al.*, 2014; MATOS *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2020; ALAM *et al.*, 2022; KARNEWAR *et al.*, 2022; ZHANG; XIE; LI, 2022).

Figura 1 - Estrutura de esculetina (6,7-di-hidroxicumarina).



Fonte: O autor.

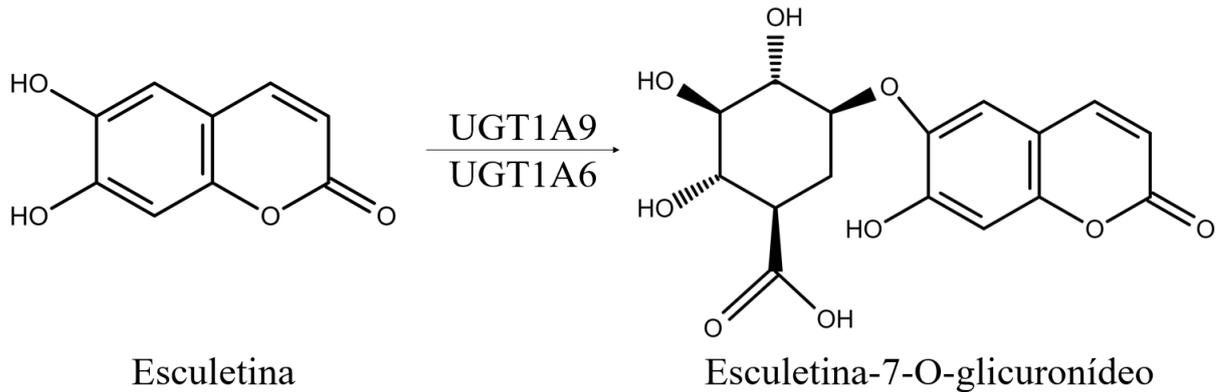
Pesquisas apontam o potencial da ESC no tratamento de câncer (cervical, cólon, endométrio, gástrico, laringe, pâncreas, pele, próstata, pulmão, renal e sangue) ao induzir apoptose e inibir a metástase ou crescimento das células, no controle da diabetes ao promover a degradação da glicose de forma mais acelerada e também inibir sua produção, além de atenuar possíveis perturbações cardiovasculares causadas pela doença (YANG *et al.*, 2010; JEON *et al.*, 2015; KIM *et al.*, 2015; ARORA *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2017; TURKEKUL *et al.*, 2018; KIM *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2019; DUAN *et al.*, 2020; PULLAIAH *et al.*, 2021; JIANG *et al.*, 2021; REN *et al.*, 2022; ALAM *et al.*, 2022). É eficiente ao reduzir a acumulação de lipídeos, reestabelecer o nível de lipoproteína de alta densidade (HDL – do inglês *high density lipoprotein*) e inibir a oxidação de lipoproteína de baixa densidade (LDL –

do inglês *low density lipoprotein*), assim como, a proliferação e migração para as células do músculo liso vascular, responsáveis pela regulação do tônus arterial, pressão sanguínea e vascularização dos tecidos (ZHOU *et al.*, 2018; ZHANG; XIE; LI, 2022). Tem efeito sobre o sistema nervoso inibindo as enzimas AChE, BChE e BACE1 e o gene LRRK2, o qual a mutação implica no desenvolvimento de doença de Parkinson, além de suprimir o estresse oxidativo e traumas decorrentes de inflamações. A ESC pode também auxiliar no tratamento de doença hepática gordurosa não alcoólica, de uricemia, osteoporose, trombose, inflamação atópica na pele, aterosclerose, fibromialgia e síndrome do olho seco (HU; LIU, 2017; JEONG *et al.*, 2018; JIANG; PARK; SINGH *et al.*, 2020; LEE, 2021; KARNEWAR *et al.*, 2022; WANG; QIN; JIANG, 2022; ZHANG; XIE; LI, 2022).

Em aplicações cutâneas a ESC apresentou efeito positivos sobre lesões como melanoma, inflamação atópica e psoríase (JEON *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2018; JEONG *et al.*, 2018). Del Rio Sancho *et al.* (2013), ainda destacaram a possibilidade do potencial farmacológico a partir da absorção transdermal da substância. Para avaliar a viabilidade farmacológica da ESC foram realizados estudos farmacocinéticos quanto a administração intravenosa e oral em ratos. Kwak *et al.* (2021) e Jiao *et al.* (2021), reportam que mesmo administrando quantidades diferentes, foram obtidos um valor médio de 19% de biodisponibilidade via oral. Li *et al.* (2022) produziram e administraram micelas de ESC, desta forma, observou-se maior biodisponibilidade para a ocorrência de efeitos terapêuticos. Estudos de Zhang, Xie e Li (2022) apontaram que mecanismos farmacológicos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, são efetivados quando as doses administradas são de aproximadamente 20 mg/kg.

O conhecimento que se tem sobre a adsorção e distribuição da ESC no organismo humano ainda é bastante limitado. Sabe-se que após sua rápida absorção no sistema gastrointestinal enzimas localizadas nos intestinos, UGT1A9 (5'-difosfo-glicuronosiltransferase 1-9), e fígado, UGT1A6 (5'-difosfo-glicuronosiltransferase 1-6), são responsáveis pela via metabólica da ESC, transformando-a em esculetina-7-O-glicuronídeo e sendo eliminada junto à urina (KIM *et al.*, 2014; REHMAN *et al.*, 2015; ZHANG; XIE; LI, 2022), como pode ser observado na Figura 2.

Figura 2 - Esquema simplificado da esculetina no metabolismo.



Fonte: Adaptado de Zhang, Xie e Li (2022).

Em 2006, a Comissão Europeia (EC – do inglês, *European Commission*) através da autoridade europeia para a segurança alimentar (EFSA – do inglês, *European Food Safety Authority*) limitou a quantidade de polifenóis em óleo de oliva (PETRUCCI *et al.*, 2022). Desde a implementação da norma nº 1924/2006 da União Europeia (EU – do inglês, *European Union*), que estabelece uma regulamentação sobre a identificação de nutrientes e substâncias adicionados a alimentos, foram registradas patentes a partir de plantas do gênero *Morus Alba*, por exemplo, na fabricação de produtos alimentícios e cosméticos (JAN *et al.*, 2021).

A partir do interesse das propriedades fitoterápicas da ESC, estudos têm sido realizados acerca da produção de alimentos funcionais ou suplementos, cremes e medicamentos a partir de plantas como: *Cortex fraxini*, *Morus Alba*, *Morus nigra*, *Moringa oleifera*, *Cichorium intybus* e *Vitis vinifera* (EYDURAN *et al.*, 2015; AHMAD EL-SOHAIMY *et al.*, 2015; NWAFOR; SHALE; ACHILONU, 2017; CHEN *et al.*, 2021; GARCÍA-MARTÍNEZ *et al.*, 2021; POLUMACKANYCZ; WESOLOWSKI; VIAPIANA, 2021).

2.2 MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE ESCULETINA

A administração de matéria-prima pelas indústrias de alimentos, fármacos ou cosméticas, contendo ESC faz com que se torne essencial o desenvolvimento de metodologias analíticas eficazes e cada vez mais precisas na sua determinação. Dentre as técnicas mais comuns na determinação de ESC, encontram-se as técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – do inglês, *high performance liquid chromatography*) associada a

espectrômetro de massas, voltametria e eletroforese capilar, sendo esta última um exemplo de técnica que tem mostrado limites de detecção entre $4,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$, por isso, não muito usada em amostras onde a ESC encontra-se em baixas concentrações (GAN *et al.*, 2012; PRZYBYLSKA *et al.*, 2021).

Na Tabela 1 são comparados limites de detecção obtidos através do emprego da voltametria de pulso diferencial (DPV – do inglês, *differential pulse voltammetry*) e cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (HPLC-MS/MS). As técnicas que fazem uso de HPLC necessitam de um árduo preparo de amostra, além de equipamentos de alto custo, fazendo com que apresentem custo benefício inferior às técnicas voltamétricas (VUCKOVIC, 2012; TARTAGLIA *et al.*, 2022). Além disso, por meio de técnicas voltamétricas é possível não só quantificar determinado analito em nível traço, mas também estabelecer a dinâmica envolvida com o eletrodo de trabalho, além de detectar a presença de diferentes espécies em solução e número de elétrons envolvidos em reações de oxirredução (SCHOLZ, 2015).

Tabela 1 - Técnicas para a determinação de esculetina e limites de detecção.

Técnica	LOD (nmol L ⁻¹)	Referência
Voltametria – DPV	1,2	YAO <i>et al.</i> , 2016
	1,0	SHENG <i>et al.</i> , 2020
	2,3	YAN <i>et al.</i> , 2022
	3,6	BAO <i>et al.</i> , 2022
LC-MS/MS ^a	0,10	YUN <i>et al.</i> , 2012
HPLC-MS/MS	0,024	FU <i>et al.</i> , 2014

^a Espectrometria de massa em tandem.

Para a determinação de ESC com o uso de HPLC, segundo a literatura, pode-se citar as frutas: uva (*Airen grape*), morango (*Fragaria L.*), kiwi (*Actinidia L.*), amora (*Morus L.*), cereja selvagem (*Prunus avium L.*), framboesa (*Rubus idaeus L.*) e mirtilo (*Vaccinium corymbosum*, *Vaccinium myrtillus L.* e *Vaccinium uliginosum*); derivados de frutas: vinhos e sucos de uva; plantas medicinais: *Puerariae L.*, *Phellodendri L.*, *Cirsii L.*, *Aucklandiae L.*, *Glycyrrhizae L.*, *Aurantii L.*, *Kalopanax L.*, *Atractylodes L.*, *Cyperii L.*, beladona de frutas

amarelas (*Solanum virginianum* L.), *Viola yedoensis maniko*, *Arabidopsis thaliana*, *Cortex fraxini*, *Lonicera* L., *Artemisia* L., *Acanthopanax* L., *Angelicae gigantis*, *Angelicae dahuricae*, *Agastache rugosa*, *Carthami* L., *Akebia kinata*, *Forsythiae* L., *Magnolia* L. e *Ulmi pumilae*, *Eucommiae* L.; outros: castanha-da-Índia (*Aesculus hippocatanum*), orelha-de-Judas (*Auricularia auricula-judae*) e chicória (*Chicorium intybus*) (YUN *et al.*, 2012; ANCILLOTTI *et al.*, 2016; DRESLER *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2018; SUBBIAH *et al.*, 2020; GARCÍA-MARTÍNEZ *et al.*, 2021; PERKOWSKA *et al.*, 2021; HU *et al.*, 2021; MAI *et al.*, 2022; WANG *et al.*, 2022; TARTAGLIA *et al.*, 2022; CUI *et al.*, 2022; USMAN *et al.*, 2022; CVETKOVIĆ *et al.*, 2022; AKŠIĆ *et al.*, 2022; ALY e GÓRECKI, 2022). Em relação às técnicas voltamétricas são observados trabalhos na determinação de ESC em *Cortex fraxini*, *Viola yedoensis maniko*, chá-preto (*Camellia sinensis*), urina e soro sanguíneo (ZAPP *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2016; YAN *et al.*, 2022; BAO *et al.*, 2022)

2.3 SENSORES ELETROQUÍMICOS

Na literatura, foi reportado metodologia para determinação de ESC através de técnicas voltamétricas na análise de ervas da medicina tradicional chinesa, tais como, *Cortex fraxini* e *Viola yedoensis Makino*, plantas conhecidas pela alta concentração de ESC (YAO *et al.*, 2016). Os eletrodos modificados para determinação de ESC, como apresentados na Tabela 2, em grande parte, se baseiam na adição de formas alotrópicas do carbono como grafeno, nanotubos e grafidino, os quais possuem ligações π conjugadas capazes de fornecer alta condutividade, contribuindo para a eletrocatalise de reações, além da possibilidade de alteração da superfície com agrupamentos ou nanopartículas imobilizadas (MONDAL; JANA, 2014; YAN *et al.*, 2022). Combinadas a essas estruturas, podem ser empregadas nanopartículas metálicas/óxidos/sulfetos, como óxido de titânio (TiO_2), cádmio, monossulfeto de cobre (CuS), platina e ouro ou até mesmo a combinação de duas espécies metálicas, no entanto, muitas vezes, são adicionados polímeros para promover maior estabilidade e/ou modificar a morfologia das nanopartículas (MOMENI *et al.*, 2022).

Tabela 2 - Modificações empregadas em sensores para determinação de esculetina em amostras.

Técnica	Sensor	Amostra	LOD (nmol/L ⁻¹)	Referência
SWV	CPE/LI/Au-NP/MMT/PPO ^a	<i>Camellia sinensis</i>	129,0	ZAPP <i>et al.</i> , 2011
	CdSe-PDDA-G/GCE ^b		4,0	LU <i>et al.</i> , 2011
	GCE		26,0	WANG <i>et al.</i> , 2012
	CuS/GN/GCE ^c		58,0	ZHAO <i>et al.</i> , 2013
	c-SWCNTs-NF-AuNs/GCE ^d	<i>Cortex fraxini</i>	1,2	YAO <i>et al.</i> , 2016
DPV	Poly(L-lanthionine)/GCE ^e		1,0	SHENG <i>et al.</i> , 2020
	NUGDY/CILE ^f		2,3	YAN <i>et al.</i> , 2022
	TiO ₂ -PDDA-Gr ^g	<i>Viola yedoensis makino</i>	4,0	LI <i>et al.</i> , 2016
LSV	ERGO/GCE ^h		20,0	LI <i>et al.</i> , 2015
DPV	PtNPS/AuNPs/CFME ⁱ	Urina e soro sanguíneo	3,6	BAO <i>et al.</i> , 2022

^a Eletrodo de pasta de carbono modificado com nanopartículas de ouro dispersas em líquido iônico 1-butil-3-metilimidazólio e polifenol oxidase;

^b Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de cádmio e selênio com poli-(cloreto de dialildimetilamônio) funcionalizado em filme de grafeno;

^c Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de monossulfeto de cobre depositados em grafeno;

^d Eletrodo de carbono vítreo modificado com monocamada de nanotubos de carbono com nanopartículas de ouro em Nafion;

^e Eletrodo de carbono vítreo modificado a partir da eletropolimerização de L-lantionina;

^f Eletrodo de pasta de carbono com líquido modificado com grafidino ultrafino dopado com átomos de nitrogênio com hibridização *sp*;

^g Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de dióxido de titânio com poli(cloreto de dialildimetilamônio) funcionalizados em grafeno;

^h Eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno reduzido;

ⁱ Microeletrodo de fibra de carbono modificado com nanopartículas de platina e ouro;

A utilização de grafeno na composição de nanocompósito metálico em GCE foi empregado em alguns trabalhos para determinação de ESC. Lu e colaboradores (2011), por

exemplo, usaram nanopartículas de cádmio e selênio e foi obtido um limite de detecção de $4,0 \text{ nmol L}^{-1}$, enquanto Zhao e colaboradores (2013) empregaram nanopartículas de monossulfeto de cobre e foi obtido um LOD de 58 nmol L^{-1} . Sheng e colaboradores (2020), destacaram a formação de filme de L-lantionina na superfície de um GCE a partir da eletropolimerização por CV, assim, foi possível obter LOD de $1,0 \text{ nmol L}^{-1}$ para ESC.

Dentre os trabalhos apresentados, destacam-se os LODs de eletrodos modificados com nanopartículas metálicas, principalmente de ouro, e daqueles que fazem uso de formas alotrópicas de carbono.

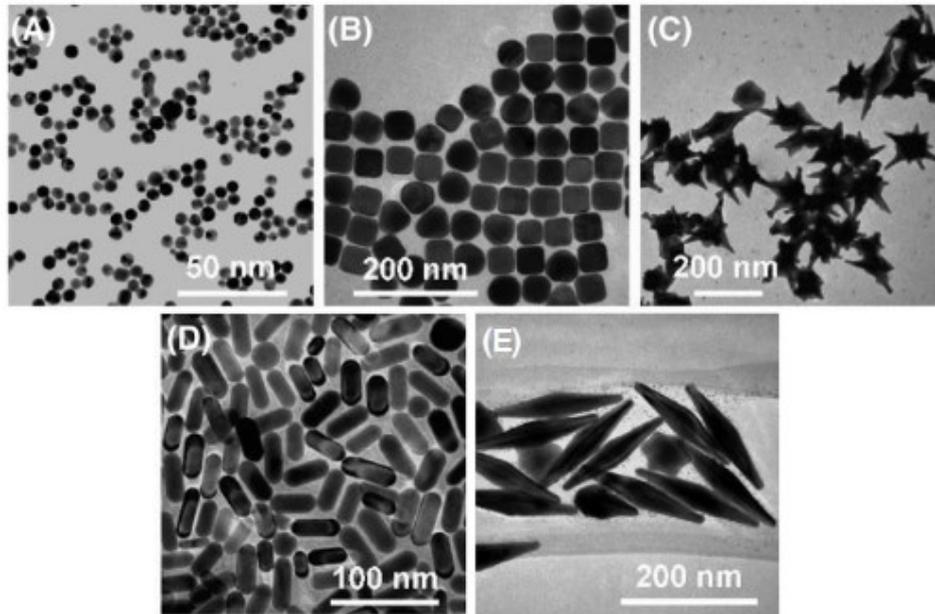
2.4 NANOPARTÍCULAS DE OURO

Nanopartículas pertencem à classe de materiais nanométricos (1-1000 nm) que manifestam propriedades diferentes daquelas apresentadas quando em maior escala, e, por isso, encontram aplicação em eletrônica, óptica, catálise, sensores e biomedicina (GUO; YAN, 2008; TORRES-FERRER *et al.*, 2022). Muitas dessas aplicações se deram com a utilização de nanopartículas de ouro, logo, o controle sobre o formato e tamanho, além da estabilidade das nanopartículas sintetizadas, passam a serem fatores importantes de acordo a aplicação (JIANG; WANG; CHEN, 2007).

A síntese de AuNP geralmente tem como molécula precursora NaAuCl_4 ou HAuCl_4 que sofre a redução de agentes como borohidreto de sódio ou citrato de sódio, ou, ainda, por extratos vegetais, dependendo destes agentes redutores, que podem ou não agir como estabilizantes, podemos observar a formação de diferentes morfologias, como mostra a Figura 3 (ANIK *et al.*, 2021). A estratégia usada para evitar a coalescência impacta diretamente no tamanho das nanopartículas, onde são utilizados agentes estabilizantes, como líquidos iônicos, surfactantes ou polímeros capazes de promover repulsão eletrostática e/ou efeito estérico (SOKOLSKY-PAPKOV e KABANOV, 2019; TSENG *et al.*, 2020).

A partir da utilização de grafeno, por exemplo, é possível observar uma melhor distribuição espacial de nanopartículas metálicas, além do aumento de sensibilidade em sensores eletroquímicos, devido ao aumento de área superficial e eficiência na transferência de elétrons (MENG *et al.*, 2022; CHEN *et al.*, 2022; MANIKANDAN *et al.*, 2022). No entanto, quanto à estabilidade das AuNP é de suma importância o uso de estabilizantes para administrar tamanho e formato das nanopartículas e impedir a coalescência, seja ela através de repulsões eletrostáticas e/ou estéricas (ANIK, 2022).

Figura 3 - Imagens de TEM de AuNP com diferentes morfologias: (A) esférica, (B) cúbica, (C) em formato de estrela, (D) bastão e (E) bipiramidal.



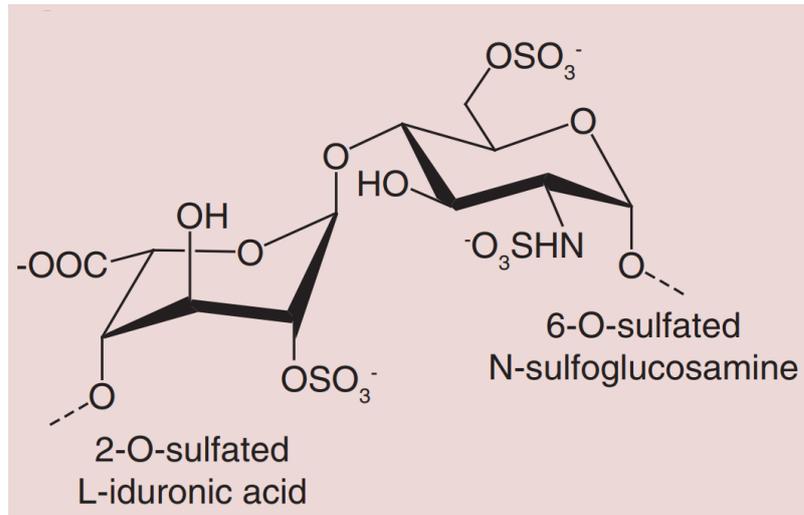
Fonte: ANIK, 2022.

2.5 HEPARINA

A heparina (Hep) é um polissacarídeo sulfatado de cadeia linear carregado negativamente que pertence à família de glicosaminoglicanos. A cadeia de heparina é caracterizada pela repetição do dissacarídeo formado por ácido L-idurônico 2-O-sulfato e por 6-O-sulfato N-sulfoglucosamina (Figura 4). A presença de outros dissacarídeos é menos comum e a biossíntese ocorre a partir da atividade de enzimas no Complexo de Golgi de mastócitos do tecido conjuntivo. Durante a síntese, a cadeia de heparina pode se desenvolver de forma incompleta, fornecendo maior heterogeneidade na porção de sacarídeos (ALÁEZ-VERSÓN; LANTERO; FERNÁNDEZ-BUSQUETS, 2017).

Sua aplicação, inicialmente, se deu como anticoagulante e antitrombótico, atualmente já se tem conhecimento do seu potencial no tratamento de doenças como câncer, fibrose cística e Alzheimer. No entanto, a heparina passou a ser utilizada junto a nanopartículas metálicas, como ouro, prata e óxidos metálicos por sua capacidade de estabilizá-las e por sua biocompatibilidade (SUN *et al.*, 2009; KEMP *et al.*, 2009; RODRIGUEZ-TORRES; ACOSTA-TORRES; DIAZ-TORRES, 2018).

Figura 4 - Representação do dissacarídeo majoritário da heparina.



Fonte: ALÁEZ-VERSÓN, LANTERO, FERNÁNDEZ-BUSQUETS, 2017.

Em estudo sobre a influência da concentração de Hep como estabilizante de AuNPs, Guo e Yan (2008) demonstraram que a administração de altas concentrações do estabilizante produz AuNPs com diâmetros menores, podendo variar entre 12 e 19 nm. Rodriguez-Torres e colaboradores (2020), utilizando a mesma metodologia obtiveram AuNPs com diâmetros ainda menores, entre 1,5 e 7,5 nm.

As nanopartículas metálicas estabilizadas em heparina, tais como, platina, ósmio, ouro e óxidos metálicos (Fe₃O₄, NiO e Co₃O₄) são comumente usadas no desenvolvimento de sensores colorimétricos (VISMARA *et al.*, 2013; RODRIGUEZ-TORRES; ACOSTA-TORRES; DIAZ-TORRES, 2018; RAJ e ALEX, 2021). Como exemplo em voltametria, encontram-se os trabalhos de Talamini e colaboradores (2018) que desenvolveram um imunossensor para detecção de PSA (antígeno prostático específico) utilizando um eletrodo de ouro contendo filme de cristal líquido (brometo de (E)-1-decil-4-((4-(deciloxi)fenil)diazenil)piridínio) como sonda redox, nanopartículas de ouro estabilizadas em heparina para imobilização do anticorpo e Nafion[®] para fixação do filme na superfície do sensor (AuE/Br-Py/AuNP-Hep-Nafion/ab-PSA/Gly). Zanato e colaboradores (2017) desenvolveram um imunossensor eletroquímico para detecção de troponina cardíaca T em plasma sanguíneo, a partir da modificação da superfície de um eletrodo de carbono vítreo com filme de nanopartículas de ouro estabilizadas em heparina contendo nanoplaquetas de grafite, anticorpo e Nafion[®] (GCE/Nafion/AuNP-Hep-xGnP).

2.6 GRAFENO

O grafeno é uma estrutura planar composta por átomos de carbono que apresentam hibridização do tipo sp^2 , o que confere ao material elasticidade, alta condutibilidade elétrica e térmica e área superficial superior a $2000 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, tais propriedades fazem com que esta seja uma das espécies mais utilizadas de carbono (FAHMY *et al.*, 2022; REDDY *et al.*, 2022). Tratando-se de um material hidrofóbico, é comum a oxidação para obtenção de grafeno oxidado (GO, do inglês *graphene oxide*), no entanto, algumas propriedades originais do grafeno são comprometidas no processo, limitando bastante seu uso (MONDAL e JANA, 2014).

A combinação de grafeno com nanopartículas metálicas, óxidos metálicos ou pontos quânticos são comuns em sensores, sejam eles eletroquímicos ou ópticos. Em geral, a performance obtida partir da combinação destes materiais é mais seletiva e sensível em comparação a nanocompósitos de nanotubos ou fulereno, por exemplo (BOLLELLA *et al.*, 2017; GOMMA *et al.*, 2022; RAMYA *et al.*, 2022; LI *et al.*, 2022). Este “ancoramento” de nanopartículas às folhas de grafeno somente é possível pelo estabelecimento de interações covalentes ou não covalentes, que incluem interações π - π ou aprisionamento em ondulações da superfície da folha, essa deposição serve até mesmo para evitar a coalescência das nanopartículas (XIAO *et al.*, 2020; REDDY *et al.*, 2022; WALTERS *et al.*, 2022).

Como mostra a Tabela 3, o desenvolvimento de sensores com AuNP e Gr ou derivados destaca-se na detecção de pesticidas, biomarcadores, metais e produtos farmacêuticos, em amostras de solo, alimentos e águas (MOMENI *et al.*, 2022; FU *et al.*, 2022). Os sensores modificados com esses materiais apresentam, além da facilidade de confecção, boa repetibilidade e alta capacidade na detecção de biomoléculas, principalmente com grupamentos fenol, e obtenção de limites de detecção próximos aos obtidos em técnicas cromatográficas (BOLLELLA *et al.*, 2017; PETRUCCI *et al.*, 2022). O desenvolvimento de metodologias e incrementos na modificação devem servir para o acompanhamento de moléculas de interesse (MENG *et al.*, 2022; SIVARANJANEE *et al.*, 2022).

Tabela 3 - Sensores voltamétricos contendo AuNP e materiais carbonáceos.

Eletrodo	Analito	LOD (nmol L ⁻¹)	Referência
PDDA-rGO/Au-Al ₂ O ₃ /GCE ^a		6,0	LI <i>et al.</i> , 2016
AuPd/GN-GNTs-IL/GCE ^b	Acetaminofeno	50,0	YANG <i>et al.</i> , 2021
		300,0	
Fe ₃ O ₄ @Au-S/Fc-GS-Chitosan/GCE ^c	Ácido úrico	20,0	LIU <i>et al.</i> , 2013
	Ácido ascórbico	1,0	
		50,0	
Au@Pd-rGO/GCE ^d	Dopamina	2,0	JIANG; DU, 2014
Au/N-GOQDs/NiS ₂ /BC/MIP/GCE ^e		2,8	LU <i>et al.</i> , 2020
	Clorpromazina	0,25	
MIP/Au/rGO/GCE ^f	Carbofuran	0,033	TIAN <i>et al.</i> , 2022
MIP/AuNU-GO/SPCE ^g	Oxacilina	0,2	MOGHADAM <i>et al.</i> , 2019
AuNP-PEDOT/PB-rGO ^h	α-fetoproteína	0,03	YANG <i>et al.</i> , 2017
Au@Pt/GO/MWCNTs ⁱ	Glucose	42,0	WANG <i>et al.</i> , 2022
AuNPs/RGO/GCE ^j	Nitrazepam	166,0	FRITEA <i>et al.</i> , 2018
GR/Au-Tyr-CS/GCE ^k	Bisfenol A	1,0	PAN <i>et al.</i> , 2015
GQDs/GNPs/GCE ^l	Luteonina	1,0	TANG <i>et al.</i> , 2019
Au@Fe ₃ O ₄ @RGO-MIPs ^m	Ractopamina	0,02	LI <i>et al.</i> , 2018

^a Sensor com filme de nanopartículas de ouro e óxido de alumínio em grafeno funcionalizado com poli-(cloreto de dialildimetilamônio);

^b Líquido iônico funcionalizado com nanotubos de grafeno com nanopartículas de ouro e paládio;

^c Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanocompósitos óxido de ferro e nanopartículas de ouro estabilizados com tiolato de ferroceno em folha de grafeno com quitosana;

^d Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanocompósitos de paládio e ouro em óxido de grafeno;

^e Sensor impresso com nanopartículas de ouro e nitrogênio dopado em pontos quânticos de óxido de grafeno com NiS₂;

^f Polímeros molecularmente impressos com nanopartículas de ouro e óxido de grafeno reduzido;

^g Polímeros molecularmente impressos de polianilina com nanopartículas de ouro e óxido de grafeno;

^h Óxido de grafeno com compósitos de nanopartículas de ouro e poli(3,4-etilenodioxitiofeno);

ⁱ Nanopartículas de ouro e platina em óxido de grafeno e nanotubos de carbono;

^j Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de ouro em óxido de grafeno reduzido;

^k Eletrodo de carbono vítreo modificado com grafeno funcionalizado com nanopartículas de ouro, quitosana e tirosinase;

^l Eletrodo de carbono vítreo modificado com pontos quânticos de grafeno com nanocompósitos de ouro.

^m Polímeros molecularmente impressos com óxido de ferro e grafeno modificados com ouro.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo utilizar nanopartículas de ouro estabilizadas em heparina e ancoradas em grafeno para modificar um eletrodo de carbono vítreo, que após parâmetros experimentais otimizados, será utilizado na determinação de esculetina em geleia de amora, chá e pó de amora branca (*Morus Alba L.*).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar nanopartículas de ouro estabilizadas em heparina (AuNP-Hep) e caracterizá-las por espectroscopia UV-Vis e microscopia eletrônica de transmissão (TEM – do inglês, *transmission electron microscopy*);
- Estudar as diferentes proporções de grafeno e AuNP-Hep na construção do sensor (AuNP-Hep-Gr/GCE);
- Comparar a resposta eletroquímica do eletrodo de carbono vítreo sem modificação e do sensor proposto (AuNP-Hep-Gr/GCE), através da voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica;
- Otimizar os parâmetros experimentais (pH e eletrólito de suporte) e os parâmetros da técnica de voltametria de onda quadrada (frequência, amplitude e incremento) sobre a resposta de corrente de esculetina usando o sensor proposto;
- Construir a curva de calibração para a esculetina utilizando o sensor e determinar os limites de detecção e quantificação do método;
- Realizar estudos de repetibilidade e estabilidade do sensor;
- Aplicar o sensor desenvolvido na determinação de esculetina em amostra comercial e verificar a exatidão do método proposto através de testes de adição e recuperação.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REAGENTES, SOLUÇÕES E MATERIAIS

Os reagentes utilizados no preparo das soluções foram adquiridos comercialmente em grau analítico e sem purificação adicional. Todas as soluções foram preparadas diariamente utilizando água ultrapura purificada em sistema Milli-Q (Millipore, Estados Unidos) com resistividade de 18,2 M Ω cm. A solução estoque de esculetina foi preparada na concentração 1,0 mmol L⁻¹ utilizando acetona (Vetec) 100%. A solução de Fe(CN)₆^{3-/4-} de concentração equimolar 5 mmol L⁻¹ foi preparada a partir da dissolução de ferricianeto de potássio (K₃[Fe(CN)₆]) e ferrocianeto de potássio (K₄[Fe(CN)₆]) (Sigma Aldrich) em KCl 0,1 mol L⁻¹.

Soluções tampão B-R (0,1 mol L⁻¹; pH 2 a 4,5) foram preparadas a partir da mistura dos ácidos acético (Vetec), fosfórico (Vetec) e bórico (Sigma Aldrich). Solução tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹; pH 2) foi preparada a partir da mistura de ácido fosfórico e fosfato de sódio monobásico (Synth). A preparação da solução tampão Clark-Lubs (0,1 mol L⁻¹; pH 2) foi realizada a partir da mistura de ácido clorídrico (Vetec) e cloreto de potássio (Synth). Todas as soluções tampão preparadas tiveram, quando necessário, o pH ajustado com hidróxido de sódio (40%) ou ácido clorídrico (37,5%) (LAFAN).

Para a síntese das nanopartículas foram preparadas as soluções: 0,5% heparina (Bioiberica) com ácido acético (0,05%), 0,12 mol L⁻¹ de ácido tetracloroáurico (HAuCl₄) (Sigma Aldrich) e 20 mmol L⁻¹ de borohidreto de sódio (NaBH₄) (Sigma-Aldrich). Para outros ensaios, foram adicionadas massas pré-selecionadas de Gr (2DM) a volumes de 500 μ L da suspensão produzida de AuNP-Hep.

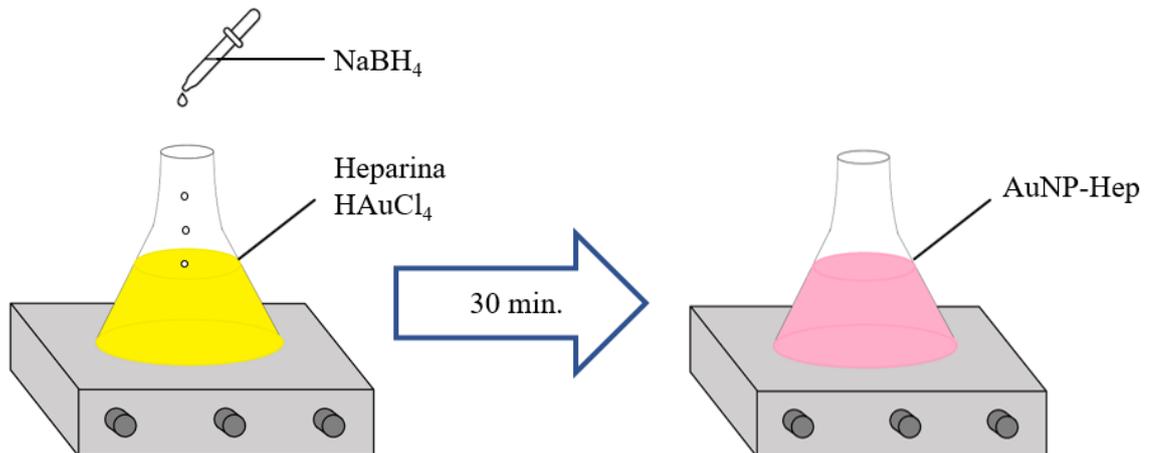
As amostras de chá de amora branca e geleia de amora foram obtidas em mercado local de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

4.2 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO ESTABILIZADAS EM HEPARINA

O procedimento da síntese de nanopartículas de ouro estabilizadas em heparina (AuNP-Hep) foi realizado conforme Talamini (2018). Inicialmente, em 100 μ L da solução de HAuCl₄ (0,12 mol L⁻¹) e 10,0 mL da solução de heparina (0,5 %, m/v) foram adicionados 200 μ L de NaBH₄ (20 mmol L⁻¹) e mantidos em agitação por 30 minutos. A adição do agente redutor resultou na mudança de coloração da solução, como mostra o esquema da Figura 5. A

caracterização de AuNP-Hep foi realizada através de espectroscopia UV-Vis e microscopia eletrônica de transmissão

Figura 5 - Esquema da preparação das nanopartículas de ouro utilizando heparina como estabilizante e borohidreto de sódio como agente redutor.



Fonte: Autor.

4.3 PREPARO DE SUSPENSÃO DE NANOCOMPÓSITO CONSTITUÍDO DE GRAFENO E NANOPARTÍCULAS DE OURO ESTABILIZADAS EM HEPARINA

Com a síntese completa das nanopartículas, em quatro *ependorfs* foram adicionados volumes de 500 μL da dispersão AuNP-Hep e adicionados, a cada um deles, massas pré-estabelecidas de grafeno (0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 mg). Para uniformização, as misturas foram mantidas em banho de ultrassom por 5 minutos. Maiores proporções de Gr não foram adotadas visto a lixiviação ocorrida durante as medidas voltamétricas.

4.4 PREPARAÇÃO DO SENSOR ELETROQUÍMICO

Inicialmente foi realizada a limpeza do eletrodo de carbono vítreo, sobre uma base de feltro com suspensão de alumina (0,05 μm), efetuados movimentos de fricção com movimentos em forma de “oito” por dois minutos. Para a remoção de partículas de alumina foi necessário lavagem com água deionizada e permanência em banho de ultrassom com água deionizada por 3 minutos.

Após a limpeza e secagem do GCE, uma alíquota de 2 μL de solução de AuNP-Hep-Gr foi gotejada sobre a superfície do GCE limpo, em seguida o mesmo foi conduzido à estufa ($41^\circ \pm 2^\circ \text{C}$) por 7,5 minutos para que o solvente evaporasse completamente, assim, obteve-se um filme fino e sólido sobre o eletrodo.

4.5 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E ELETROQUÍMICA DE NANOPARTÍCULAS DE OURO ESTABILIZADAS EM HEPARINA E GRAFENO

A análise de espectroscopia para identificação de AuNP foi realizada em espectrofotômetro Agilent Technologies modelo Cary 60 e cubeta de quartzo (caminho óptico de 1,0 cm). Imagens de AuNP-Hep, de grafeno e AuNP-Hep-Gr foram registradas por meio do emprego da técnica de TEM fazendo uso de microscópio eletrônico de transmissão modelo JEM-1011 operado a 100 kV, assim, sobre uma rede milimétrica de cobre recoberta de carbono foram gotejadas 5 μL de suspensão do material desejado, manteve-se à temperatura ambiente para a completa evaporação de solvente. A partir das imagens obtidas determinou-se o diâmetro aproximado das nanopartículas utilizando *software* ImageJ, no qual foram selecionadas partículas aleatórias em número a depender da quantidade capturada.

As medidas de voltametria cíclica (CV – do inglês, *Cyclic Voltammetry*) e voltametria de onda quadrada (SWV – do inglês, *Square Wave Voltammetry*) foram realizadas em um potenciostato/galvanostato PGSTAT 101 (Metrohm Autolab, Holanda) conectado a um computador contendo o *software* de processamento de dados (NOVA 1.10). Medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS – do inglês, *electrochemical impedance spectroscopy*) foram realizadas em potenciostato Autolab PGSTAT 128N (Metrohm Autolab, Holanda) com módulo de impedância FRA, utilizando o mesmo *software*.

As medidas eletroquímicas foram realizadas com um sistema de três eletrodos acoplados a uma célula de vidro com capacidade para 15,0 mL. Os eletrodos empregados no processo são: i) um eletrodo de trabalho de carbono vítreo (diâmetro $2,0 \pm 0,1$ mm, produzido pela Metrohm); ii) uma placa de platina (aproximadamente $0,5 \text{ cm}^2$) como contra-eletrodo e iii) um eletrodo de referência prata/cloreto de prata (Ag/AgCl) com solução interna de KCl ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$). Foi utilizado um agitador IKA modelo C-MAG HS4 para homogeneizar a solução e todas as medidas foram realizadas à temperatura ambiente (25°C).

4.6 PREPARO DE AMOSTRAS

Os preparos das amostras de chá foram semelhantes, em ambos foram pesados 3 g de amostra em um béquer, ao qual foi adicionado 50 mL de solução tampão B-R ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 2,0) à 90°C , seguido por repouso de 10 min. Ao fim do processo a mistura contendo folhas e pequenos galhos foi peneirada, enquanto a mistura com pó filtrada, a solução resultante foi utilizada na determinação de ESC nas respectivas amostras.

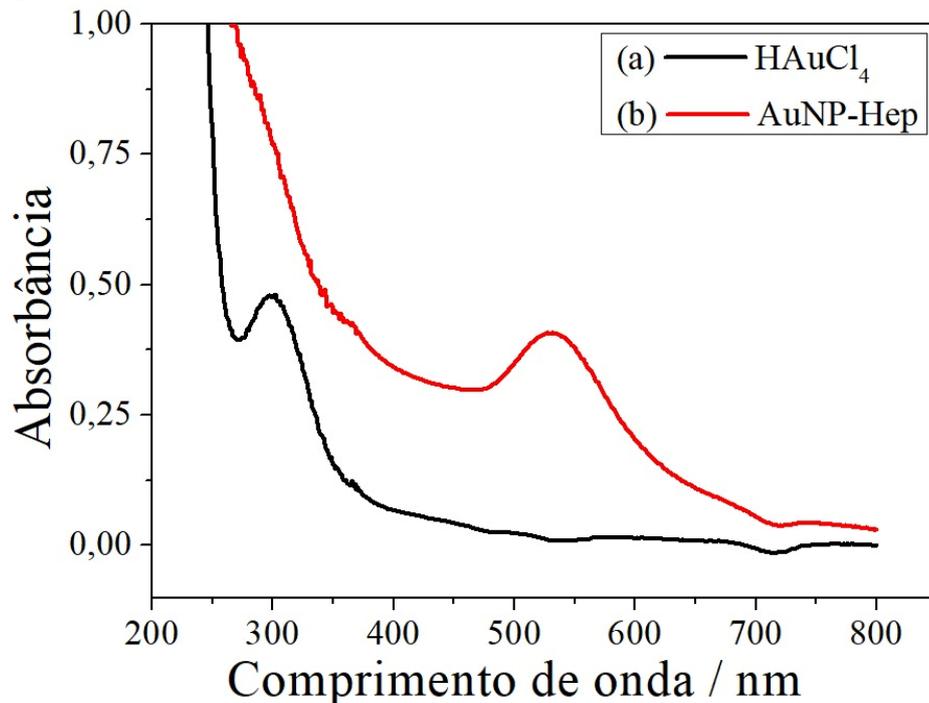
Para análise da geleia de amora pesou-se 4,0 g de amostra em um béquer, foi adicionado 1,6 mL da solução tampão B-R ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 2,0), 0,4 mL de acetona e agitada para homogeneização. Buscando solubilizar a esculetina contida na amostra e precipitar possíveis interferentes, como açúcares, foram adicionados mais 8,0 mL de acetona, a solução foi então submetida a agitação por mais 30 minutos e deixada em repouso. Desta amostra somente o sobrenadante foi utilizado para determinação de esculetina usando a técnica voltamétrica.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO ESTABILIZADAS EM HEPARINA

A caracterização das AuNPs foi realizada através de espectroscopia UV-Vis e microscopia eletrônica de transmissão. Observa-se na Figura 6 o espectro de absorção do complexo HAuCl_4 com uma banda em 302 nm, atribuída à transição de transferência de carga do ligante para o metal do íon $[\text{AuCl}_4]^-$ (WON; IHN; KANG, 2002). Após a redução dos íons Au^{3+} foi possível evidenciar a formação de AuNP através da mudança de coloração de amarelo para vermelho. Assim, houve o desaparecimento da banda em 302 nm e o surgimento de uma nova banda em 533 nm referente à banda plasmônica das AuNPs. De acordo com Guo e Yan (2008) e Raj e Alex (2021) nanopartículas de ouro estabilizadas em heparina apresentam absorção entre 520 e 540 nm, onde tanto o deslocamento, quanto o formato da banda dependem diretamente do formato e tamanho das nanopartículas. Quando se trata de nanopartículas esféricas, verifica-se que quanto menor o tamanho, menor é o comprimento em que se apresenta a banda plasmônica (JIANG; WANG; CHEN, 2007).

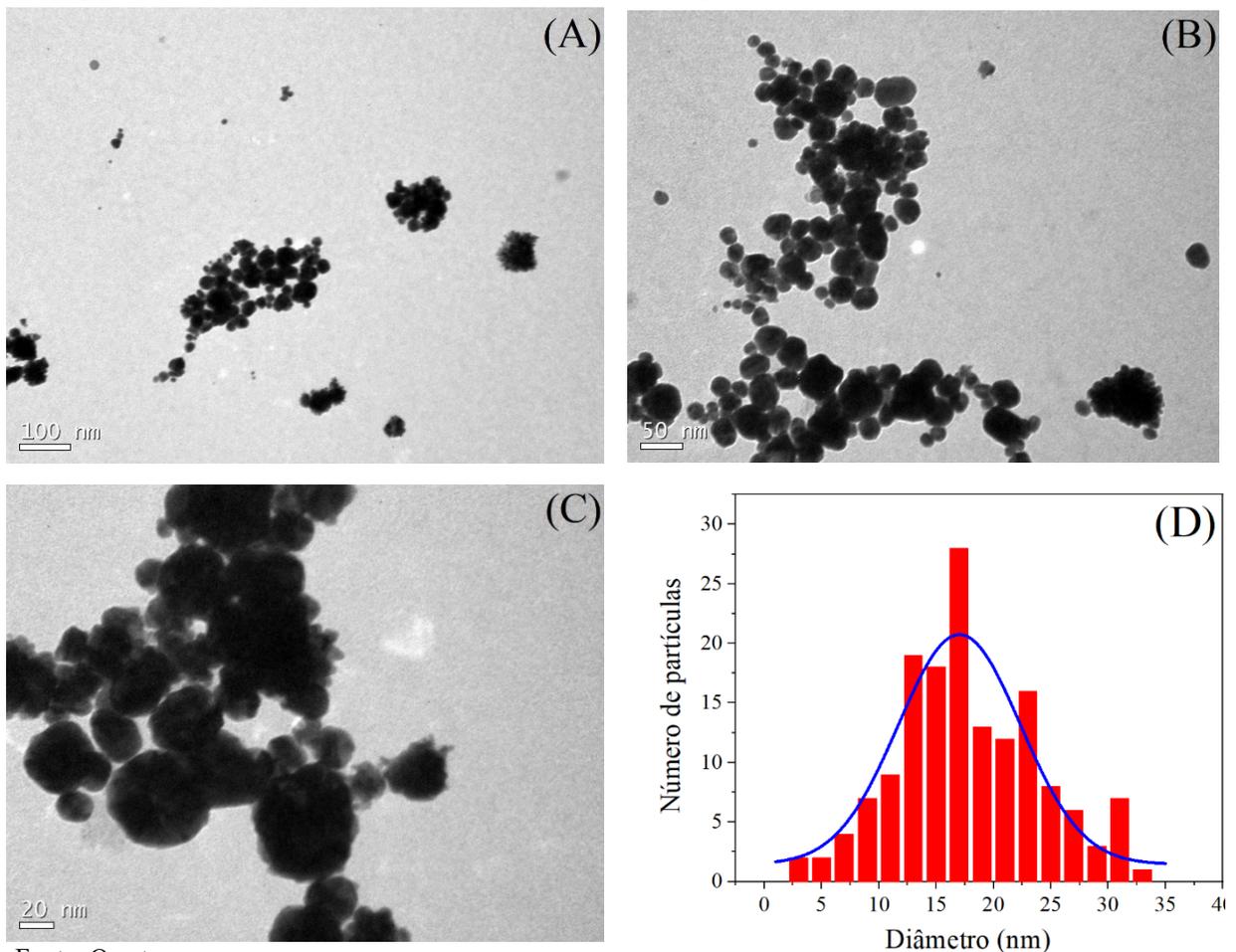
Figura 6 - Espectro de absorção UV-Vis da solução de (a) HAuCl_4 e da dispersão de (b) AuNP-Hep.



Fonte: O autor.

As micrografias de TEM, Figuras 7A-C, em diferentes ampliações, permitiram estimar o tamanho das nanopartículas de ouro estabilizadas em heparina (AuNP-Hep), no entanto, é visível a formação de agregados no sistema. O histograma das AuNP-Hep (Figura 7D) aponta que a maior população de partículas se encontra com diâmetro médio de $17,6 \pm 1,6$ nm.

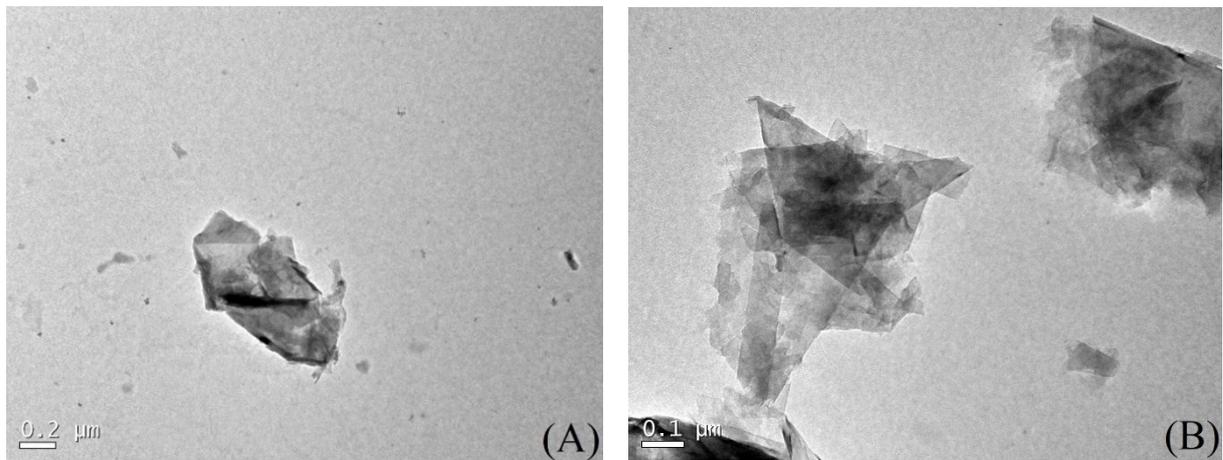
Figura 7 - Imagens de TEM com diferentes ampliações (A)100, (B)500 e (C)1000 x; (D) histograma de distribuição do tamanho das AuNP-Hep.



Fonte: O autor.

A Figura 8 mostra as imagens obtidas através de TEM para a mistura de grafeno e heparina, com o objetivo de avaliar a capacidade de dispersão do Gr no polímero sulfatado. Observa-se uma dispersão das folhas de grafeno e uma adsorção de heparina na superfície das folhas por meio de interações hidrofóbicas. Conclui-se, que há uma repulsão estérica causada pela parte hidrofílica da cadeia de Hep, ou seja, o polímero é capaz de dispersar um material hidrofóbico, como o grafeno (LEE *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2013; SHI *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2022).

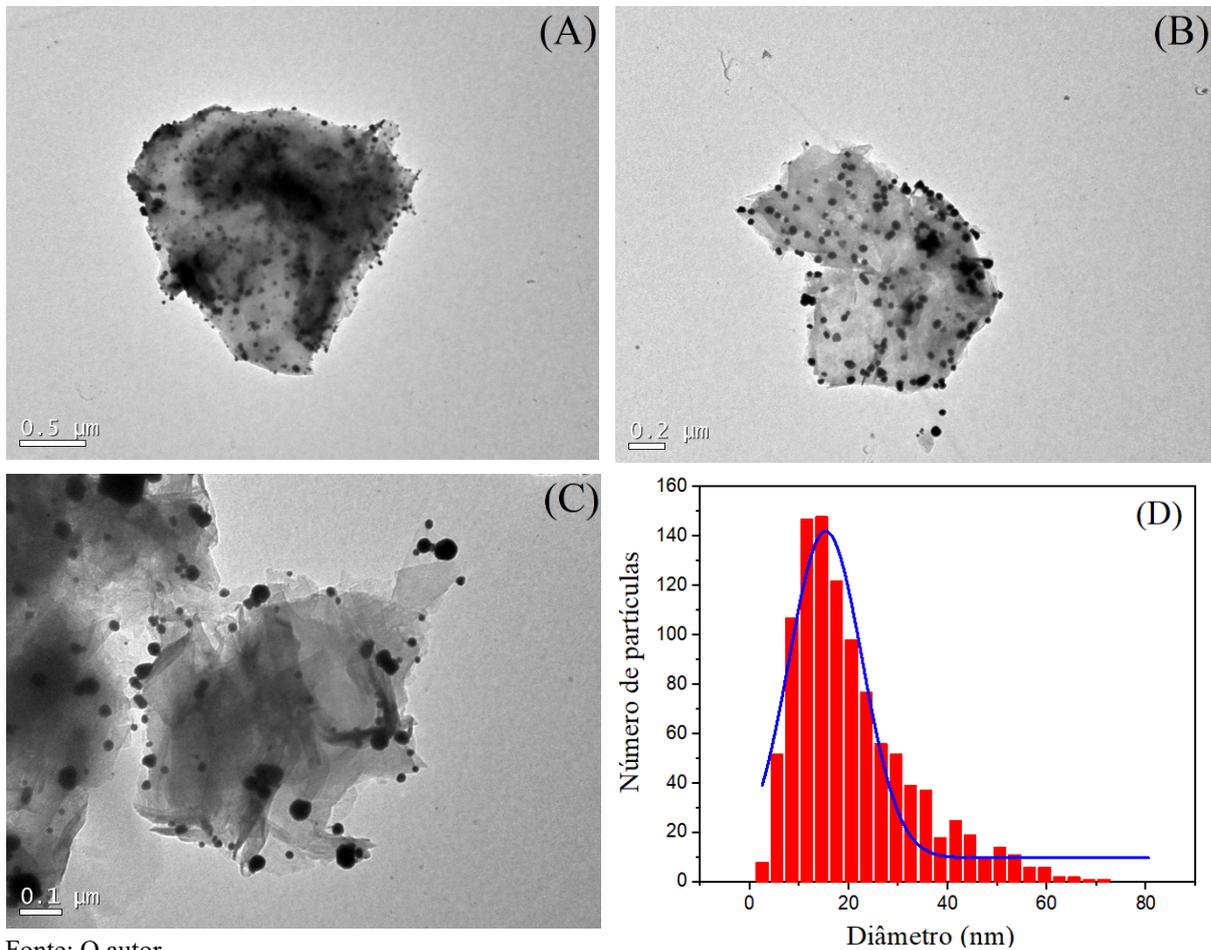
Figura 8 - Imagens de TEM de folhas de grafeno em heparina com diferentes magnificações (A) 50 e (B) 500 x.



Fonte: O autor.

Quando se adiciona grafeno à dispersão de AuNP-Hep, observa-se a deposição das nanopartículas sobre a superfície das folhas de grafeno de forma bastante distribuída (Figura 9). Isto se deve à presença de heparina na superfície das AuNP através de interações eletrostáticas, ocasionando efeito estérico entre as nanopartículas, enquanto a adsorção na superfície do material carbonáceo ocorre através de interação hidrofóbica efetuada com a heparina (MONDAL e JANA, 2014; SHI *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2022; RATTAN *et al.*, 2022). Através das imagens obtidas por TEM (Figura 9A-C) é possível observar a presença de AuNP-Hep predominantemente sobre a superfície de grafeno, de forma bastante distribuída, contribuindo, assim, para a estabilização das nanopartículas. O histograma (Figura 9D) mostra um pequeno decréscimo no diâmetro médio das AuNP-Hep-Gr ($15,2 \pm 3,0$ nm) na presença de Gr, quando comparado às AuNP-Hep, na ausência do grafeno ($17,6 \pm 1,6$ nm, Figura 7D), mostrando, que as folhas de Gr foram essenciais para a dispersão das AuNP-Hep, evitando, também, a coalescência das nanopartículas.

Figura 9 – (A-C) Imagens de TEM de AuNP-Hep-Gr com diferentes magnificações (D) Histograma de distribuição do tamanho das nanopartículas estabilizadas em heparina na presença de grafeno.



Fonte: O autor.

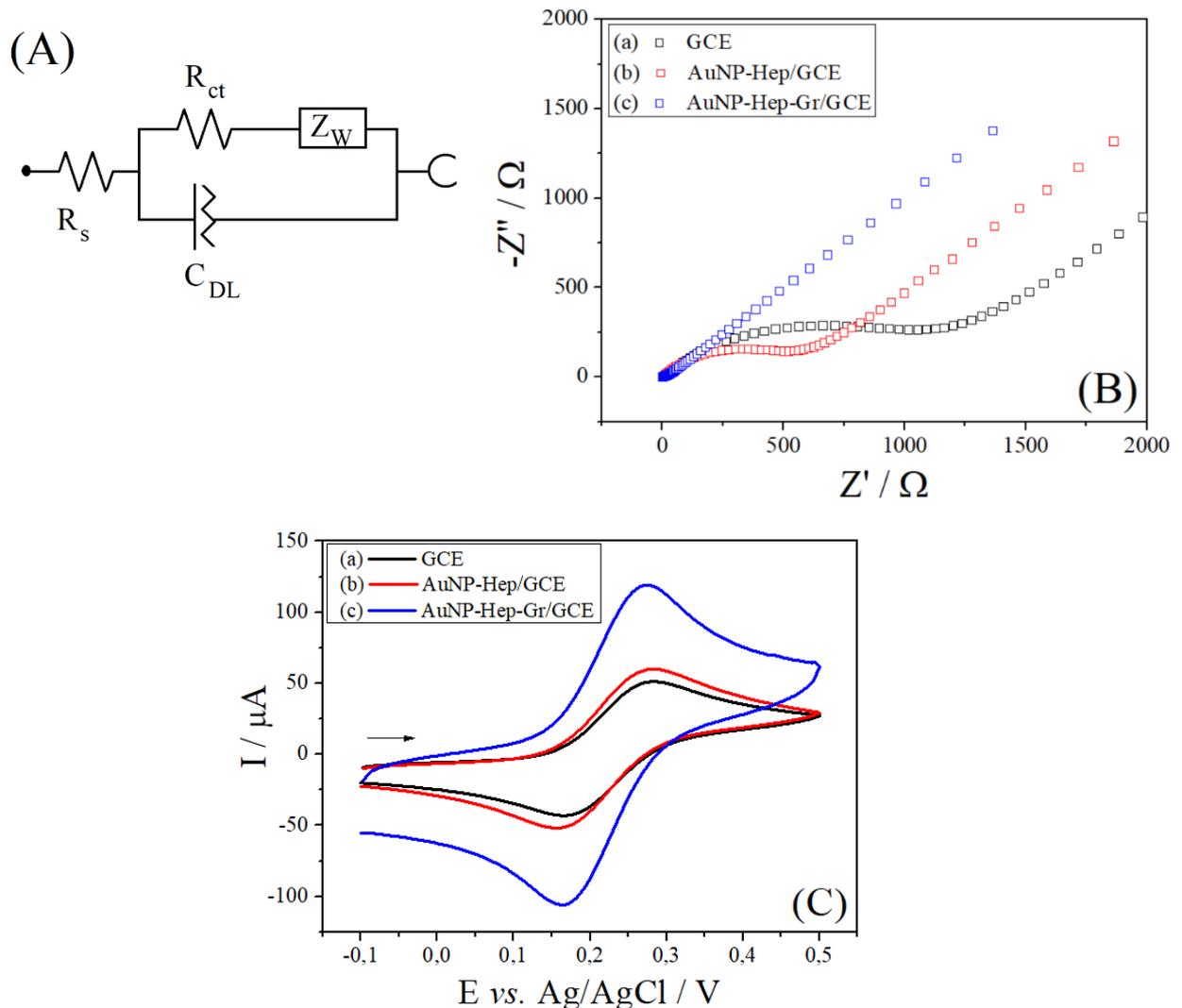
5.2 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DE NANOPARTÍCULAS DE OURO ESTABILIZADAS EM HEPARINA E ANCORADAS EM GRAFENO

Nesta seção são avaliados os comportamentos eletroquímicos dos eletrodos GCE (não modificado), AuNP-Hep/GCE e AuNP-Hep-Gr/GCE, quanto à resistividade e capacidade de transferência de elétrons, para tal propósito são empregadas as técnicas de EIS e CV.

No emprego de EIS é obtido o circuito de Randles, Figura 10A, que representa os fenômenos ocorridos na interface do eletrodo com a solução, onde as resistências são representadas pelos resistores R_{ct} (resistência a transferência de carga, associado ao eletrodo de trabalho), R_s (resistência da solução), Z_w (impedância de Warburg) e C_{dl} (capacitância da dupla camada). No diagrama de Nyquist tem-se em altas frequências o predomínio de R_s na impedância, em frequências intermediárias tem-se R_{ct} representado na forma de semicírculo,

onde o diâmetro deste equivale ao seu valor e, por último, em frequências mais baixas vê-se somente uma reta, apresentando ângulo próximo de 45° , que se deve a impedância do processo de difusão linear ou impedância de Warburg (RIBEIRO, 2020).

Figura 10 - (A) Circuito de Randles; (B) EIS para (a) GCE; (b) AuNP-Hep/GCE e (c) AuNP-Hep-Gr/GCE utilizando $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em faixa de frequência que compreende de $0,1$ a 100.000 Hz ; (C) Voltametria cíclica em sistema $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com (a) GCE; (b) AuNP-Hep/GCE e (c) AuNP-Hep-Gr/GCE.



Fonte: O autor.

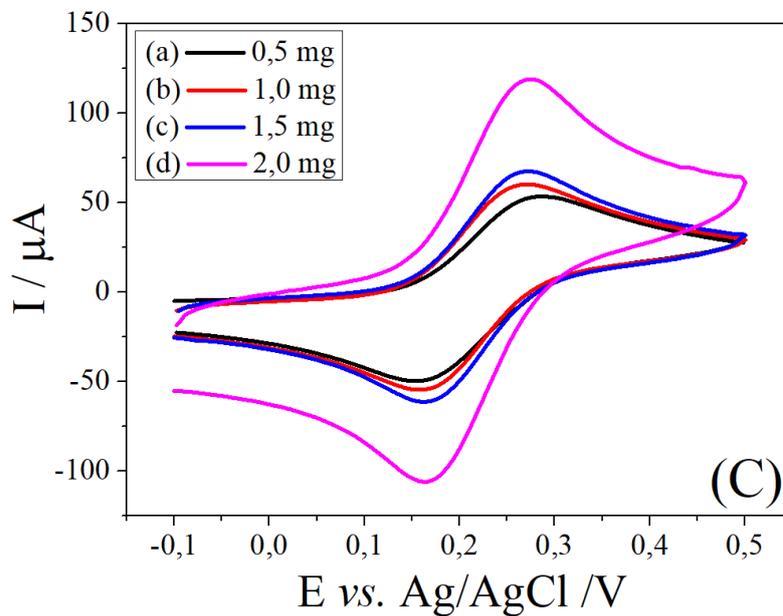
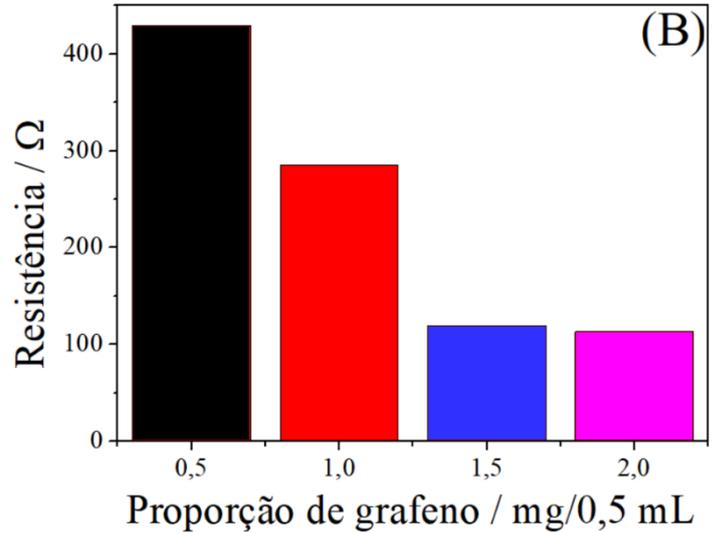
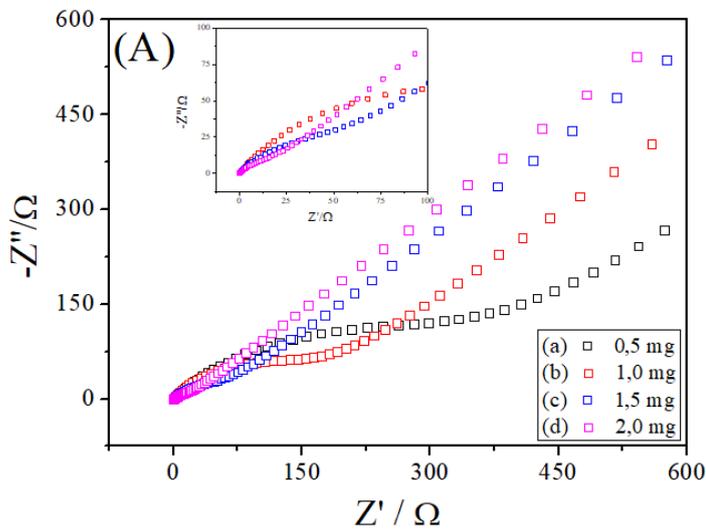
A Figura 10B mostra as medidas de EIS realizadas para os sensores (a) GCE não modificado, (b) AuNP-Hep/GCE e (c) AuNP-Hep-Gr/GCE utilizando $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ ($5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), a partir do diagrama de Nyquist ($-Z''$ vs. Z') é possível obter

informações sobre o comportamento da interface de cada um dos sensores quanto a resistência a transferência de carga (R_{ct}) através do diâmetro do semicírculo. Os espectros dos eletrodos modificados demonstraram conformidade com o circuito empregado, não sendo necessário o uso de componente de fase constante. Observa-se que, dentre os eletrodos analisados, o maior semicírculo obtido foi de GCE não modificado ($R_{ct} = 1,2 \text{ k}\Omega$), modificações empregadas posteriormente apresentaram decréscimo sucessivo da resistência. Com adição de AuNP-Hep e AuNP-Hep-Gr à superfície do GCE foram obtidos os valores de R_{ct} de $598,17 \text{ }\Omega$ e $113,4 \text{ }\Omega$, respectivamente. Assim, verifica-se que a diminuição da R_{ct} dos eletrodos modificados se deve ao emprego de materiais (AuNP e grafeno) cuja condutividade elétrica e área superficial são elevadas.

A Figura 10C mostra os voltamogramas cíclicos com os eletrodos empregados, e é possível observar o aumento de correntes anódica e catódica à medida em que a superfície do GCE é modificada. Inicialmente, com a modificação AuNP-Hep, há um aumento discreto na corrente e também no ΔE_p , passando de $0,117 \text{ V}$ para $0,124 \text{ V}$, quando comparado ao GCE. Para AuNP-Hep-Gr/GCE observa-se o decréscimo no ΔE_p ($0,112 \text{ V}$) e aumento da corrente, tanto anódica, quanto catódica em até duas vezes e meia. Assim, todos os eletrodos analisados apresentam uma reação quase reversível para o sistema de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, pois apresentam ΔE_p superior a $59,0 \text{ mV}$ (BARD e FAULKNER, 2001). Os dados de CV corroboram com os obtidos em EIS, indicando o eletrodo AuNP-Hep-Gr/GCE como a modificação mais adequada para aplicação eletroquímica na determinação de esculetina.

Visto a eficiência promovida por cada etapa da modificação em sistema $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, foram estudadas diferentes proporções de grafeno em volumes fixos de $0,5 \text{ mL}$ de dispersão de AuNP-Hep através de EIS (Figura 11A) e CV (Figura 11B). A Figura 11A demonstra o decréscimo na resistência do sensor à medida em que se acrescenta Gr à dispersão, assim, as adições de $0,5$, $1,0$, $1,5$ e $2,0 \text{ mg}$, tiveram $429,6$, $284,8$, $119,4$ e $113,4 \text{ }\Omega$, respectivamente. A proporção de 2 mg de Gr demonstrou o melhor desempenho, apresentando a menor resistência, de acordo com EIS, e maior corrente de pico em CV em solução $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$, conforme observado na Figura 11C.

Figura 11 - (A) Espectroscopia de impedância eletroquímica referente a (a) 0,5; (b) 1,0; (c) 1,5 e (d) 2,0 mg de grafeno utilizando $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em faixa de frequência que compreende de 0,1 a 100.000 Hz ; (B) Gráfico de barras representando as resistências das diferentes proporção de Gr; (C) Voltametria cíclica referente a (a) 0,5; (b) 1,0; (c) 1,5 e (d) 2,0 mg de grafeno utilizando $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$.



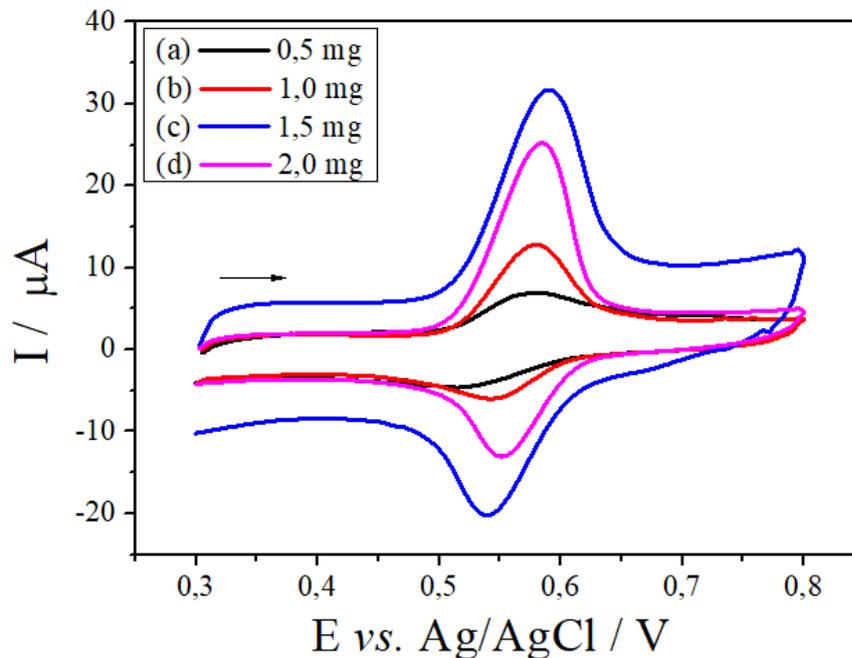
Fonte: O autor.

Posteriormente, para determinar a modificação mais apropriada, foram efetuados ensaios onde investigou-se os mesmos sensores em solução tampão B-R ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 2,0) de acordo com o comportamento eletroquímico da esculetina.

5.3 COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DA ESCULETINA

No desenvolvimento do AuNP-Hep-Gr/GCE para ESC foi avaliado a contribuição de diferentes massas de Gr (0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mg). Esse estudo foi realizado em solução tampão B-R ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 2,0) e esculetina ($25,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) usando a CV, conforme mostra a Figura 12. É possível observar o aumento progressivo nas correntes catódica e anódica, que atinge seu máximo quando foi usado 1,5 mg. Esse comportamento se justifica pelo acréscimo de Gr responsável pelo aumento na mobilidade dos elétrons e área superficial, como observado anteriormente na Figura 11. No entanto, apesar do efeito sinérgico observado em AuNP-Hep-Gr/GCE, o excesso de Gr gera a presença de maior número de folhas empilhadas, dificultando a condução dos elétrons no eletrodo e, desta maneira, ocasionando, a redução de corrente para a ESC.

Figura 12 - Voltamogramas cíclicos para eletrodos AuNP-Hep-Gr/GCE usando diferentes massas de Gr (a) 0,5, (b) 1,0, (c) 1,5 e (d) 2,0 mg em solução tampão BR ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 2,0), esculetina ($25,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) e registrados a 100 mVs^{-1} .

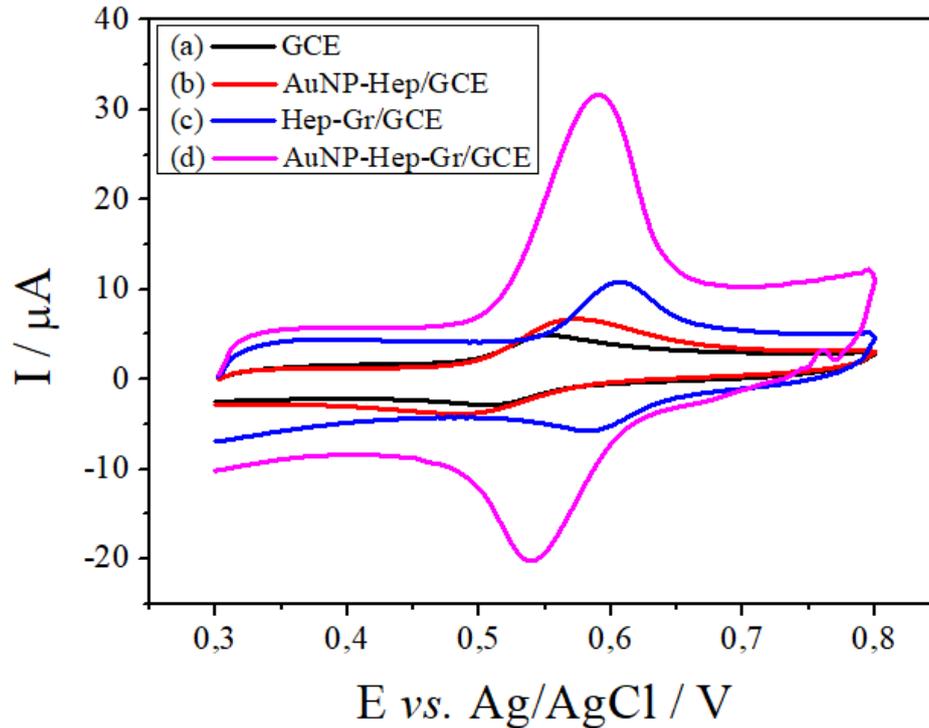


Fonte: O autor.

O comportamento da ESC foi verificado com a realização de medidas eletroquímicas de voltametria cíclica para quatro eletrodos diferentes. Os eletrodos utilizados foram: GCE, Hep-Gr/GCE, AuNP-Hep/GCE e AuNP-Hep-Gr/GCE (contendo 1,5 mg). A Figura 13 mostra

os quatro voltamogramas cíclicos obtidos com potencial de oxidação e redução bem definidos, indicando uma reação quase-reversível de ESC (LU *et al.*, 2011; ZAO *et al.*, 2013; BAO *et al.*, 2022).

Figura 13 - Voltamogramas cíclicos para a esculetina ($25,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) registrados em 100 mVs^{-1} com os eletrodos: (a) GCE, (b) AuNP-Hep/GCE, (c) Hep-Gr/GCE e (d) AuNP-Hep-Gr/GCE em solução tampão B-R ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 2,0).



Fonte: O autor.

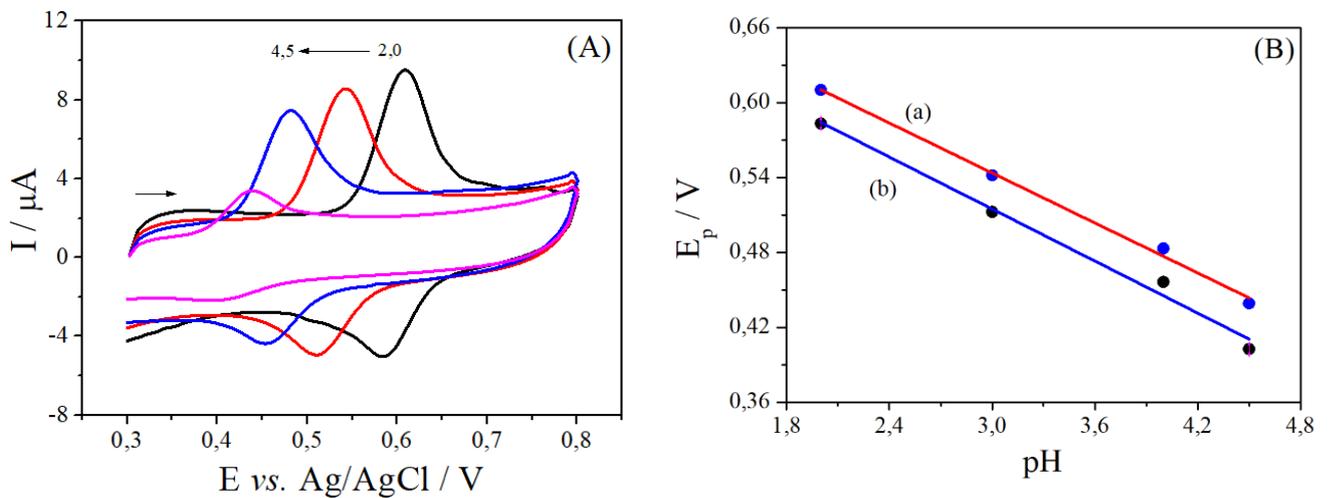
Pela análise dos voltamogramas é possível observar que o GCE, quando comparado aos outros eletrodos, obteve as menores correntes nos picos de oxidação e redução de ESC e ΔE_p de 46,4 mV. A adição de AuNP-Hep ao GCE provocou pequeno aumento nas correntes anódicas e catódicas, além do aumento do valor de ΔE_p (90,3 mV). O sensor Hep-Gr/GCE proporcionou corrente capacitiva no perfil voltamétrico, aumento das correntes anódica e catódica e diminuição no ΔE_p (22 mV). Em relação ao GCE, a modificação AuNP-Hep-Gr causou o aumento de ΔE_p (0,051 V), mantendo, ainda assim, a reação quase-reversível e com melhor definição, apresentando correntes de pico de até cento e dez vezes maior, o que torna a modificação propícia para a determinação deste analito.

A fim de avaliar os efeitos da variação de valor de pH, primeiramente foram analisados os comportamentos em solução tampão B-R entre os valores de pH de 2,0 a 4,5, como mostra

a Figura 14A. Esta faixa de pH foi escolhida visto o comportamento da ESC apresentada em outros trabalhos, onde observa-se uma queda nas intensidades de correntes de pico anódica e catódica conforme o aumento de pH da solução tampão, comportamento eletroquímico que evidencia a participação de prótons no processo redox (LU *et al.*, 2011; ZHAO *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2016; SHENG *et al.*, 2020).

Outro comportamento apresentado foi o deslocamento para potenciais menos positivos, como mostra a Figura 14B, onde obteve-se as relações lineares ($E_{po} (V) = -0,0667 \text{ pH} + 0,746$; $R^2 = 0,994$ e $E_{pr} (V) = -0,0694 \text{ pH} + 0,723$; $R^2 = 0,984$) com coeficientes angulares próximos do valor característico de $-59,2 \text{ mV pH}^{-1}$, o que permite afirmar a participação do mesmo número mols de elétrons e prótons, de acordo com a equação de Nernst, no processo de oxirredução de ESC no eletrodo AuNP-Hep-Gr/GCE (HOSSEINI *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2015).

Figura 14 - (A) Voltamogramas cíclicos gerados com uso de AuNP-Hep-Gr/GCE em diferentes valores de pH (2,0, 3,0, 4,0 e 4,5) de solução tampão B-R ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 2,0) contendo esculetina ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) e registrados a 100 mVs^{-1} e (B) Variação dos picos de (a) oxidação e (b) redução em função do pH.

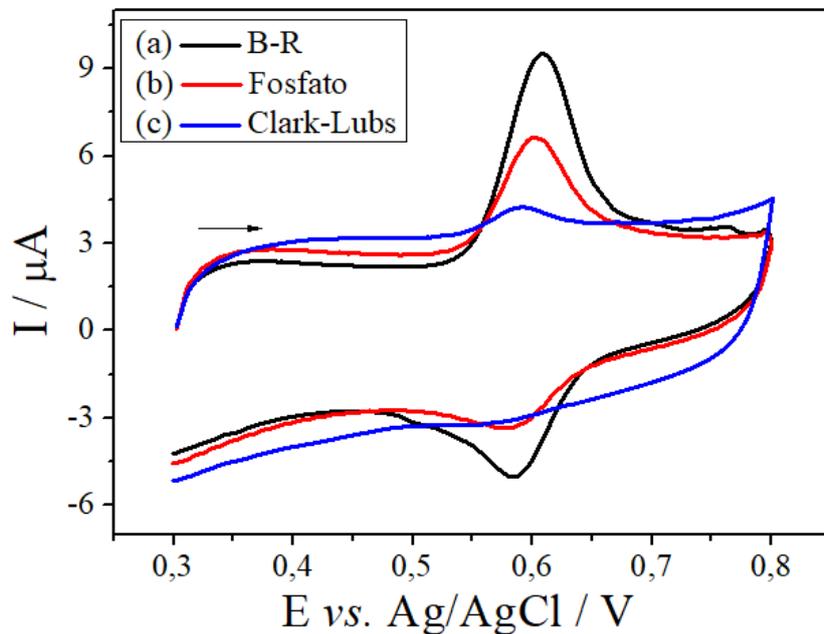


Fonte: O autor.

Verificado que o valor de pH 2,0 da solução tampão apresentou maiores valores de corrente, dessa forma, fez-se o estudo da natureza do eletrólito de suporte. Foram selecionadas três soluções tampão (B-R, fosfato e Clark-Lubs) de pH igual a 2,0 e concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo ESC ($10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$), como mostra os voltamogramas cíclicos da Figura 15. Nesse estudo a solução tampão Clark-Lubs apresentou as menores intensidades de I_{po} e I_{pr} , exibindo

pouca definição quanto aos potenciais de oxidação e redução de ESC devido às interações de íons cloreto, dificultando o processo redox, em contrapartida, para as soluções tampão fosfato e B-R, observam-se valores de I_{po} (corrente de pico de oxidação) e I_{pr} (corrente de pico de redução) mais bem definidos, sendo a solução tampão B-R, a responsável pela melhor corrente obtida. Assim, ensaios posteriores foram realizados utilizando somente a solução tampão B-R em pH 2,0.

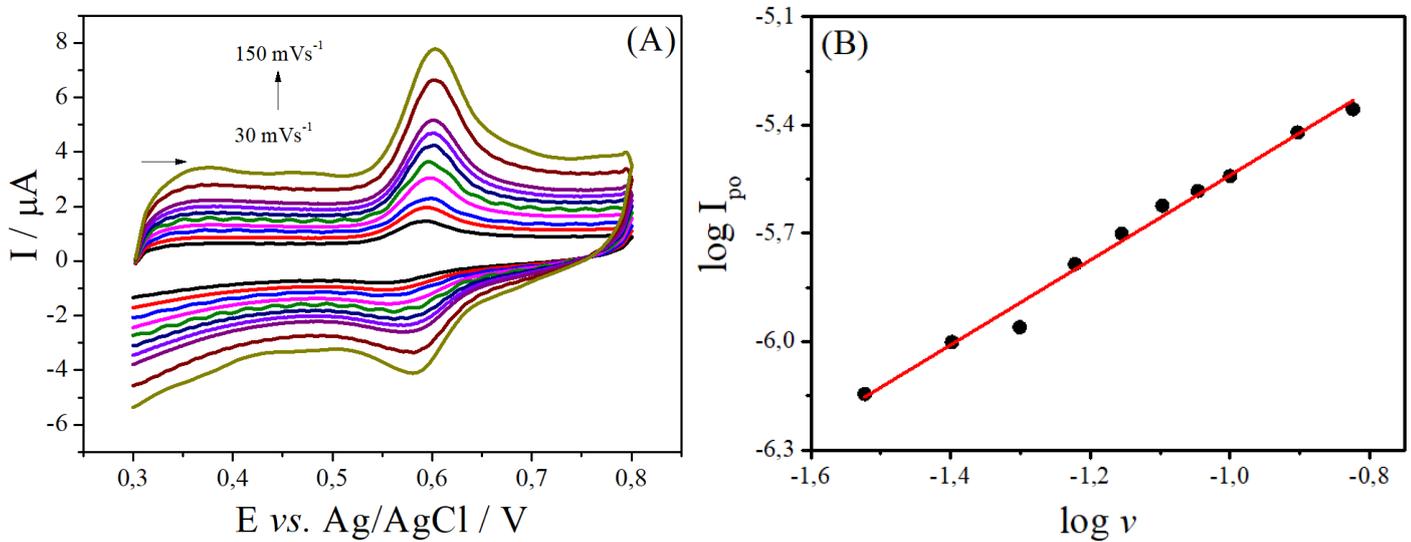
Figura 15 - Voltamogramas cíclicos em eletrólitos de suporte (a) B-R, (b) Fosfato e (c) Clark-Lubs de pH 2,0 e concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ na presença de esculetina ($10,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) utilizando o eletrodo AuNP-Hep-Gr/GCE.



Fonte: O autor.

Para determinar o processo eletroquímico envolvido na interação entre AuNP-Hep-Gr/GCE e a ESC foi realizado o estudo da influência da velocidade de varredura através de CV, em tampão BR ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 2,0) e ESC ($7,2 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$), como mostra a Figura 16A. As medidas foram realizadas na faixa de 30 a 150 mV s^{-1} , de forma que as correntes dos processos de oxidação e redução da ESC aumentaram linearmente com o aumento da velocidade de varredura, mantendo constantes E_{po} e E_{pr} . Através da análise de gráfico $\log I_p$ vs. $\log v$, plotado na Figura 16B, é possível definir a etapa mais lenta no processo de oxirredução do analito no eletrodo AuNP-Hep-Gr/GCE, dessa forma quando plotado, a existência de coeficiente angular próximo a 1 aponta um processo do tipo adsorptivo ocorrendo na superfície do eletrodo, representado pela equação da reta $\log I_{po} = 1,176 \log v - 4,36$ ($R^2 = 0,987$) (SHIH et al., 2004).

Figura 16 - (A) Voltamogramas cíclicos com velocidades de varredura entre 30 e 150 mVs⁻¹, solução tampão B-R (0,1 mol L⁻¹; pH 2,0) e ESC (7,2 μmol L⁻¹); (B) Gráfico log I_{po} vs. log v.



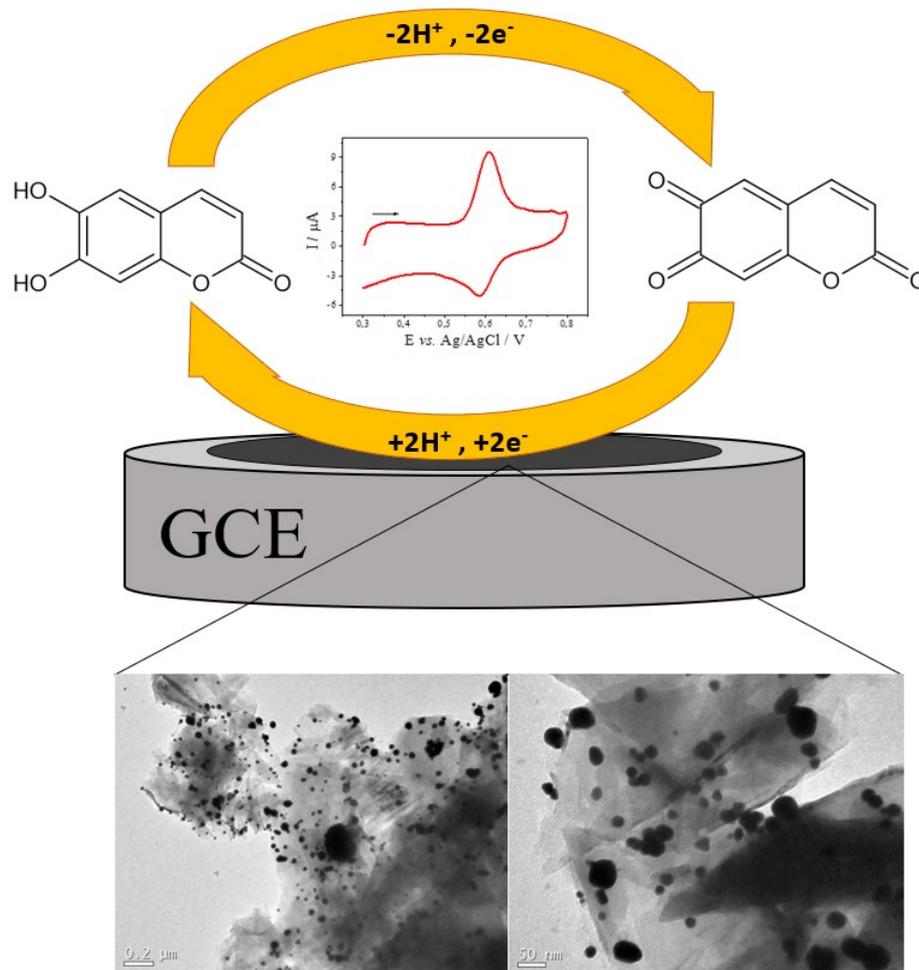
Fonte: O autor.

Tratando-se de uma reação quase-reversível controlada por adsorção, os voltamogramas de velocidade e seus potenciais de meia onda ($E_{p/2}$) foram analisados conforme Equação 1, onde tem-se z como número mols de elétrons, R como constante dos gases, F como constante de Faraday e T como temperatura em Kelvin, resultando, assim, no número de dois elétrons envolvidos na reação de oxirredução. O estudo de pH (Figura 14B), a partir do seu coeficiente angular de 66,7 mV pH⁻¹, caracteriza a participação de mesmo número de prótons e elétrons no processo redox de ESC no eletrodo AuNP-Hep-Gr/GCE, assim sendo, tem-se a participação de dois prótons e dois elétrons na reação de oxirredução de ESC (Figura 17) (BARD e FAULKNER, 2001). Autores como Lu e colaboradores (2011) e Sheng e colaboradores (2020) concordam com esse mecanismo realizado somente em uma etapa, sem existência de moléculas intermediárias, com o envolvimento de dois elétrons e dois prótons.

$$E_p - E_{p/2} = 2,20 \frac{RT}{zF}$$

Equação 1

Figura 17 - Representação do processo redox da esculetina na superfície do eletrodo modificado AuNP-Hep-Gr/GCE.

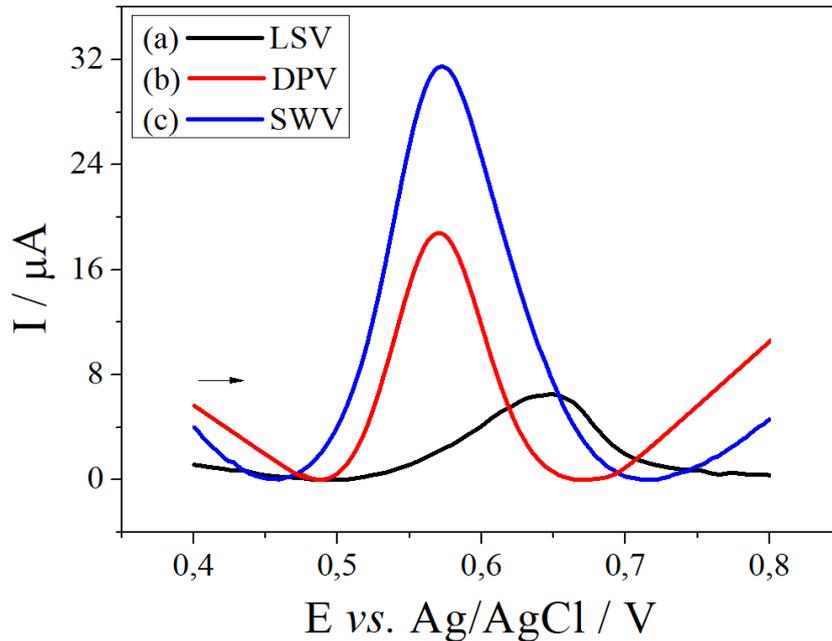


Fonte: O autor.

5.4 TÉCNICA ELETROANALÍTICA

Para definir a técnica mais adequada para o desenvolvimento do método de determinação de esculetina em amostras comerciais, realizou-se um estudo comparativo entre três técnicas voltamétricas. Foram aplicados potenciais entre +0,4 e +0,8 V e parâmetros que correspondem à mesma velocidade de varredura, solução tampão B-R ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 2,0) e ESC ($1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$), assim, avaliou-se a magnitude de corrente obtida nas técnicas de voltametria de varredura linear (LSV – do inglês, *linear sweep voltammetry*), pulso diferencial (DPV – do inglês, *differential pulse voltammetry*) e onda quadrada (SWV – do inglês, *square wave voltammetry*) (Figura 18).

Figura 18 - Comparação da intensidade de corrente adquirida empregando (a) LSV, (b) DPV e (c) SWV em solução tampão B-R ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 2,0) com esculetina ($1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$).

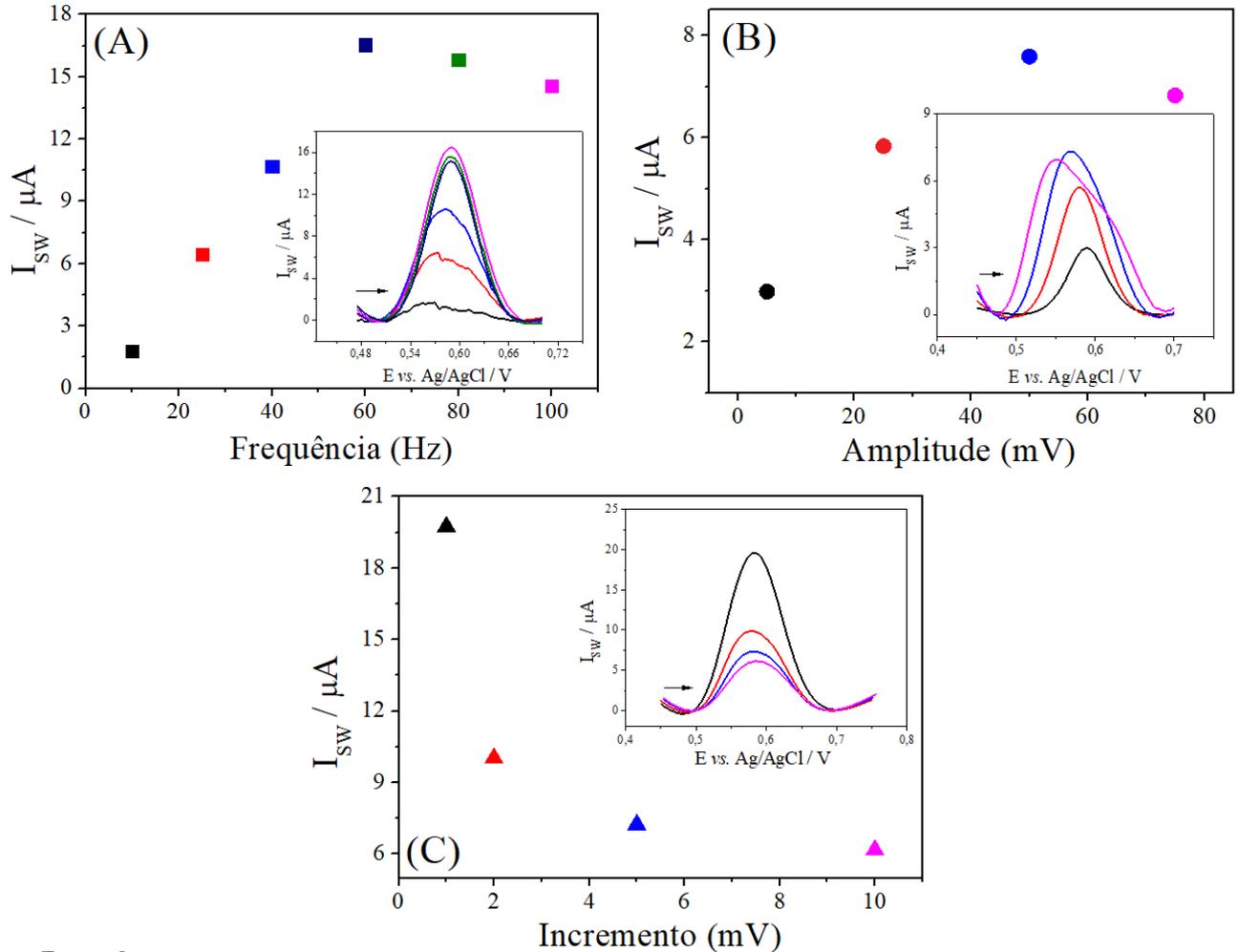


Fonte: O autor.

Na Figura 18, dentre as técnicas voltamétricas avaliadas, a LSV é aquela que apresenta menor sinal de corrente para ESC ($6,5 \text{ } \mu\text{A}$), em potencial superior às outras técnicas analisadas, observa-se ainda, que a DPV apresenta sinal de corrente superior em aproximadamente três vezes ($18,8 \text{ } \mu\text{A}$) quando comparada à LSV e inferior à SWV. Tratando-se de uma reação quase-reversível, como apontado na seção 5.3, espera-se que SWV seja a técnica que apresente maior sinal de corrente, pois a corrente resultante obtida em potencial de $+0,57 \text{ V}$ é produto da diferença entre I_{p0} e I_{pr} , cuja resultante, como mostra a Figura 18, é de aproximadamente $31,5 \text{ } \mu\text{A}$.

Partindo dessa análise, adotou-se a técnica SWV para o desenvolvimento da metodologia, assim, foram otimizados os três parâmetros da técnica (frequência, amplitude e incremento), a fim de obter o maior sinal de corrente e, conseqüentemente, maior sensibilidade. Os voltamogramas resultantes da otimização da técnica (Figura 19) foram obtidos a partir da aplicação dos seguintes intervalos: frequência de pulso entre 10 e 100 Hz, amplitude de pulso entre 10 e 80 mV e incremento de potencial entre 1 e 10 mV. Cada parâmetro foi avaliado independentemente mantendo outros dois parâmetros em valores fixos.

Figura 19 - Voltamogramas de onda quadrada com as variações dos parâmetros (A) Frequência, (B) Amplitude e (C) Incremento.



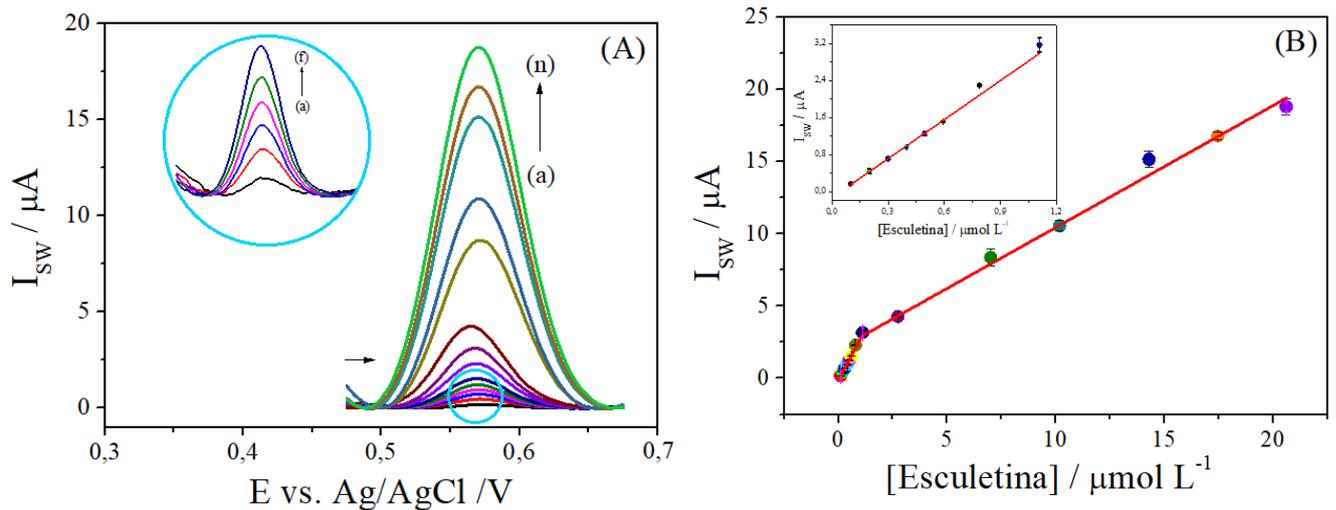
Fonte: O autor.

Os valores dos parâmetros de SWV foram avaliados de acordo com o sinal de corrente e perfil do voltamograma, assim, foram escolhidos frequência, amplitude e incremento nos valores de 60 Hz, 50 mV e 1,0 mV, respectivamente. Assim, nos estudos posteriores foram utilizados tais valores de parâmetros de SWV, juntamente a outros parâmetros já definidos, dentre eles eletrólito de suporte B-R (0,1 mol L⁻¹; pH 2,0) e massa de grafeno de 1,5 mg/0,5 mL.

5.5 CURVA DE CALIBRAÇÃO

Utilizando os parâmetros otimizados foi construída uma curva de calibração (Figura 20) através da adição sucessiva de alíquotas de esculetina e varredura entre os potenciais +0,3 e +0,8 V, foram obtidas duas faixas lineares a primeira de $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $1,11 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($I_{\text{sw}} / \mu\text{A} = 2,812 [\text{esculetina}] - 0,133 \times 10^{-6}$; $R^2 = 0,992$) e a segunda de $1,11 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $20,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($I_{\text{sw}} / \mu\text{A} = 0,844 [\text{esculetina}] - 2,00 \times 10^{-6}$; $R^2 = 0,997$). Os limites de detecção e quantificação foram calculados a partir da primeira reta e apresentaram os valores de $46,3 \text{ nmol L}^{-1}$ e 140 nmol L^{-1} , respectivamente. A existência de duas retas pode indicar a saturação das AuNP-Hep depositadas sobre o Gr por moléculas de esculetina.

Figura 20 - (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando os parâmetros otimizados com as seguintes concentrações de esculetina: (a) 0,1; (b) 0,2; (c) 0,298; (d) 0,396; (e) 0,495; (f) 0,592; (g) 0,787; (h) 1,11; (i) 2,74; (j) 7,00; (k) 10,1; (l) 14,3; (m) 17,4 e (n) $20,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ e (B) Curva de calibração obtida ($n = 3$).



Fonte: O autor.

A Tabela 4 mostra o desempenho analítico, incluindo LOD e faixa linear para ESC, de eletrodos cujos trabalhos foram publicados recentemente à base de nanopartículas metálicas, alótropos de carbono e polímeros na detecção de ESC. Observa-se que o LOD obtido a partir do eletrodo AuNP-Hep-Gr/GCE se encontra entre os valores publicados na literatura, o que demonstra a capacidade do eletrodo desenvolvido na detecção deste analito, além disto, dentre os analisados, é aquele que possui o menor número de etapas na modificação do eletrodo de trabalho.

Tabela 4 - Comparação de diferentes eletrodos aplicados na determinação de esculetina.

Técnica	Eletrodo	Sensibilidade	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LOD (nmol L^{-1})	Referência
DPV	CuS-GN/GCE ^a	0,4851	0,10-100	58,0	ZHAO <i>et al.</i> , 2013
LSV	ERGO/GCE ^b	0,8915	0,04-5,0	20,0	LI <i>et al.</i> , 2015
DPV	TiO ₂ -PDDA-Gr/GCE ^c	11,79	0,01-3,50	4,0	LI <i>et al.</i> , 2016
DPV	c-SWCNTs-NF- AuNs/GCE ^d	1,032	0,004-55	1,2	YAO <i>et al.</i> , 2016
DPV	Poly(L-lanthionine)/GCE ^e	0,539	0,005-0,1	1,0	SHENG <i>et al.</i> , 2020
DPV	NUGDY/CILE ^f	28,55	0,02-10,0	2,3	YAN <i>et al.</i> , 2022
DPV	PtNPS/AuNPs/CFME ^g	3,3834	0,04-10	3,6	BAO <i>et al.</i> , 2022
SWV	AuNP-Hep-Gr/GCE	2,812	0,10-20,5	46,0	Este trabalho

^a Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de monossulfeto de cobre depositados em grafeno;

^b Eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno reduzido;

^c Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de dióxido de titânio com poli(cloreto de dialildimetilamônio) funcionalizados em grafeno;

^d Eletrodo de carbono vítreo modificado com monocamada de nanotubos de carbono com nanopartículas de ouro em Nafion;

^e Eletrodo de carbono vítreo modificado a partir da eletropolimerização de L-lantionina;

^f Eletrodo de pasta de carbono com líquido modificado com grafidino ultrafino dopado com átomos de nitrogênio com hibridização *sp*;

^g Microeletrodo de fibra de carbono modificado com nanopartículas de platina e ouro;

Trabalhos como os de Yao e colaboradores (2016) e Bao e colaboradores (2022) mostram o potencial na utilização de AuNPs como agentes na modificação de sensores voltamétricos da determinação de esculetina, contudo, a presença de espécies de grafeno associadas ou não a nanopartículas metálicas desempenham papel importante no aumento da sensibilidade do sensor ocasionando a diminuição do LOD.

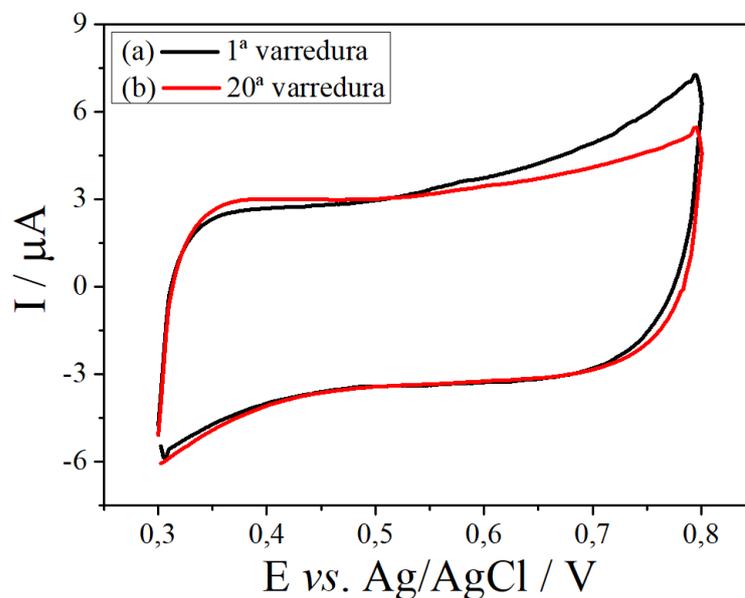
5.6 CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS

Avaliou-se a estabilidade do filme produzido por AuNP-Hep-Gr a partir da aplicação de CV em vinte ciclos ($n = 4$), somente na presença da solução tampão B-R ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 2,0), como observado na Figura 21. Foram analisadas as correntes obtidas em potenciais onde ocorrem oxidação (+0,61 V) e redução (+0,58 V) de ESC, na primeira e última varredura. De acordo com Chitravathi e colaboradores (2012), desta forma é possível definir a taxa de

lixiviação ou degradação do material com o qual o GCE foi modificado. O voltamograma obtido apresentou queda de corrente nos potenciais de oxidação e redução nos valores de 9,7% e 6,3%, respectivamente, indicando assim, a estabilidade do eletrodo nesta solução tampão.

O sensor voltamétrico para ESC, AuNP-Hep-Gr/GCE, também foi avaliado quanto a repetibilidade intra-dia, assim foram realizados cinco ensaios, utilizando solução tampão B-R ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 2,0) e solução $20,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de ESC. A análise das correntes de pico obtidas por SWV nos cinco ensaios realizados resultou em desvio padrão relativo de 4,50%, atestando, assim, repetibilidade satisfatória do sensor voltamétrico proposto.

Figura 21 – Voltamograma da primeira varredura (a) e da vigésima varredura (b) utilizando AuNP-Hep-Gr/GCE em solução tampão B-R ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 2,0).



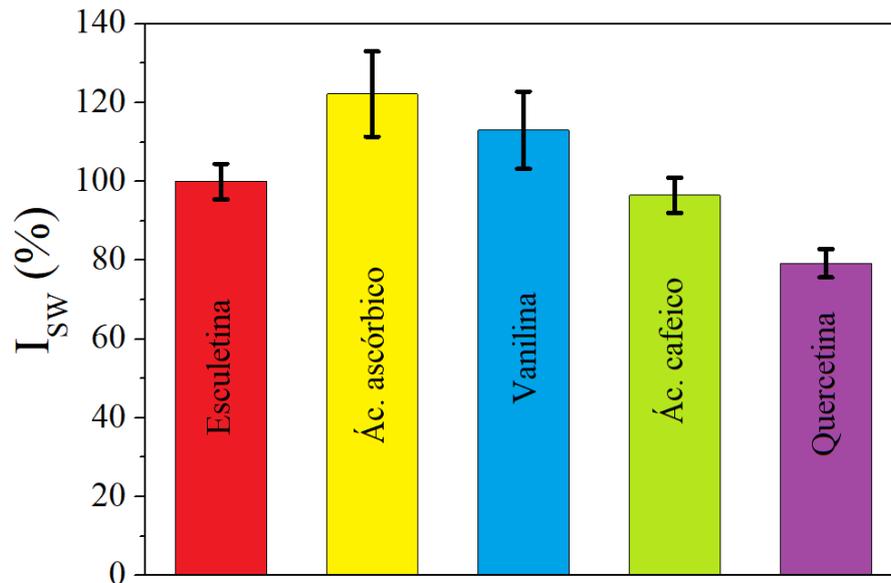
Fonte: O autor.

5.7 ESTUDO DE INTERFERENTES

Para avaliar possíveis interferências nas medidas eletroquímicas de ESC utilizando o eletrodo AuNP-Hep-Gr/GCE, foram selecionados os principais compostos presentes em folhas e frutos de *Morus alba* L. (amora branca) (ZAFAR *et al.*, 2013). Com os compostos selecionados (quercetina, ácido ascórbico, ácido cafeico e vanilina) foram realizados estudos por SWV em que essas moléculas se encontravam na proporção 1:5 (ESC:interferente) em solução tampão B-R ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 2,0). Substâncias como ácido ascórbico e quercetina influenciaram significativamente na corrente obtida, com alteração de corrente superior a 10%,

demonstrando queda de $21,2 \pm 3,6\%$ na corrente, em contrapartida, o ácido ascórbico proporcionou o aumento na corrente de pico de $22,2 \pm 10,8\%$ (Figura 22). Para os demais interferentes estudados, vanilina e ácido cafeico, não foram observadas interferências significativas (mudança do sinal $< 10\%$) para ESC utilizando eletrodo AuNP-Hep-Gr/GCE.

Figura 22 - Gráfico de colunas representando a corrente de pico de esculetina em percentual na presença de outros compostos cinco vezes mais concentrados ($n = 3$).



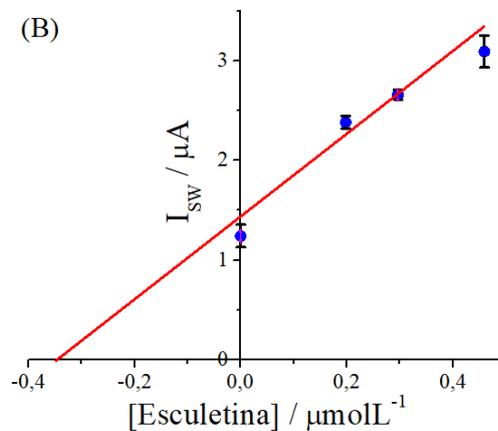
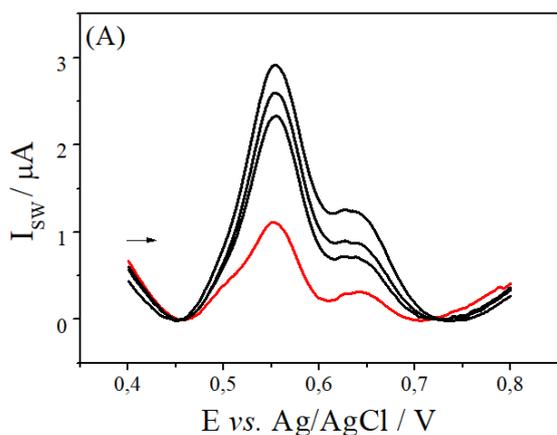
Fonte: O autor.

5.8 DETERMINAÇÃO DE ESCULETINA E ESTUDO DE RECUPERAÇÃO

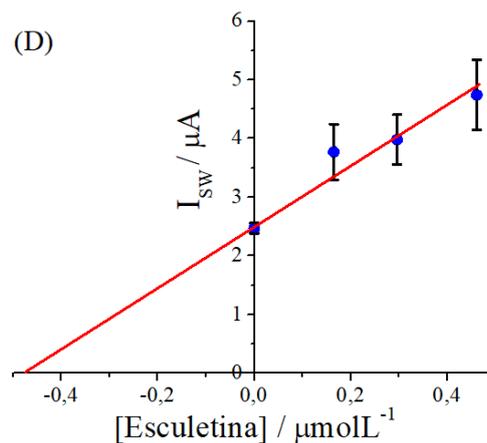
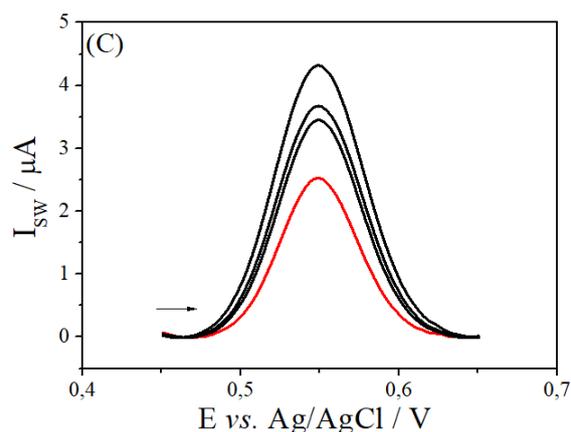
A determinação e o estudo de recuperação em amostras comerciais foram realizados com adição de padrão de esculetina em uma célula eletroquímica contendo 15 mL de eletrólito de suporte e 100 μL da amostra (chá e pó folhas de amora branca e geleia). Na Figura 23 são apresentados os voltamogramas obtidos na análise das amostras selecionadas, exibindo sinal voltamétrico em +0,56 V referente a ESC. As determinações realizadas em duplicata, obtiveram os valores médios de $157,70 \pm 2,65 \mu\text{g/g}$ de chá, $211,10 \pm 6,72 \mu\text{g/g}$ em pó de folhas de amora branca e $9,80 \pm 0,15 \mu\text{g/g}$ em geleia. De acordo com Yun e colaboradores (2012) são encontradas maiores concentrações de ESC nas folhas de amora branca em relação às outras partes da mesma planta.

Figura 23 - Voltamogramas de onda quadrada em frequência de 60 Hz, amplitude de 50 mV e incremento de 1,0 mV em solução tampão B-R ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 2,0) e curvas de adição de padrão das amostras de (B) chá comercial, (D) chá de pó de folhas de amora branca e (F) geleia de amora.

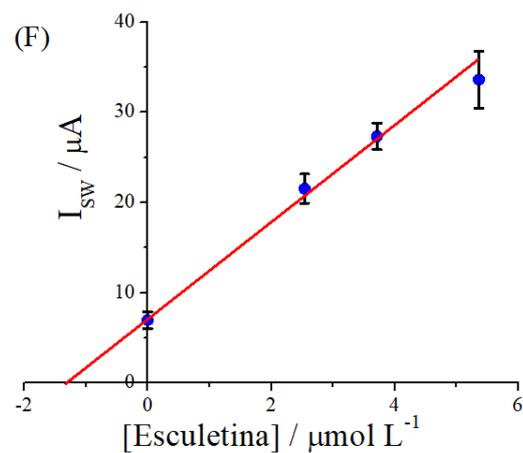
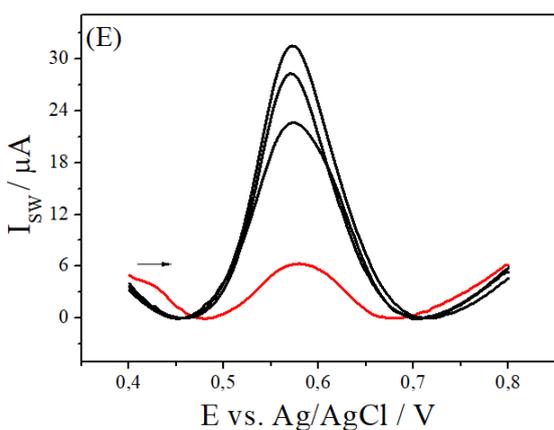
CHÁ COMERCIAL DE AMORA BRANCA



CHÁ DE PÓ DE FOLHAS DE AMORA BRANCA



GELEIA DE AMORA



Fonte: O autor.

Utilizando as mesmas amostras, o eletrodo proposto, AuNP-Hep-Gr/GCE, foi avaliado em estudo de adição e recuperação de ESC. As amostras foram fortificadas com três quantidades diferentes e conhecidas de ESC ($2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) e medidas de SWV foram realizadas em triplicada (Tabela 3).

Tabela 5 – Determinação e estudo de recuperação de teor de fenóis expressas em concentração de esculetina em amostras de chá e pó de folhas de amora e geleia de amora usando AuNP-Hep-Gr/GCE (n = 3).

Amostra	Esculetina ($\mu\text{mol L}^{-1}$)			Recuperação (%)
	Determinada	Adicionada	Recuperada	
Chá comercial		0,67	$0,65 \pm 0,04$	97,0
de amora	$0,352 \pm 0,006$	7,44	$7,48 \pm 0,19$	100,6
branca		12,0	$11,8 \pm 0,4$	98,3
Chá de pó de		0,73	$0,72 \pm 0,05$	98,6
folhas de	$0,471 \pm 0,015$	2,60	$2,58 \pm 0,07$	93,6
amora branca		14,0	$13,8 \pm 0,12$	90,6
Geleia de		1,74	$1,68 \pm 0,05$	96,5
amora	$1,32 \pm 0,02$	8,53	$8,74 \pm 0,09$	102,5
		13,5	$12,5 \pm 0,3$	92,6

O método de adição e recuperação serve de avaliação para um processo analítico, constituindo uma etapa importante pois denota a exatidão do método analítico. A recuperação da esculetina foi efetuada para as três amostras em concentrações inseridas na curva de calibração (Figura 20B). Os percentuais de recuperação obtidos variam entre 90,6 e 102,5%, demonstrando, assim, a baixa interferência das matrizes das amostras, mesmo apresentando concentrações elevadas dos interferentes quercetina e ácido ascórbico (Figura 22), e exatidão satisfatória a partir do emprego do eletrodo AuNP-Hep-Gr/GCE na quantificação de ESC nas amostras (ZAFAR *et al.*, 2013).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho foi desenvolvido a partir da modificação de um eletrodo de carbono vítreo com nanopartículas de ouro estabilizadas em heparina ancoradas em grafeno para quantificação de ESC em amostras comerciais.

Através de imagens de TEM foram estimados os diâmetros médios das AuNP-Hep, ainda utilizando a mesma técnica, foi possível observar que a introdução de Gr auxiliou na diminuição de tamanho e distribuição espacial das AuNP-Hep, diminuindo o número de aglomerações. A formação de nanocompósitos em Gr refletiu de maneira positiva o comportamento do sensor eletroquímico, diminuindo, substancialmente, a sua resistência à condução de elétrons.

O processo de oxirredução da esculetina na superfície do sensor eletroquímico AuNP-Hep-Gr/GCE foi determinado através de estudos de CV, o qual permitiu concluir tratar-se de um processo regido por adsorção, quase-reversível, apresentando na reação de oxirredução dois mols de elétrons e dois mols de prótons por mol de ESC.

O sinal analítico à ESC se mostrou mais eficiente em pH igual a 2,0, o aumento do pH mostrou a perda gradual de corrente e deslocamento linear dos potenciais de oxidação e redução, com este estudo obteve-se o melhor desempenho em pH igual a 2,0 em solução tampão B-R 0,1 mol L⁻¹.

No desenvolvimento da metodologia foram analisadas três técnicas voltamétricas, dentre as quais a voltametria de onda quadrada apresentou performance superior em frequência de 60 Hz, amplitude de 50 mV e incremento de 1 mV. Obteve-se a partir da curva de calibração LOD de 46 nmol L⁻¹ e LOQ de 140,0 nm L⁻¹.

A metodologia se mostrou precisa quanto a repetibilidade, apresentando desvio padrão de 4,5%. Dentre os possíveis interferentes estudados, ácido cafeico e vanilina foram os que apresentaram alteração no sinal de corrente inferior a 10%, enquanto ácido ascórbico e quercetina influenciaram promovendo aumento e diminuição da corrente em mais de 10%, respectivamente.

O desenvolvimento da curva de calibração permitiu a determinação de ESC em amostras comerciais como chá e pó de folhas de amora branca e geleia de amora. Em ensaios de recuperação para essas mesmas amostras foram obtidos valores de recuperação de ESC satisfatórios no intervalo de 90,6 a 102,5%, o que demonstra boa exatidão do método desenvolvido sem grande interferência de moléculas como ácido ascórbico ou quercetina.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Como perspectivas futuras ao desenvolvimento deste trabalho se encontram o estudo de diferentes materiais carbonáceos junto às AuNPs e o estabilizante heparina, formação de novos nanocompósitos com outras nanopartículas metálicas, e como estas modificações podem influenciar na estabilidade do filme sobre o GCE.

Além disso, a avaliação de novos interferentes de moléculas com estrutura semelhante à apresentada pela ESC, principalmente esculina, fraxina e fraxetina, assim como outros componentes de alta concentração em galhos de amora branca, como a rutina, pode ser raciocinado como uma nova fonte de estudo.

A determinação simultânea de ESC e o glicosídeo esculetina-7-O-glicuronídeo são também raciocinados como futuro trabalho para que se possa determinar ambos os analitos em amostras biológicas, para avaliar o efeito da ESC no sistema gastrointestinal.

REFERÊNCIAS

- AHMAD EL-SOHAIFY, S. et al. Biochemical and functional properties of *Moringa oleifera* leaves and their potential as a functional food, **Global Advanced Research Journal of Agricultural Science**, v. 4, n. 4, p. 188-199, 2015.
- AKŠIĆ, M.F.; NEŠOVIĆ, M.; ĆIRIĆ, I.; TEŠIĆ, Ž.; PEZO, L.; TOSTI, T.; GAŠIĆ, U.; DOJČINOVIĆ, B.; LONČAR, B.; MELAND, M. Chemical fruit profiles of different raspberry cultivars grown in specific Norwegian agroclimatic conditions. **Horticulture**, v. 8, n. 765, 2022.
- ALÁEZ-VERSÓN, C. R.; LANTERO, E.; FERNÁNDEZ-BUSQUETS, X. Heparin: New life for an old drug, **Nanomedicine Future Medicine Ltd.**, 2017.
- ALAM, S.; SARKER, M.; SULTANA, T.; CHOWDHURY, N.; RASHID, M.; CHAITY, N.; ZHAO, C.; XIAO, J.; HAFEZ, E.; KHAN, S.; MOHAMED, I. Antidiabetic phytochemicals from medicinal plants: prospective candidates for new drug discovery and development. **Frontiers in Endocrinology**, v. 13, 2022.
- ALY, A.A.; GÓRECKI, T. Green comprehensive two-dimensional liquid chromatography (LC X LC) for the analysis of phenolic compounds in grape juices and wine. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 2022.
- ANCILLOTTI, C.; CIOFI, L.; PUCCI, D.; SAGONA, E.; GIORDANI, E.; BIRICOLTI, S.; GORI, M.; PETRUCCI, W.A.; GIARDI, F.; BARTOLETTI, R.; CHIUMINATTO, U.; ORLANDINI, S.; MOSTI, S.; DEL BUBBA, M. Polyphenolic profiles and antioxidant and antiradical activity of Italian berries from *Vaccinium myrtillus* L. and *Vaccinium uliginosum* L. subsp. *gaultheriodes* (Bigelow) S.B. Young. **Food Chemistry**, v. 204, p. 176-184, 2016.
- ANIK, M. I. et al. Gold nanoparticles (GNPs) in biomedical and clinical applications: A review. **Nano Select**, v. 3, n. 4, p. 792–828, 2022.
- ANTHONY, E. et al. Agro Waste Utility View project Pulverized *Mangifera indica* (mango) seed-kernel modulated serum lipid profile in monosodium glutamate-challenged rats. **Journal of Applied Biotechnology**, v. 5, n. 2, 2017.
- BAO, C. et al. Simultaneous determination of aesculin and aesculetin and their interactions with DNA using carbon fiber microelectrode modified by Pt–Au bimetallic nanoparticles. **Analytica Chimica Acta**, v. 1202, n. 15, 2022.
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**, 2^a ed. New York: John Wiley & Sons Inc, 2001.
- BOLLELLA, P. et al. Beyond graphene: Electrochemical sensors and biosensors for biomarkers detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 89, p. 152-166, 2017.

- CAO, R.; LI, B. A simple and sensitive method for visual detection of heparin using positively-charged gold nanoparticles as colorimetric probes. **Chemical Communications**, v. 47, n. 10, p. 2865–2867, 2011.
- CHEN, C. et al. *Morus alba* L. Plant: Bioactive compounds and potential as a functional food ingredient. **Foods**, v. 10, n. 3, 2021.
- CHEN, Y. et al. Esculetin Ameliorates Psoriasis-like skin disease in mice by inducing CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 2018.
- CHEN, Z.; XIE, M.; ZHAO, F.; HAN, S. Application of nanomaterial modified aptamer-based electrochemical sensor in detection of heavy metal ions. **Foods**, v. 11, n. 1404, 2022.
- CHIORCEA-PAQUIM, A. M. et al. Natural phenolic antioxidants electrochemistry: Towards a new food science methodology. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 4, p. 1680–1726, 2020.
- CHITRAVATHI, S.; SWAMY, B.E.K.; MAMATHA, G.P.; SHERIGARA, B.S. Electrochemical behavior of poly (naphthol green B)-film modified carbon paste electrode and its application for the determination of dopamine and uric acid. **Journal of Electrochemical Chemistry**, v. 667, p. 66-75, 2012.
- CUI, L.; LIU, Y.; LIU, M.; REN, M.; AHMED, A.F.; KANG, W. Identification of phytochemicals from *Lentinus edodes* and *Airicularia auricula* with UPLC-Q-Exactive orbitrap MS. **Journal of Future Foods**, v. 2-3, p. 253-260, 2022.
- CVETKOVIĆ, M.; KOČIĆ, M.; ZAGORAC, D.D.; ĆIRIĆ, I.; NATIĆ, M.; HAJDERM, Đ.; ŽIVOTIĆ, A.; AKŠIĆ, M.F. When is the right moment to pick blueberries? Variation in agronomic and chemical properties of blueberry (*Vaccinium corymbosum*) cultivars at different harvest times. **Metabolites**, v. 12, n. 798, 2022.
- DEL RIO SANCHO, S. et al. Evaluation of percutaneous absorption of esculetin: Effect of chemical enhancers. **Planta Medica**, v. 79, n. 2, p. 131–136, 2013.
- DRESLER, S.; BOGUĆKA-KOCKA, A.; KOVÁČIK, J.; KUBRAK, T.; STRZEMSKI, M.; WÓJCIAK-KOSIOR, M.; RYSIAK, A.; SOWA, I. Separation and determination of coumarins including furanocoumarins using micellar electrokinetic capillary chromatography. **Talanta**, v. 187, p. 120-124, 2018.
- DUAN, J.; SHI, J.; MA, X.; XUAN, Y.; LI, P.; WANG, H.; FAN, Y.; GONG, H.; WANG, L.; PANG, Y.; PANG, S.; YAN, Y. Esculetin inhibits proliferation, migration, and invasion of clear cell renal cell carcinoma cells. **Biomedicine & Pharmacology**, v. 124, 2020.
- EYDURAN, S.P.; ERCISLI, S.; AKIN, M.; BEYHAN, O.; GECER, M.K.; EYDURAN, E.; ERTURK, Y.E. Organic acids, sugars, vitamin C, antioxidant capacity, and phenolic compounds in fruits of white (*Morus alba* L.) and black (*Morus nigra* L.) mulberry genotypes. **Journal of applied botany and food quality**, v. 88, p. 134-138, 2015.

FAHMY, H. M. et al. Recent Progress in Graphene- and Related Carbon-Nanomaterial-based Electrochemical Biosensors for Early Disease Detection. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 8, n. 3, p. 964–1000, 2022.

FRITEA, L. et al. A gold nanoparticles - Graphene based electrochemical sensor for sensitive determination of nitrazepam. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 830-831, p. 63–71, 2018.

FU, L. et al. Graphene-based electrochemical sensors for antibiotic detection in water, food and soil: A scientometric analysis in CiteSpace (2011–2021). **Chemosphere**, v. 297, 2022.

FU, S. et al. Multi-responses extraction optimization based on response surface methodology combined with polarity switching HPLC-MS/MS for the simultaneous quantitation of 11 compounds in *Cortex Fraxini*: Application to four species of Cortex Fraxini and its 3 confusable species. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 91, p. 210–221, 2014.

GAN, Z. et al. Determination of bioactive constituents in Flos Sophorae Immaturus and Cortex Fraxini by capillary electrophoresis in combination with far infrared-assisted solvent extraction. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 1122–1126, 2012.

GARCÍA-MARTÍNEZ, D. J. et al. The high content of quercetin and catechin in airen grape juice supports its application in functional food production. **Foods**, v. 10, n. 7, 2021.

GUO, W.; WU, D. Facile synthesis of VS₄/graphene nanocomposites and their visible-light-driven photocatalytic water splitting activities. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 30, p. 16832-16840, 2014.

GUO, Y.; YAN, H. Preparation and characterization of heparin-stabilized gold nanoparticles. **Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 27, n. 5, p. 309–319, 2008.

HOSSEINI, M.; MOMENI, M. M.; FARAJI, M. An innovative approach to electro-oxidation of dopamine on titanium dioxide nanotubes electrode modified by gold particles. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 40, n. 7, p. 1421–1427, 2010.

HU, T.; SUBBIAH, V.; WU, H.; BK, A.; RAUF, A.; ALHUMAYDHI, F.A.; SULERIA, H.A.R. Determination and characterization of phenolic compounds from Australia-grown sweet cherries (*Prunus avium* L.) and their potential antioxidant properties. **ACS Omega**, v. 7, n. 10, p. 34687-34699, 2021.

JAN, B.; PARVEEN, R.; ZAHIRUDDIN, S.; KHAN, M.U.; MOHAPATRA, S.; AHMAD, S. Nutritional constituents of mulberry and their potential applications in food and pharmaceuticals: A review. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, p. 3909-3921, 2021.

JEON, Y.J. et al. Esculetin, a Coumarin Derivative, Exhibits Anti-proliferative and Pro-apoptotic Activity in G361 Human Malignant Melanoma. **Journal of Cancer Prevention**, v. 20, n. 2, p. 106–112, 2015.

JEONG, N. H. et al. Esculetin from *Fraxinus rhynchophylla* attenuates atopic skin inflammation by inhibiting the expression of inflammatory cytokines. **International Immunopharmacology**, v. 59, p. 209–216, 2018.

JIANG, D.; HU, J.; LIU, X. Topical administration of Esculetin as a potential therapy for experimental dry eye syndrome. **Eye**, v. 31, n. 12, p. 1724–1732, 2017.

JIANG, G.; WANG, L.; CHEN, W. Studies on the preparation and characterization of gold nanoparticles protected by dendrons. **Materials Letters**, v. 61, n. 1, p. 278–283, 2007.

JIANG, J.; DU, X. Sensitive electrochemical sensors for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, and uric acid based on Au@Pd-reduced graphene oxide nanocomposites. **Nanoscale**, v. 6, n. 19, p. 11303–11309, 2014.

JIANG, R.; SU, G.; CHEN, X.; LI, Q.; XIE, B.; ZHAO, Y. Esculetin inhibits endometrial cancer proliferation and promotes apoptosis via hnRNPA1 to downregulate BCLXL and XIAP. **Cancer Letters**, v. 521, p. 308-321, 2021.

KADAKOL, A.; SHARMA, N.; KULKARNI, Y.A.; GAIKWAD, A.B. Esculetin: A phytochemical endeavor fortifying effect against non-communicable diseases. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 84, p. 1442-1448, 2016.

KARNEWAR, S. et al. Mitochondria-targeted esculetin mitigates atherosclerosis in the setting of aging via the modulation of SIRT1-mediated vascular cell senescence and mitochondrial function in Apoe mice. **Atherosclerosis**, v. 356, p. 28–40, 2022.

KEMP, M.M.; LINHARDT, R.J. Heparin-based nanoparticles. **Wires: nanomedicine and nanobiotechnology**, v. 2, n. 1, p. 77-87, 14 2009.

KIM, A.D.; HAN, X.; PIAO, M.J.; HEWAGE, S.R.K.M.; HYUN, C.L.; CHO, S.J.; HYUN, J.W. Esculetin induces death of human colon cancer cells via the reactive oxygen species-mediated mitochondrial apoptosis pathway. **Environmental toxicology and Pharmacology**, v. 39, p. 982-989, 2015.

KIM, J. S. et al. Analysis and distribution of esculetin in plasma and tissues of rats after oral administration. **Preventive Nutrition and Food Science**, v. 19, n. 4, p. 321–326, 2014.

KIM, W.K.; BYUN, W.S.; CHUNG, H.; OH, J.; PARK, H.J.; CHOI, J.S.; LEE, S.K. Esculetin suppresses tumor growth and metastasis by targeting Axin2/E-cadherin axis in colorectal cancer. **Biochemical Pharmacology**, v. 152, 2018.

KIM, Y.; BONG, S.; KANG, Y.; YANG, Y.; MAHAJAN, R. K.; KIM, J. S.; KIM, H. Electrochemical detection of dopamine in the presence of ascorbic acid using graphene modified electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, n. 10, p. 2366-2369, 2010.

KWAK, J. H. et al. Oral bioavailability and pharmacokinetics of esculetin following intravenous and oral administration in rats. **Xenobiotica**, v. 51, n. 7, p. 811–817, 2021.

LEE, Y.; KHATUN, Z.; LEE, J.; LEE, Y.; IN, I. Blood Compatible Graphene/Heparin Conjugate through noncovalent chemistry. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 2, p. 336-341, 2011.

LI, J.; SUN, W.; WANG, X.; DUAN, H.; WANG, Y.; SUN, Y.; DING, C.; LUO, C. Ultra-sensitive film sensor based on Al₂O₃-Au nanoparticles supported on PDDA-functionalized graphene for the determination of acetaminophen. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, p. 5567-5576, 2016.

LI, H. et al. Highly sensitive determination of esculetin on TiO₂-NPs-coated poly-(diallyldimethylammonium chloride)-functionalized graphene modified electrode. **Talanta**, v. 161, p. 838–846, 2016.

LI, H.; WANG, Q.; WANG, Y.; XU, Z.; HAN, Z. Esculetin inhibits the proliferation of human lung cancer cells by targeting epithelial-to-mesenchymal transition of the cells. **Cellular and Molecular Biology**, v. 65, n. 7, p. 95-98, 2019

LI, T.; SHANG, D.; GAO, S.; WANG, B.; KONG, H.; YANG, G.; SHU, W.; XU, P.; WEI, G. Two-dimensional material-based electrochemical sensors/biosensors for food safety and biomolecular detection. **Biosensors**, v. 13, n. 314, 2022.

LI, Y. et al. Simple and Sensitive Voltammetric Determination of Esculetin Using Electrochemically Reduced Graphene Oxide Modified Electrode. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 62, n. 7, p. 652–660, 2015.

LI, Y. et al. Electrochemical sensors based on molecularly imprinted polymers on Fe₃O₄/graphene modified by gold nanoparticles for highly selective and sensitive detection of trace ractopamine in water. **The Analyst**, v. 143, n. 21, p. 5094–5102, 2018.

LIANG, C.; JU, W.; PEI, S.; TANG, Y.; XIAO, Y. Pharmacological activities and synthesis of esculetin and its derivatives: a mini-review. **Molecules**, v. 22, n. 387, 2017.

LIU, M.; CHEN, Q.; LAI, C.; ZHANG, Y.; DENG, J.; LI, H.; YAO, S. A double signal amplification platform for ultrasensitive and simultaneous detection of ascorbic acid, dopamine, uric acid and acetaminophen based on a nanocomposite of ferrocene thiolate stabilized Fe₃O₄@Au nanoparticles with graphene sheet. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 18, p. 75-81, 2013.

LU, D.; ZHANG, Y.; LIN, S.; WANG, L.; WANG, C. Sensitive detection of esculetin based on a CdSe nanoparticles-decorated poly-(diallyldimethylammonium chloride)-functionalized graphene nanocomposite film. **Analyst**, v. 136, p. 4447-4453, 2011.

LU, Z. et al. A dual-template imprinted polymer electrochemical sensor based on AuNPs and nitrogen-doped graphene oxide quantum dots coated on NiS₂/biomass carbon for simultaneous determination of dopamine and chlorpromazine. **Chemical Engineering Journal**, v. 389, p. 124417, 2020.

MAI, Y.; ZHUANG, Q.; LI, Q.; DU, K.; WU, D.; LI, H.; XIA, Y.; ZHU, F.; GAN, R. Ultrasound-assisted extraction, identification, and quantifications of antioxidants from ‘Jinfeng’ kiwifruit. **Foods**, v. 11, n. 827, 2022.

MANIKANDAN, V.; BOATENG, E.; DURAIRAJ, S.; CHEN, A. Electrochemical sensing of vanillin based on fluorine doped reduced graphene oxide decorated with gold nanoparticles. **Foods**, v. 22, n. 1448, 2022.

MENG, S.; WANG, L.; JI, X.; YU, J.; MA, X.; ZHANG, J.; ZHAO, W.; JI, H.; LI, M.; FENG, H. Facile gold-nanoparticle boosted graphene sensor fabrication enhance biochemical signal detection. **Nanomaterial**, v. 12, n. 1327, 2022.

MOMENI, N.; JAVADIFAR, K.; PATRICK, M.A.; HASAN, M.H.; CHOWDHURY, F.M. A review on gold nanoparticles-based biosensors in clinical and non-clinical applications. **International Journal of Engineering Materials and Manufacture**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2022.

MONDAL, A.; JANA, N. R. Graphene-Nanoparticle Composites and Their Applications in Energy, Environmental and Biomedical Science. **Reviews in Nanoscience and Nanotechnology**, v. 3, n. 3, p. 177–192, 2014.

NWAFOR, I. C.; SHALE, K.; ACHILONU, M. C. Chemical Composition and Nutritive Benefits of Chicory (*Cichorium intybus*) as an Ideal Complementary and/or Alternative Livestock Feed Supplement. **Scientific World Journal**, 2017.

PAN, D. et al. Functional graphene-gold nano-composite fabricated electrochemical biosensor for direct and rapid detection of bisphenol A. **Analytica Chimica Acta**, v. 853, p. 297–302, 2015.

PARK, C. E.; LEE, D. H. Esculetin Can Attenuate Thrombosis through Inhibition of U46619-Induced Platelet Activation. **Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition**, v. 50, n. 12, p. 1292–1298, 2021.

PERKOWSKA, I.; SIWINSKA, J.; OLRZY, A.; GROSJEAN, J.; HEHN, A.; BOURGAUD, F.; LOJKOWSKA, E.; IHNATOWICZ, A. Identification and quantification of coumarins by UHPLC-MS in *Arabidopsis thaliana* natural populations. **Molecules**, v. 25, n. 1804, 2021.

PETRUCCI, R.; BORTOLAMI, M.; MATTEO, P.; CURULLI, A. Gold nanomaterials-based electrochemical sensors and biosensors for phenolic antioxidants detection: recent advances. **Nanomaterials**, v. 12, n. 959, 2022.

POLUMACKANYCZ, M.; WESOŁOWSKI, M.; VIAPIANA, A. *Morus alba* L. and *Morus nigra* L. Leaves as a Promising Food Source of Phenolic Compounds with Antioxidant Activity. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 76, n. 4, p. 458–465, 2021.

PULLAIAH, C. P. et al. Exploring cardioprotective potential of esculetin against isoproterenol induced myocardial toxicity in rats: in vivo and in vitro evidence. **BMC Pharmacology and Toxicology**, v. 22, n. 1, 2021.

RAJ, V.; ALEX, S. Heparin gold nanoparticles as a colorimetric probe for cardiac troponin I detection. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 76, n. 11, p. 1245-1251, 2021.

RAMYA, M.; KUMAR, P.S.; RANGASAMY, G.; SHANKAR, V.U.; RANJESH, G.; NIRMALA, K.; SARAVANAN, A.; KRISHNAPANDI, A. A recent advancement on the applications of nanomaterials in electrochemical sensors and biosensors. **Chemosphere**, v. 308, 2022.

RATTAN, S.; KUMAR, S.; GOSWAMY, J. K. Gold nanoparticle decorated graphene for efficient sensing of NO₂ gas. **Sensors International**, v. 3, 2022.

REDDY, Y.V.M.; S. J.H.; PALAKOLLU, V.N.; SRAVANI, B.; CHOI, C.; PARK, K.; KIM, S.; MADHAVI, G.; PARK, J.P.; SHETTI, N.P. Strategies, advances, and challenges associated with the use of graphene-based nanocomposites for electrochemical biosensors. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 304, 2022.

REHMAN, S. U. R. et al. HPLC Determination of Esculin and Esculetin in Rat Plasma for Pharmacokinetic Studies. **Journal of chromatographic science**, v. 53, n. 8, p. 1322–1327, 2015.

REN, W.; ZHOU, Q.; YU, R.; LIU, Z.; HU, Y. Esculetin inhibits the pyroptosis of microvascular endothelial cells through NF- κ B /NLRP3 signaling pathway. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 720, 2022.

RIBEIRO, J. Electrochemical Impedance Spectroscopy: A tool on the electrochemical investigations. **Revista Virtual de Química**, v. 12, n. 6, p. 1626–1641, 2020.

RODRIGUEZ-TORRES, M. D. P.; ACOSTA-TORRES, L. S.; DIAZ-TORRES, L. A. Heparin-Based Nanoparticles: An Overview of Their Applications. **Journal of Nanomaterials**, 2018.

SCHOLZ, F. Voltammetry techniques of analysis: the essentials. **Chemistry Texts**, v.1, n. 17, 2015.

SHENG, K. et al. A highly sensitive sensor based on electropolymerization for electrochemical detection of esculetin. **Microchemical Journal**, v. 159, 2020.

SHENG, K. et al. Emerging electrochemical biosensing approaches for detection of allergen in food samples: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 121, p. 93–104, 2022.

SHI, X.; WANG, Y.; SUN, H.; CHEN, Y.; ZHANG, X.; XU, J.; ZHAI, G. Heparin-reduced graphene oxide nanocomposites for curcumin delivery: *in vitro*, *in vivo* and molecular dynamics simulation study. **Biomaterials Science**, v. 7, p. 1011-1027, 2018.

SHIH, Y. et al. Flow injection analysis of zinc pyrithione in hair care products on a cobalt phthalocyanine modified screen-printed carbon electrode. **Talanta**, v. 62, n. 5, p. 912–917, 2004.

SILVA, T. R. et al. Electrochemical Sensor Based on Gold Nanoparticles Stabilized in Poly(Allylamine hydrochloride) for Determination of Vanillin. **Electroanalysis**, v. 27, n. 2, p. 465–472, 2015.

SINGH, L. et al. Protective Effect of Esculetin, Natural Coumarin in Mice Model of Fibromyalgia: Targeting Pro-Inflammatory Cytokines and MAO-A. **Neurochemical Research**, v. 45, n. 10, p. 2364–2374, 2020.

SIVARANJANEE, R. et al. Electrochemical sensing system for the analysis of emerging contaminants in aquatic environment: A review. **Chemosphere**, v. 294, p. 133779, 2022.

SOKOLSKY-PAPKOV, M.; KABANOV, A. Synthesis of well-defined gold nanoparticles using pluronic: the role of radicals and surfactants in nanoparticles formation. **Polymers**, v. 11, n. 1553, 2019.

SUBBIAH, V.; ZHONG, B.; NAWAZ, M. A.; BARROW, C. J.; DUNSHEA, F. R.; SULERIA, H. A. R. Screening phenolic compounds in Australian grown berries by LC-ESI-QTOF-MS/MS and determination of their antioxidant potencial. **Antioxidants**, v. 10, n. 26, 2020.

SUN, I.; EUN, S.; NA, J.; LEE, S.; KIM, I.; YOUN, I.; KO, C.; KIM, H.; LIM, D.; CHOI, K.; MESSERSMITH, P.B.; PARK, T.G.; KIM, S.Y.; KWON, I.C.; KIM, K.; AHN, C. Heparin-coated gold nanoparticles for liver-specific CT imaging. **Chemistry – A European Journal**, v. 15, p. 13341-13347, 2009.

TALAMINI, L. et al. Heparin-gold Nanoparticles and Liquid Crystal Applied in Label-free Electrochemical Immunosensor for Prostate-specific Antigen. **Electroanalysis**, v. 30, n. 2, p. 353–360, 2018.

TANG, J. et al. A sensitive and selective electrochemical sensor based on graphene quantum dots/gold nanoparticles nanocomposite modified electrode for the determination of luteolin in peanut hulls. **Microchemical Journal**, v. 145, p. 899–907, 2019.

TARKEKUL, K.; COLPAN, R.D.; BAYKUL, T.; OZDEMIR, M.D.; ERDOGAN, S. Esculetin inhibits the survival of human prostate cancer cells by inducing apoptosis and arresting the cells cycle. **Journal of Cancer Prevention**, v. 23, n. 1, p. 10-18, 2018.

TARTAGLIA, A. et al. Determination of phenolic compounds in human saliva after oral administration of red wine by high performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 209, 2022.

TORRES-FERRER, L. R. et al. Tuning H_{Au}Cl₄/Sodium Citrate Stoichiometry to Fabricate Chitosan-Au Nanocomposites. **Polymers**, v. 14, n. 4, 2022.

TIAN, J. et al. Carbofuran-imprinted sensor based on a modified electrode and prepared via combined multiple technologies: Preparation process, performance evaluation, and application. **Electrochimica Acta**, v. 404, p. 139600, 2022.

TSENG, W. BIN et al. **Functionalized gold nanoparticles for sensing of pesticides: A review.** **Journal of Food and Drug Analysis** Taiwan Food and Drug Administration, 2020.

USMAN, H.; JAN, H.; ZAMAN, G.; KHANUM, M.; DROUET, S.; GARROS, L.; TUNGMUNNITHUM, D.; HANO, C.; ABBASI, B.H. Comparative analysis of various plant-growth-regulator treatments on biomass accumulation, bioactive phytochemical production,

and biological activity of *Solanum virginianum* L. callus culture extracts. **Cosmetics**, v. 9, n. 71, 2022.

VUCKOVIC, D. Current trends and challenges in sample preparation for global metabolomics using liquid chromatography-mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 2012.

WALTERS, F.; BURWELL, G.; MITCHELL, J.J.; ALI, M.M.; AHMADI, E.D.; MOSTERT, A.B.; JENKINS, C.A.; ROZHKO, S.; KAZAKOVA, O.; GUY, O.J. A rapid graphene sensor platform for the detection of viral proteins in low volume samples. **Advanced Nanobiomed Research**, v. 2, 2022.

WANG, G.; LU, M.; YAO, Y.; WANG, J.; LI, J. Esculetin exerts effect on human gastric cancer cells through IGF-1/PI3K/Akt signaling pathway. **European Journal of Pharmacology**, v. 814, p. 207-215, 2017.

WANG, L.; LIN, L.; PAN, D.; CHEN, X.; ZHENG, Y.; LIN, X. Electrochemical behavior and determination of esculetin on glassy carbon electrode. **Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 32, n. 10, p. 1804-1806, 2012.

WANG, Q. H.; QIN, S. W.; JIANG, J. G. Improvement effects of esculetin on the formation and development of atherosclerosis. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 150, 2022.

WANG, R. et al. Novel electrochemical non-enzymatic glucose sensor based on 3D Au@Pt core-shell nanoparticles decorated graphene oxide/multi-walled carbon nanotubes composite. **Microchemical Journal**, v. 174, p. 107061, 2022.

WANG, Z.; ZHU, W.; LIU, H.; WU, G.; SONG, M.; YANG, B.; YANG, D.; WANG, Q.; KUANG, H. Simultaneous determination of aesculin, aesculetin, fraxetin, fraxin and polydatin in beagle dog plasma by UPLC-ESI-MS/MS and its application in pharmacokinetic study after oral administration extracts of *Ledum palustre* L. **Molecules**, v. 23, 2018.

WANG, Z.; ZHANG, M.; ZHU, W.; YANG, C.; KUANG, H. Simultaneous determination of three naphthoquinones from *Arnebia euchroma* (Royle) Johnston in beagle plasma by UPLC-MS/MS and application for pharmacokinetics study. **Acta Chromatographica**, v. 34, n. 4, p. 403-411, 2022.

WON, J.; IHN, K. J.; KANG, Y. S. Gold nanoparticle patterns on polymer films in the presence of poly(amidoamine) dendrimers. **Langmuir**, v. 18, n. 21, p. 8246-8249, 2002.

XIAO, T. et al. Au and Au-Based nanomaterials: Synthesis and recent progress in electrochemical sensor applications. **Talanta**, v. 206, p. 120210, 2020.

YAN, L. et al. Synthesis of sp-hybridized nitrogen doped ultrathin graphdiyne and application to the electrochemical detection for 6,7-dihydroxycoumarin. **Talanta**, v. 242, 2022.

YAN, M.; ZHANG, Z.; LIU, Y. Difference analysis of different parts of chicory based on HPLC fingerprint and multi-component content determination. **Chinese Herbal Medicines**, v. 14, p. 317-323, 2022.

YANG, J.; XIAO, Y.; HE, X.; QIU, G.; HU, X. Aesculetin-induced apoptosis through a ROS-mediated mitochondrial dysfunction pathway in human cervical cancer cells. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 12, n. 3, p. 185-193, 2010.

YANG, L. et al. Ionic liquid functionalized 3D graphene-carbon nanotubes–AuPd nanoparticles–molecularly imprinted copolymer-based paracetamol electrochemical sensor: Preparation, characterization and application. **Talanta**, v. 224, p. 121845, 2021.

YANG, T. et al. Label-free electrochemical immunoassay for α -fetoprotein based on a redox matrix of Prussian blue-reduced graphene oxide/gold nanoparticles-poly(3,4-ethylenedioxythiophene) composite. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 799, p. 625–633, 2017.

YANG, X.; WANG, Q.; ZHANG, A.; SHAO, X.; LIU, T.; TANG, B. Strategies for sustained released of heparin: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 294, 2022.

YAO, Y. et al. Application of single-walled carbon nanotubes/Au nanosol modified electrode for the electrochemical determination of esculetin in Cortex Fraxini. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 11, n. 7, p. 5427–5440, 2016.

YIN, S.; NIU, Z.; CHEN, X. Assembly of graphene sheets into 3D macroscopic structures. **Small**, v. 8, n. 16, p. 2458–2463, 2012.

YUN, E. S. et al. Determination of the esculetin contents of medicinal plants by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**, v. 26, n. 10, p. 1247–1251, 2012.

ZAFAR, M.S.; MUHAMMAD, F.; JAVED, I.; AKHTAR, M.; KHALIQ, T.; ASLAM, B.; WAHEED, A.; YASMIN, R.; ZAFAR, H. White Mulberry (*Morus alba*): a brief phytochemical and pharmacological evaluations account. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 15, n. 3, p. 612-620, 2013.

ZANATO, N. et al. Label-free Electrochemical Immunosensor for Cardiac Troponin T Based on Exfoliated Graphite Nanoplatelets Decorated with Gold Nanoparticles. **Electroanalysis**, v. 29, n. 7, p. 1820–1827, 2017.

ZAPP, E. et al. Gold nanoparticles and hydrophobic ionic liquid applied on the development of a voltammetric biosensor for polyphenol determination. **Electroanalysis**, v. 23, n. 5, p. 1124–1133, 2011.

ZHANG, G.; XU, Y.; ZHOU, H. Esculetin inhibits proliferation, invasion, and migration of laryngeal cancer *In vitro* and *In vivo* by inhibiting Janus Kinase (JAK)-signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3) activation. **Medical Science Monitor**, v. 25, p. 7853-7863, 2020.

ZHANG, L.; XIE, Q.; LI, X. Esculetin: A review of its pharmacology and pharmacokinetics. **Phytotherapy Research**, v. 36, n. 1, p. 279-298, 2022.

ZHANG, Y.; WU, C.; GUO, S.; ZHANG, J. Interactions of graphene and graphene oxide with proteins and peptides. **Nanotechnology Reviews**, v. 2, n. 1, p. 27-45, 2013.

ZHAO, X. et al. Fabrication of a CuS/graphene nanocomposite modified electrode and its application for electrochemical determination of esculetin. **Analytical Methods**, v. 5, n. 16, p. 3992–3998, 2013.

ZHOU, N. et al. **Muscle Cell and Tissue: Current Status of Research Field**, 2018.

ZUO, J.; ZHANG, W.; JIAN, H.; BOU-CHACRA, N.; LÖBENBERG, R. Esculetin as bioactive marker: towards a rational scientific approach for the treatment of hyperuricemia using Traditional Chinese Medicine. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 56, 2020.