



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

**DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DE TRIPTOFANO EM
SUPLEMENTOS ALIMENTARES UTILIZANDO
ELETRODOS IMPRESSOS COMERCIAIS**

DUANE BORTOT

Florianópolis
Dezembro/2025

Duane Bortot

**DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DE TRIPTOFANO EM
SUPLEMENTOS ALIMENTARES UTILIZANDO ELETRODOS
IMPRESSOS COMERCIAIS**

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

Prof.^a Dr.^a Cristiane Luisa Jost

Gabriel Chitolina Rodrigues

Florianópolis
Dezembro/2025

AGRADECIMENTOS

A conclusão deste TCC representa muito mais do que o fim de uma etapa acadêmica, pois carrega consigo todo o carinho, apoio e a dedicação das pessoas que caminharam ao meu lado ao longo dessa jornada. Nada disso seria possível sem aqueles que me incentivaram, acreditaram em mim e compartilharam comigo momentos de aprendizado e superação. Por isso, expresso aqui minha sincera gratidão a todos que contribuíram, de alguma forma, para que este trabalho se tornasse realidade e para que eu chegasse até aqui com mais força, confiança e crescimento pessoal.

Aos meus pais, mas especialmente à minha mãe, Graça, por ter me incentivado desde a infância a buscar a educação e o conhecimento, e por nunca medir esforços para me apoiar na realização dos meus sonhos.

À minha amiga de infância, Patrícia, por todos os anos de amizade e companheirismo, e por ter sido um apoio fundamental durante os primeiros anos na UFSC. Agradeço também aos amigos que fiz durante o ensino fundamental e médio: Ana Livia, Laura, Túlio e Andressa.

À minha prima Rosângela e a toda a sua família, por terem me acolhido como mais uma integrante durante minha vinda a Florianópolis.

À professora Cris, por toda a orientação e pela oportunidade de fazer parte do laboratório. Sou profundamente grata pelo conhecimento compartilhado, pelas conversas, pelo incentivo constante e por acreditar no meu potencial.

A todos do grupo AMPERE, pelo conhecimento e ensinamentos transmitidos, pelos momentos de descontração e diversão e pelos conselhos de vida. Meu agradecimento especial ao Adriano, ao Caio e ao meu coorientador, Gabriel.

A todos os amigos que fiz ao longo da jornada acadêmica, pelas conversas, pelo apoio em momentos difíceis e pelas risadas e companheirismo, que tornaram esses anos mais leves e renderam memórias maravilhosas.

À Universidade Federal de Santa Catarina e, especialmente, a todos os professores que tornaram minha graduação tão especial. Pelos valiosos ensinamentos, deixo meu sincero agradecimento. Agradeço também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao PIBIC-UFSC pelo apoio financeiro que tornou este trabalho possível.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do triptofano	13
Figura 2. Célula eletrolítica com eletrodos de referência, trabalho e auxiliar.....	16
Figura 3. SPCE disponível comercialmente.....	17
Figura 4. Sistema utilizado para realização das leituras voltamétricas, contendo potenciostato conectado em um notebook e com um conector para eletrodos impressos.	21
Figura 5. Voltamogramas cíclicos para o TRP $10,2 \text{ mg L}^{-1}$ em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0) para os eletrodos impressos de trabalho, (A) ouro, (B) carbono e (C) platina; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$	26
Figura 6. Voltamogramas para TRP $4,08 \text{ mg L}^{-1}$ em B-R $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3,0 em (A) sem limpeza eletroquímica e em (B) com limpeza eletroquímica. (C) comparativo de intensidade de corrente para ambos os métodos.....	28
Figura 7. Estudo de pH em voltametria linear para o TRP $5,1 \text{ mg L}^{-1}$ em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; (A) pH 2,0 a 8,0 e (B) corrente anódica e valores de potencial versus pH no eletrodo impresso de carbono; velocidade fixa em $50,0 \text{ mV s}^{-1}$	29
Figura 8. (A) Voltamogramas e (B) intensidade de corrente anódica, para os tampões glicina, citrato, Britton-Robinson e McIlvaine, todos a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,0) por voltametria linear utilizando TRP a $5,1 \text{ mg L}^{-1}$ em SPCE; velocidade de varredura de 50 mV s^{-1}	30
Figura 9. (A) Voltamogramas para as concentrações de 0,025, 0,05, 0,10, 0,20 e $0,30 \text{ mol L}^{-1}$ de B-R (pH 3,0) por voltametria linear utilizando TRP a $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em SPCE; velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} e faixa de potencial de 0,3 a 1,1 V. (B) Intensidade de corrente anódica para as concentrações entre 0,025 a $0,30 \text{ mol L}^{-1}$ de Britton-Robinson (pH 3,0) obtidas a partir dos voltamogramas anteriores.	30
Figura 10. (A) Estudo de velocidade de varredura em voltamogramas lineares para o TRP $5,1 \text{ mg L}^{-1}$ em solução tampão B-R $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,0) no SPCE; velocidade entre 10 - 175 mV s^{-1} . (B) I versus v, (C) I versus $v^{1/2}$, (D) log v versus log i.	32
Figura 11. Voltamogramas referentes as técnicas de LSV e DPV. Condições experimentais: eletrólito suporte tampão Britton-Robinson $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,0) utilizando TRP $5,1 \text{ mg L}^{-1}$ em SPCE com velocidade de varredura variando entre (A) $10,0 \text{ mV s}^{-1}$, (B) $50,0 \text{ mV s}^{-1}$, (C) $100,0 \text{ mV s}^{-1}$, (D) $200,0 \text{ mV s}^{-1}$	34
Figura 12. (A) Voltamogramas em LSV para diferentes concentrações entre 0,20 e $16,34 \text{ mg L}^{-1}$ de triptofano e (B) curva de calibração utilizando valores entre 0,20 e $16,34 \text{ mg L}^{-1}$ em SPCE. Condições experimentais: eletrólito suporte tampão Britton-Robinson $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,0) com velocidade de 125 mV s^{-1}	35
Figura 13. Resposta de corrente relativa de cada interferente em porcentagem. TRP $4,08 \text{ mg L}^{-1}$ em tampão B-R $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3,0 (n = 3).	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT – Serotonina

AE – (do inglês *auxiliary electrode*) – Eletrodo auxiliar

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

B-R – (do inglês *Britton-Robison buffer solution*) – Solução tampão Britton-Robinson

CV – (do inglês *cyclic voltammetry*) - Voltametria cíclica

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

DPR – Desvio padrão relativo

HPLC – (do inglês *high-performance liquid chromatography*) – Cromatografia líquida de alta eficiência

INS – (do inglês *international numbering system*) – Numeração de aditivos alimentares

LC-MS– (do inglês *Liquid Chromatography - Mass Spectrometry*) – Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas

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

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

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

RDC – Resolução da diretoria colegiada

RE – (do inglês *reference electrode*) – Eletrodo de referência

SPCE – (do inglês *screen printed carbon electrode*) – Eletrodo impresso de carbono

SPE – (do inglês *screen printed electrode*) – Eletrodo impresso

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

TRP – Triptofano

WE – (do inglês *working electrode*) – Eletrodo de trabalho

RESUMO

O L-triptofano (TRP) é um aminoácido essencial, não sintetizado pelo organismo humano, devendo ser obtido por meio da dieta. Desempenha um papel crucial na biossíntese de proteínas e serve como um precursor para diversos compostos bioativos importantes. Uma das formas de seu consumo é por meio de suplementos alimentares. O controle de qualidade de suplementos ainda não é padronizado e fica a cargo das próprias empresas, o que reforça a necessidade de métodos simples e baratos para verificá-los. Neste trabalho, eletrodos impressos de carbono, ouro e platina, foram avaliados com intuito de desenvolver um método eletroanalítico para determinar a concentração de TRP em suplementos alimentares. Essa abordagem apresenta-se como uma alternativa rápida, econômica e adequada para análises frequentes, além de gerar poucos resíduos. O eletrodo impresso de carbono se mostrou o mais adequado para a detecção de TRP. Intensidades de corrente de pico mais altas foram alcançadas usando uma solução tampão Britton-Robinson 0,05 mol L⁻¹ (pH 3,0), com voltametria linear (LSV) em velocidade de 125,0 mV s⁻¹. Foi construída uma curva de calibração na faixa de 0,20 a 16,34 mg L⁻¹ (R² = 0,9995). Os limites de detecção e quantificação foram de 0,04 mg L⁻¹ e 0,11 mg L⁻¹, respectivamente. O estudo da seletividade frente a interferentes comuns em formulações farmacêuticas apresentou uma interferência inferior a 13%. A repetibilidade das medições de TRP foi investigada sob condições otimizadas, sendo que os valores do desvio padrão relativo (DPR) encontrados foram de 0,60% para medições intra-dia e 3,22% para medições inter-dia ao longo de um período de cinco dias. O método foi aplicado em formulações farmacêuticas de suplementos de TRP com uma recuperação média de 114,3 %. Os resultados evidenciaram um grande potencial de uso de eletrodos impressos de carbono sem modificação como uma forma simples, rápida e com baixa geração de resíduos para o monitoramento de suplementos de TRP.

Palavras-chave: Eletrodo de carbono; Eletrodo impresso; Suplemento alimentar; Triptofano; Voltametria.

ABSTRACT

L-tryptophan (TRP) is an essential amino acid that is not synthesized by the human body and must be obtained through diet. It plays a crucial role in protein biosynthesis and serves as a precursor for several important bioactive compounds. One of the ways to consume it is through dietary supplements. The quality control of supplements is not yet standardized and is the responsibility of the companies themselves, which reinforces the need for simple and inexpensive methods to verify them. In this work, screen-printed electrodes made of carbon, gold, and platinum were evaluated with the aim of developing an electroanalytical method to determine the concentration of TRP in dietary supplements. This approach presents itself as a fast, economical, and suitable alternative for frequent analyses, in addition to generating little waste. In this study, the screen-printed carbon electrode proved to be the most suitable for TRP detection. Higher peak current intensities were achieved using a 0.05 mol L⁻¹ Britton-Robinson buffer solution (pH 3.0), with linear voltammetry (LSV) at a speed of 125.0 mV s⁻¹. A calibration curve was constructed in the range of 0.20 to 16.34 mg L⁻¹ (R² = 0.9995). The limits of detection and quantification were 0.04 mg L⁻¹ and 0.11 mg L⁻¹, respectively. The selectivity study with common interferents in pharmaceutical formulations showed an interference of less than 13%. The repeatability of TRP measurements was investigated under optimized conditions, and the relative standard deviation (RSD) values were found to be 0.60% for intra-day measurements and 3,22% for inter-day measurements over a five-day period. The method was applied to pharmaceutical formulations of TRP supplements with a recovery of 114,3 %. The results highlighted the great potential of using unmodified carbon printed electrodes as a simple, fast, and low-waste method for monitoring of TRP supplements.

Keywords: Carbon electrode; Screen printed electrode; Dietary supplement; Tryptophan; Voltammetry.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	11
Suplementos alimentares	11
Triptofano	12
Algumas técnicas de quantificação para o triptofano	14
A eletroanalítica	15
Eletrodos impressos	16
3. OBJETIVOS.....	19
Objetivo geral	19
Objetivos específicos	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
Reagentes e soluções	20
<i>Reagentes</i>	20
<i>Soluções</i>	20
Instrumentação	21
<i>Sistema eletroquímico</i>	21
<i>Equipamentos</i>	21
Procedimento experimentais	22
<i>Limpeza eletroquímica</i>	22
<i>Otimização da técnica</i>	22
<i>Aplicação em amostra</i>	23
<i>Segurança no laboratório</i>	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
Comportamento eletroquímico do TRP em eletrodos impressos de carbono, ouro e platina	25
Limpeza eletroquímica	26
Otimização dos valores de pH	28
Estudo eletrólito suporte	29
Estudo de velocidade de varredura	31
Escolha da técnica eletroanalítica para a determinação do TRP	33
Curva de Calibração	34

Seletividade e Repetibilidade.....	36
Aplicação em amostra de suplemento.....	37
6. CONCLUSÃO.....	38
7. REFERÊNCIAS	39

1. INTRODUÇÃO

O mercado de suplementos alimentares vem tendo um aumento crescente nos últimos anos. Seja por estresse ou falta de tempo na rotina, ingestão excessiva de alimentos industrializados ou uma busca por uma vida mais saudável, observa-se uma demanda cada vez maior de pessoas que procuram a suplementação como alternativa para alcançar os macro e micronutrientes necessários diariamente. Frequentemente, esses produtos são associados a promessas de efeitos rápidos, como perda de peso, ganho de massa muscular, melhora do humor, aumento da disposição e qualidade do sono, entre outras. É importante destacar que os suplementos são destinados às pessoas saudáveis e, conforme regulamentação vigente, não devem conter em seu rótulo destinação para tratar ou prevenir doenças. Por meio da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 243, de 26 de julho de 2018, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) definiu os suplementos alimentares como uma categoria própria, separada de alimentos ou fármacos.

Por não serem classificados como medicamentos, sua comercialização não exige prescrição médica, o que contribui para sua ampla aceitação. Entretanto, qualquer suposto benefício à saúde só será válido se a concentração descrita na embalagem for a mesma da forma farmacêutica consumida. Doses menores podem não ter os resultados metabólicos esperados, enquanto doses maiores podem causar intoxicações, danos ao fígado e aos rins, dentre outros malefícios. Portanto, o controle de qualidade destes suplementos é de extrema importância para o controle da saúde do público geral.

Atualmente, não existe um processo padronizado de controle de qualidade para suplementos alimentares, sendo este feito de maneira interna pela própria empresa que os produzem. Dessa maneira, é de significativa importância o desenvolvimento de técnicas que consigam garantir um controle de qualidade da concentração do princípio ativo desses suplementos, principalmente técnicas simples e que apresentem um bom custo-benefício, capazes de suprirem as necessidades da indústria.

A eletroanalítica, principalmente a voltametria com o uso de eletrodos impressos, fornece um método rápido e de baixo custo, o que torna possível uma alta frequência analítica e a possibilidade de análise *in loco*, permitindo a verificação da concentração de suplementos de forma prática e eficiente, com baixíssima geração de resíduos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Suplementos alimentares

Os suplementos alimentares abrangem uma ampla gama de produtos destinados a pessoas saudáveis para atender às necessidades nutricionais diárias. Esses produtos estão disponíveis em diversas formas (comprimidos, cápsulas, cápsulas gelatinosas, líquidos, xaropes, gomas mastigáveis e pós) e podem fornecer componentes individuais ou combinações de vitaminas, minerais, aminoácidos, ácidos graxos e outros componentes alimentares.¹ Ervas e outras substâncias botânicas também podem ser consideradas suplementos.²

No âmbito internacional, as primeiras tentativas de controle de qualidade começaram há mais de um século. Para assegurar que a população norte-americana tivesse acesso a alimentos e medicamentos seguros, foi promulgada, em 1906, a Lei de Alimentos e Medicamentos Puros (*Pure Food and Drug Act*), marco que deu origem à atual *Food and Drug Administration* (FDA). Nos anos seguintes, novas regulamentações foram implementadas em resposta a diversos casos de mortes associadas a medicamentos mal fabricados. Em 1938, passou-se a exigir a apresentação de dados de segurança antes da comercialização de qualquer produto. Posteriormente, em 1962, emendas adicionais determinaram que a eficácia e a segurança de um fármaco deveriam ser comprovadas por meio de ensaios clínicos controlados antes de sua aprovação. Porém, somente em 1994 o Congresso dos Estados Unidos estabeleceu uma definição específica para suplementos alimentares.³

Apesar dos avanços regulatórios, ainda existe grande variabilidade na qualidade e composição dos produtos disponíveis no mercado, além de numerosos relatos de contaminação e adulteração. Um estudo publicado pela *Drug-Induced Liver Injury Network* (DILIN) em 2019 revelou que, dentre 272 suplementos à base de ervas e dietéticos analisados por cromatografia líquida de alta eficiência, 51% apresentavam rotulagem incorreta.⁴ A FDA estima que esses produtos estejam relacionados a cerca de 50.000 eventos adversos anuais, sendo a maioria associada a lesões renais e hepáticas.⁵

De forma semelhante, no Brasil, a regulamentação de suplementos alimentares também passou por um processo evolutivo. O primeiro marco normativo relevante foi a Portaria nº 32/1998, que estabeleceu diretrizes específicas para suplementos vitamínicos e minerais. Posteriormente, a RDC nº 243/2018 criou uma categoria própria para suplementos alimentares e redefiniu os requisitos sanitários aplicáveis a esses produtos. Apesar desses

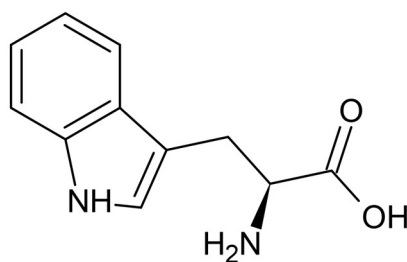
avanços, a fiscalização e o controle de qualidade ainda enfrentam desafios consideráveis, sendo que entre 2020 e 2025, cerca de 63% dos processos de investigação abertos pela ANVISA envolveram suplementos alimentares.⁶

A popularidade dos suplementos vem crescendo significativamente devido às diversas alegações de benefícios associados ao seu consumo, incluindo potencial auxílio na perda de peso,^{7,8} ganho de massa muscular,⁹ fortalecimento da imunidade,¹⁰ dentre outros. Contudo, cabe destacar que a ANVISA, por meio da RDC 243/2018, define suplementos alimentares como produtos que complementam a alimentação, não sendo medicamentos e, portanto, não tratam, previnem ou curam doenças.¹¹

Atualmente, outro uso dos suplementos que vem ganhando destaque são as formulações destinadas a induzir o sono e melhorar sua qualidade.¹²⁻¹⁴ Com a vida moderna e o aumento generalizado da ansiedade, além da necessidade de trabalhos noturnos, há um prejuízo na qualidade de vida geral de pessoas que não possuem um sono reparador.¹⁵ Como consequência, observa-se uma crescente demanda por alternativas que solucionem este problema. Desta forma, os suplementos alimentares tornam-se apelativos devido à sua isenção de prescrição médica e à percepção de menor risco associado ao uso, quando comparados a fármacos convencionais. Entre os suplementos mais utilizados para indução do sono e melhor qualidade do sono reparador, destacam-se a melatonina, vitamina D, zinco, magnésio e triptofano.¹⁶

Triptofano

O L-Triptofano (Trp, L-2-amino-3-(indol-3-il)propiônico), destacado na Figura 1, é um aminoácido essencial utilizado na biossíntese de proteínas, não podendo ser sintetizado pelo organismo humano e, portanto, deve ser ingerido na dieta.^{17,18} Suas principais fontes de obtenção natural são a ingestão de alimentos como leguminosas, laticínios, vegetais e frutas, e a recomendação atual para adultos saudáveis é de cerca de 4 mg kg⁻¹ de L-TRP por dia.¹⁹ Após o consumo, o triptofano é rapidamente absorvido pelos capilares da parede intestinal. Uma pequena quantidade do aminoácido permanece livre, enquanto a maior parte (aproximadamente 80% a 90%) é transportada ligada à albumina através do sangue até o cérebro.²⁰

Figura 1. Estrutura do triptofano

Fonte: A autora.

O metabolismo do triptofano ocorre predominantemente por três vias principais: a via da quinurenina (Kyn), a via da 5-hidroxitriptamina (5-HT) e a via do indol. Dentre elas, a via da quinurenina representa o principal destino metabólico do Trp, sendo responsável pela degradação de mais de 95% desse aminoácido.²¹ A maioria dos metabólitos da via da quinurenina são neuroativos e desempenham papéis essenciais na regulação da função do receptor NMDA (*N*-metil-*D*-aspartato) e na produção de radicais livres. A excitotoxicidade mediada pelo receptor NMDA e a produção excessiva de radicais livres estão envolvidas em doenças neurodegenerativas como a doença de Huntington, a doença de Parkinson e a doença de Alzheimer.²²

O triptofano atua também como precursor fundamental na síntese de serotonina e melatonina, por meio de uma via metabólica distinta. A via serotoninérgica ocorre principalmente no sistema nervoso central, no trato gastrointestinal e nas plaquetas, onde o triptofano é convertido em serotonina (5-HT), sendo a maior parte produzida no trato gastrointestinal.²³ A disponibilidade de triptofano afeta significativamente a produção de serotonina, que, por sua vez, influencia o humor e as funções cognitivas.²⁴

A melatonina (*N*-acetil-5-metoxitriptamina) é o produto da via serotoninérgica, sendo sintetizada predominantemente na glândula pineal, modulando uma grande variedade de processos fisiológicos, incluindo a regulação de efeitos neuroprotetores, funções comportamentais, ritmos circadianos, atividade anti-inflamatória e antioxidante e a estimulação da função imunológica.²⁵ Sua síntese apresenta ritmo circadiano bem definido, com níveis máximos durante o período noturno, o que a torna um mediador essencial na sincronização entre o ciclo luz-escuro e as funções fisiológicas do organismo.²⁶

Tendo em vista este contexto, a suplementação de triptofano tem sido considerada no tratamento de distúrbios do sono e da depressão, principalmente devido à sua relação com a síntese de serotonina e melatonina, sendo também utilizado como auxiliar na melhora de distúrbios cognitivos, ansiedade e doenças neurodegenerativas.²⁷ Além disso, uma ingestão diária de L-TRP pode melhorar e prevenir enxaquecas e sintomas estomacais e intestinais.^{28,29}

Técnicas de quantificação para o triptofano

Algumas técnicas utilizadas na detecção e quantificação de triptofano são descritas na literatura e incluem, por exemplo, cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS – do inglês, *Liquid Chromatography - Mass Spectrometry*)³⁰⁻³², cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – do inglês, *high-performance liquid chromatography*) com detector de fluorescência (HPLC-FLD)³³ e com detecção ultravioleta-visível (HPLC-UV/Vis).³⁴⁻³⁸

No trabalho de Botella et al.³⁵ a técnica de HPLC-UV/Vis foi aplicada para a determinação de triptofano em abóboras (*Cucurbita moschata*). A separação cromatográfica foi realizada sob condições de gradiente de fase reversa, nas quais o efeito do pH e do modificador orgânico também foram estudados. Após a otimização, o processo analítico completo foi validado, possuindo ótima exatidão com recuperação entre 92,0% e 109,0% e desvio padrão relativo inferior a 10,0%. Os limites de detecção obtidos variaram entre 0,04 e 0,07 mg L⁻¹.

Conforme o trabalho de Lan-gan et al.³³, foi desenvolvido um método rápido e sensível utilizando HPLC-FLD para detecção simultânea de ácido quinurênico e triptofano em plasma humano. Para o triptofano a recuperação média foi de 104,43% e o limite de detecção foi de 0,001 µmol L⁻¹. Já para o ácido a recuperação média foi de 101,19% e o limite de detecção foi de 0,05 nmol L⁻¹.

Apesar de fornecerem métodos analíticos precisos e exatos, os equipamentos supracitados exigem um grande esforço nos processos de pré-tratamento de amostras, os quais costumam ser extensos e complexos, com operações detalhadas que exigem um treinamento especializado para o seu uso, além da necessidade de reagentes específicos que possuem, geralmente, um alto custo, assim como os próprios equipamentos e peças. Ainda há a necessidade do transporte de amostras, já que os equipamentos não costumam ser deslocados dos laboratórios de origem.³⁹

A utilização de métodos eletroanalíticos para este aminoácido é amplamente relatada na literatura, principalmente com o uso de eletrodos modificados.⁴⁰⁻⁵⁰ Estes métodos, além de serem baratos do ponto de vista do custo operacional, apresentam facilidade em melhorar a sensibilidade a partir de modificações das superfícies dos eletrodos, o que gera um maior incremento nos resultados obtidos.

A eletroanalítica

Os primeiros registros de estudos voltamétricos datam de 1922, realizados por Heyrovsky e Kuceras usando a polarografia, que consiste em utilizar um eletrodo gotejante de mercúrio como eletrodo de trabalho.⁵¹ Nas últimas décadas, houve uma transição para eletrodos e dispositivos que gerem menos resíduos tóxicos e sejam mais “ambientalmente amigáveis” (*eco-friendly*), aumentando a segurança da técnica para quem a opera e diminuindo seus impactos à natureza.

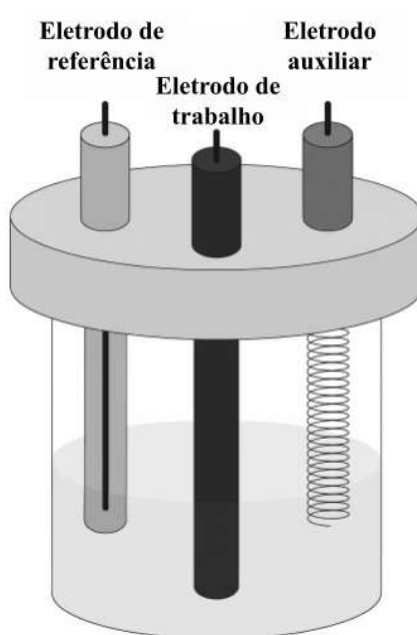
Dentre as técnicas eletroanalíticas, a voltametria tem sido amplamente utilizada. Seu princípio baseia-se na aplicação controlada de um potencial por um determinado tempo sobre a superfície de um eletrodo, obtendo-se uma resposta em forma de corrente, que é proporcional à concentração do analito eletroativo em solução. A passagem de corrente acontece quando elétrons são transferidos entre uma espécie eletroativa (analito) e um eletrodo, durante uma reação redox.⁵² A corrente total medida é constituída por duas componentes. A corrente faradaica, relativa à reação de oxiredução da espécie em estudo no eletrodo e a corrente capacitiva, que ocorre quando a carga se acumula na interface eletrodo-eletrólito, sem envolver reações redox.⁵³ Ambas as correntes coexistem em todas as análises, mas frequentemente busca-se separar ou minimizar a capacitiva (principalmente por técnicas de pulso) e isolar ou amplificar a corrente faradaica, crucial para análise.⁵⁴

Nas análises voltamétricas, três modos de varredura destacam-se por serem mais utilizados, sendo eles a voltametria cíclica (CV, do inglês *cyclic voltammetry*), a voltametria de pulso diferencial (DPV, do inglês *differential pulse voltammetry*) e a voltametria de onda quadrada (SWV, do inglês *square wave voltammetry*). A CV é geralmente empregada para caracterizar o comportamento eletroquímico do sistema.⁵⁵ Já a DPV e SWV são modos de varredura mais sensíveis e que trabalham com o aumento progressivo de pulsos de potencial. As técnicas de pulso têm a vantagem de minimizar a contribuição das correntes capacitivas para o sinal total medido. Essa vantagem é importante, pois as correntes capacitivas não dependem da concentração do analito na solução, atrapalhando principalmente a análise de compostos com concentrações muito baixas.⁵⁶

A célula eletrolítica é composta por três eletrodos: o de trabalho (WE - do inglês *working electrode*) onde a reação eletroquímica de interesse ocorre, o de referência (RE - do inglês *reference electrode*), geralmente feito de calomelano saturado ($\text{KCl}_{\text{sat.}}$) ou de prata/cloreto de prata ($\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{sat.}}$) e o auxiliar (AE - do inglês *auxiliary electrode*), como mostrado na Figura 2.⁵⁷ O conjunto forma um sistema pequeno quando comparado a outros

equipamentos analíticos, como HPLC e GC-MS. Nos últimos anos houve um aumento de artigos científicos focados na miniaturização de sistemas eletroanalíticos, buscando análises rápidas, mas que ainda obtivessem resultados confiáveis e replicáveis. Com o avanço da tecnologia de impressão, atualmente é possível obter dispositivos miniaturizados, compactos e com mínima geração de resíduos, como os eletrodos impressos, que favorecem análises *in loco*, permitindo sua aplicação para monitoramento ambiental, controle de qualidade industrial e em áreas hospitalares.⁵⁸⁻⁶¹

Figura 2. Célula eletrolítica com eletrodos de referência, trabalho e auxiliar.



Fonte: A autora.

Eletrodos impressos

Desde a década de 1990 com a tecnologia de *screen-printing*, adaptada da indústria de microeletrônica, tornou-se possível produzir sensores comerciais em grande escala, com baixo custo, elevada reprodutibilidade e confiabilidade, características que os tornam extremamente promissores para aplicações de monitoramento *in loco*.⁶² O uso combinado de eletrodos impressos e da eletroanálise reduz a necessidade de transporte de amostras para um laboratório e sua preparação, permitindo que as medições sejam feitas diretamente no local de interesse.⁶³

A **Figura 3** traz um exemplo de um eletrodo de carbono impresso (SPCE - do inglês *screen printed carbon electrode*) constituído pelo conjunto de três eletrodos. Neste caso, a célula eletrolítica que normalmente levaria 10 mL de solução, é reduzida para uma gota, que consegue cobrir totalmente o sistema dos eletrodos.

Figura 3. SPCE disponível comercialmente



Fonte: Metrohm⁶⁴

Os eletrodos impressos são bastante versáteis em relação as suas próprias composições e modificações superficiais. Várias substâncias, como ouro, prata, platina e carbono, podem ser aplicadas na construção de eletrodos, permitindo ao analista projetar o melhor dispositivo com base em sua finalidade, para otimizar a seletividade e a sensibilidade do eletrodo frente a um analito.⁶⁵

O uso de eletrodos impressos para análise de triptofano já foi relatado na literatura, sempre com o uso de modificadores. Nazarpour et al.⁶⁶ utilizaram nanopartículas de óxido de grafeno/ouro reduzidas feitas com folhas de *E. tereticornis* como um agente redutor ecologicamente correto. As nanopartículas foram aplicadas em um eletrodo impresso para quantificar triptofano em amostras de saliva, soro e plasma, obtendo-se uma curva de calibração entre 0,5–500 $\mu\text{mol/L}$ ($R = 0,9976$) e um limite de detecção e quantificação de 0,39 e 1,32 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Garg et al.⁶⁷ fez uso de uma eletrofuncionalização assistida por nitreto de carbono e boro em SPE para detecção de triptofano. O sensor desenvolvido foi testado para monitorar os níveis de TRP em matrizes complexas, como alimentos e fluidos corporais humanos, obtendo um limite de detecção de 36,4 nmol L^{-1} , sendo mais baixo que o observado com o eletrodo sem modificação, de 209,0 nmol L^{-1} .

Cabe destacar, porém, que modificações em eletrodos aumentam o tempo de frequência analítica, além de encarecerem o método. Se a resposta gerada pelo modificador não melhorar a seletividade e sensibilidade de forma significativa, sua utilização pode não ser compensada, sendo melhor o uso apenas do eletrodo de trabalho tradicional, caso a resposta ao analito for adequada.

3. OBJETIVOS

Objetivo geral

Desenvolver um método eletroanalítico utilizando eletrodos impressos comerciais para determinar a concentração de triptofano em suplementos alimentares.

Objetivos específicos

- Estudar o comportamento eletroquímico do triptofano em eletrodos impressos de ouro, platina e carbono;
- Otimizar os parâmetros experimentais, tais como pH, eletrólito de suporte e sua concentração analítica, sempre levando em consideração o compromisso entre seus sinais de intensidade de corrente e perfis voltamétricos obtidos;
- Escolher o modo de operação voltamétrico mais adequado ao analito e otimizar seus parâmetros de acordo com a melhor resposta analítica;
- Construir a curva de calibração e obter os valores dos limites de detecção e quantificação;
- Avaliar a sensibilidade do método frente a interferentes comumente encontrados em formulações farmacêuticas;
- Quantificar a concentração de triptofano em formulações de suplementos alimentares disponíveis comercialmente.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes e soluções

Reagentes

Os reagentes que foram utilizados para o desenvolvimento do projeto estão listados no **Quadro 1**.

Quadro 1. Fontes e características dos reagentes que foram utilizados.

REAGENTES	FÓRMULA	MARCA	PUREZA
Ácido acético	C ₂ H ₄ O ₂	Vetec	≥99,7%
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	Acros Organics	≥99,5%
Ácido cítrico	C ₆ H ₈ O ₇	Reagen	≥99,5%
Ácido clorídrico	HCl	Química Moderna	=37,0%
Ácido fosfórico	H ₃ PO ₄	Grupo Química	≥85,0%
Citrato de sódio	NaC ₆ H ₅ O ₇	Sigma-Aldrich	≥99,0%
Fosfato de sódio monohidratado	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	Neon	≥98,7%
Glicina	C ₂ H ₅ NO ₂	Synth	≥99,0%
Hidróxido de sódio	NaOH	Vetec	≥99,0%
Triptofano	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	Sigma-Aldrich	≥98,0%

Soluções

A solução estoque de TRP foi preparada em água ultrapura na concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. As soluções tampão Britton–Robinson (B-R) foram obtidas a partir da mistura dos ácidos acético, bórico e fosfórico ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), em uma faixa de pH entre 2 e 12. Utilizou-se também soluções do tampão citrato, composta por ácido cítrico e citrato de sódio, do tampão HCl-Glicina, composto por ácido clorídrico e glicina, e do tampão McIlvaine, composto por ácido cítrico e fosfato de sódio, todas em pH 3,0. Para ajustar os diferentes valores de pH, utilizaram-se pérolas de NaOH 97%.

O armazenamento das soluções foi realizado sob refrigeração a 4 °C, com utilização em, no máximo, 90 dias. Todas as soluções aquosas foram preparadas utilizando água

ultrapura do sistema Milli-Q, da empresa Millipore (Bedford, MA, USA), que apresenta resistividade de 18,2 M Ω cm a 25°C.

Instrumentação

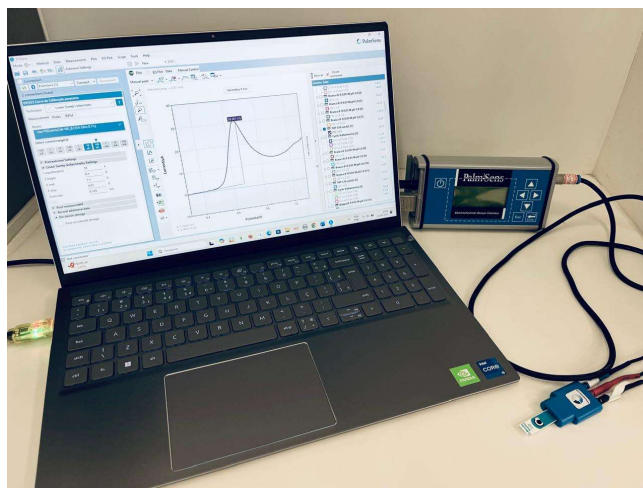
Sistema eletroquímico

As leituras voltamétricas foram realizadas sobre um eletrodo impresso, que consiste em uma única peça dividida em três eletrodos: eletrodo de trabalho, que pode ser feito de carbono, ouro ou platina (possuindo 4 mm de diâmetro); eletrodo auxiliar de material correspondente ao eletrodo de trabalho; e eletrodo de referência de prata. Este conjunto é nomeado de sistema eletroquímico e suporta um volume máximo de 100.0 μ L.

Equipamentos

A obtenção dos voltamogramas foi feita com o uso de um potenciostato/galvanostato PalmSens (Palm Instruments BV – Holanda) conectado a um computador pessoal contendo o *software* PSTrace (versão 5.11). Os eletrodos impressos foram inseridos em um conector adequado, responsável por transmitir os dados gerados ao sistema computacional, sendo posteriormente tratados em programa gráfico. O sistema utilizado para realizar as leituras voltamétricas pode ser visualizado na **Figura 4**. As verificações de pH foram realizadas com o uso de um conjunto medidor de eletrodo combinado Ohaus (Modelo ST3100-F), após calibração.

Figura 4. Sistema utilizado para realização das leituras voltamétricas, contendo potenciostato conectado em um notebook e com um conector para eletrodos impressos.



Fonte: A autora.

Procedimento experimentais

Ativação e limpeza eletroquímica

A ativação da superfície do SPCE foi realizada por meio de 40 leituras de voltametria cíclica entre 1,0 e 2,0 V, a uma velocidade de varredura de 500,0 mV s⁻¹, utilizando 100,0 µL de solução tampão B-R 0,1 mol L⁻¹ em pH 12,0.

O processo de limpeza consistiu na remoção da gota com papel absorvente, seguida de lavagem do eletrodo com água destilada. Adicionalmente, foi realizada uma limpeza eletroquímica mediante três leituras cíclicas aplicando os mesmos parâmetros utilizados no processo de ativação.

Medições eletroquímicas

O primeiro estudo foi feito visando avaliar o comportamento eletroquímico do triptofano em eletrodos impressos de carbono, platina e ouro. Testou-se os eletrodos utilizando o mesmo aparato instrumental descrito no tópico anterior. Para isso foi utilizada uma solução de TRP 10,2 mg L⁻¹ em solução tampão B-R 0,1 mol L⁻¹ (pH 4,0). Foi depositada uma alíquota de 100 µL desta solução na superfície do eletrodo de trabalho utilizando uma velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹, em uma faixa de potencial entre 0,3 V e 1,1 V. Em seguida, estudou-se o perfil voltamétrico em solução B-R com valores de pH entre 2,0 e 8,0, juntamente com os eletrólitos suporte Citrato, HCl-Glicina e McIlvaine, tamponantes na faixa de pH escolhida (pH 3,0), sempre avaliando o melhor compromisso entre intensidade de corrente e perfil voltamétrico. O tampão B-R foi selecionado e avaliado nas concentrações entre 0,025 a 0,3 mol L⁻¹. Também avaliou-se o processo eletroquímico predominante (difusional ou adsorptivo) sobre a superfície do eletrodo, por meio da variação da velocidade de varredura.

Desenvolvimento do método analítico

Para escolha da técnica, utilizou-se dois diferentes modos de varredura de potenciais, sendo eles a voltametria linear (LSV, do inglês *linear scan voltammetry*) e de pulso diferencial (DPV) utilizando como tampão Britton-Robinson 0,05 mol L⁻¹ (pH 3,0) e TRP em concentração de 5,1 mg L⁻¹ no SPCE com velocidade de varredura variando entre 10, 50, 100 e 200 mV s⁻¹ para cada técnica, em uma faixa de potencial entre 0,3 V e 1,1 V. Escolhida a técnica, otimizou-se o parâmetro de velocidade de varredura.

Por fim, a validação do método foi feita pela construção da curva de calibração utilizando-se soluções de TRP nas concentrações entre 0,20 e 16,34 mg L⁻¹ em eletrólito suporte tampão Britton-Robinson 0,05 mol L⁻¹ (pH 3,0) com velocidade de 125 mV s⁻¹ e faixa de potencial entre 0,3 V e 1,0 V. Os parâmetros como limites de detecção e quantificação foram definidos a partir dos dados experimentais obtidos.

De maneira complementar, possíveis interferentes que possam estar presentes em formulações farmacêuticas foram analisados, sendo eles crosprovidona, talco, estearato de magnésio, macrogol, dióxido de titânio, celulose, lactose e os corantes alimentares da marca Mix, nas cores Azul Jeans (água, álcool etílico, corante azul brilhante e tartrazina) e Vermelho Natal (água, álcool etílico, corante bordeaux S. e amarelo crepúsculo). Todos os interferentes foram utilizados em concentração com 10 vezes o valor de TRP (40,8 mg L⁻¹).

Para o teste intra-dia, cinco leituras foram feitas em um mesmo SPCE com uma mesma concentração de TRP no período de um dia. Para o inter-dia, durante cinco dias foram feitas triplicatas diariamente repetindo-se a concentração de 6,12 mg L⁻¹ de TRP em todas as leituras.

Aplicação em amostra

Para as análises foi usada uma formulação farmacêutica de suplemento de triptofano da marca Catarinense Pharma, contendo 430,0 mg do princípio ativo e os excipientes óleo de girassol, gelatina, glicerina, dióxido de titânio, azul brilhante FCF e vermelho 40. Uma cápsula foi diluída em 250 mL de água Milli-Q sob agitação por 2 h. Dessa solução, 40,0 µL foram diluídos com água em um eppendorf de 2,0 mL. Em seguida, 20,0 µL foram diluídos em um eppendorf de 2,0 mL, utilizando-se solução tampão B-R 0,05 mol L⁻¹ em pH 3,0, sendo essa solução utilizada para análise.

Segurança no laboratório

Reagentes tóxicos ou irritantes foram manuseados exclusivamente na capela de exaustão, com o uso devido de equipamentos de proteção individual (jaleco, óculos e luvas), além da manutenção de ventilação constante no ambiente para prevenir o acúmulo de vapores nocivos.

As soluções tampão residuais foram neutralizadas até o valor de pH 7,0 e descartadas na pia. Resíduos foram encaminhados para locais adequados, sendo os líquidos sempre

descartados em bombonas apropriadas, para futuro recolhimento e tratamento adequado por uma equipe especializada.

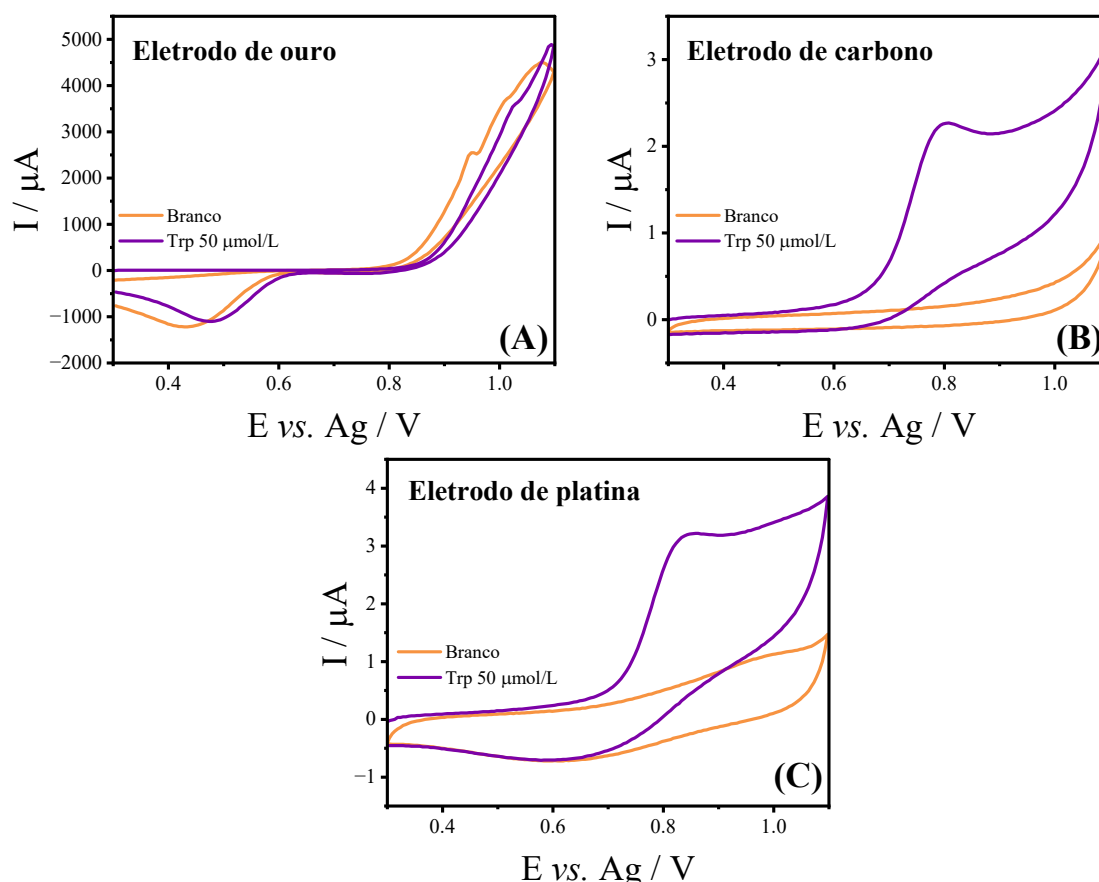
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Comportamento eletroquímico do TRP em eletrodos impressos de carbono, ouro e platina

Inicialmente, estudou-se o comportamento dos eletrodos impressos que possuem melhor resposta frente ao analito TRP. Foram utilizados eletrodos impressos de carbono, ouro e platina, sem etapas de tratamento prévio ou ativação de superfície, sendo avaliados pela técnica de voltametria cíclica, todos com uma solução de TRP de mesma concentração de $10,2 \text{ mg L}^{-1}$, preparada em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ no pH 4,0.

Analisando a **Figura 5A**, tem-se que o eletrodo de ouro não apresentou resposta ao analito, por apresentar apenas os mesmos sinais do branco, que é somente a solução tampão utilizada, sendo eles provenientes do próprio material do eletrodo. Os voltamogramas para os eletrodos de carbono e platina podem ser vistos nas **Figuras 5B e 5C**, respectivamente. Ambos os eletrodos apresentaram somente um sinal de oxidação na presença do analito. Embora os dois tenham demonstrado resposta de intensidade similares, pode-se notar uma diferença entre os perfis dos picos gerados. O sinal de TRP apresentado pelo eletrodo de carbono é mais definido e menos alargado, contendo uma menor contribuição de corrente capacitiva quando comparado ao sinal obtido no eletrodo de platina, fator que pode influenciar na seletividade quando outros compostos estão presentes. Por tal motivo os eletrodos de carbono foram utilizados nos estudos subsequentes desse trabalho.

Figura 5. Voltamogramas cíclicos para o TRP $10,2 \text{ mg L}^{-1}$ em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0) para os eletrodos impressos de trabalho, (A) ouro, (B) carbono e (C) platina; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.



Limpeza eletroquímica

No processo de fabricação dos eletrodos, aditivos são utilizados nas tintas de impressão metálicas, os quais podem influenciar a interação do analito com a superfície, comprometendo sua detecção eletroquímica correta. Por exemplo, propriedades como resistividade, condutividade, rugosidade ou até a taxa de transferência de elétrons podem ser afetadas, comprometendo os resultados e impedindo assim a reprodutibilidade.⁶⁸⁻⁷⁰ Nesse contexto, vários métodos de pré-tratamento de eletrodos podem ser empregados, como tratamento térmico, polimento mecânico e o uso de soluções químicas ou tratamentos eletroquímicos.⁷¹ Para garantir o desempenho e a reprodutibilidade dos eletrodos utilizados, é crucial estabelecer métodos adequados de limpeza de superfície para sua padronização.

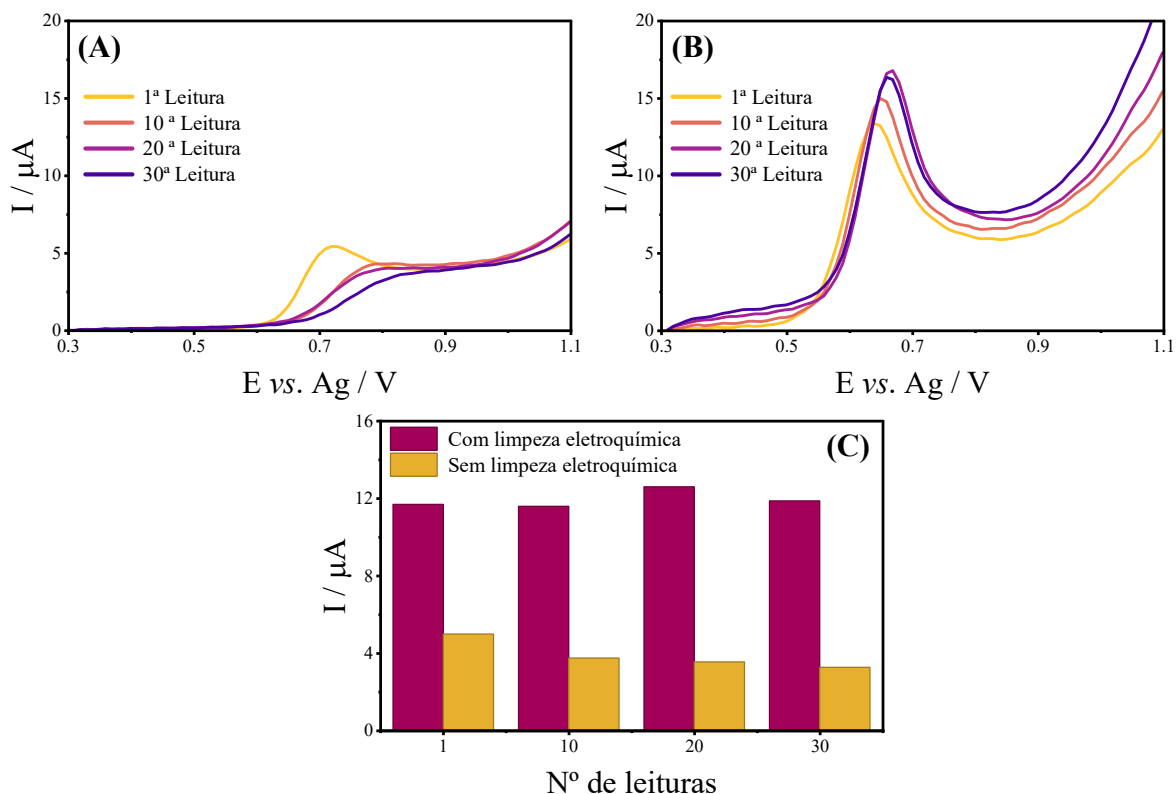
Durante as análises de TRP, percebeu-se uma queda na intensidade de corrente quando era utilizada uma solução da mesma concentração do analito ao realizar análises sequenciais num mesmo eletrodo, como pode ser visto na **Figura 6A**. Uma limpeza simples com água deionizada entre cada leitura não foi capaz de melhorar o resultado observado.

Adicionalmente, além da queda de intensidade, há uma grande perda na definição do sinal após cerca de apenas 10 leituras. Possivelmente, esse resultado decorre da formação de um filme polimérico de TRP na superfície do eletrodo.⁷²

Para dar continuidade aos estudos, foi necessário realizar uma limpeza eletroquímica do SPCE antes de cada análise, baseando-se na metodologia de remoção de filmes poliméricos em eletrodos impressos proposta por Oberhaus et al.⁷³ O processo de limpeza utilizado consiste em realizar três voltametrias cíclicas entre os potenciais de 1,0 V e 2,0 V, em velocidade de 500 mV s⁻¹, utilizando solução tampão B-R em pH 12,0. A escolha do pH foi baseada na maior concentração de NaOH na solução, utilizada no ajuste do pH do tampão. Isso se deve ao fato de que a literatura já relatou a aplicação de limpeza eletroquímica associada a soluções de NaOH para melhorar o desempenho de eletrodos impressos.⁷⁴

Além de remover o filme formado de triptofano, a limpeza também ativa o eletrodo, aumentando a intensidade da resposta de corrente obtida e deslocando o sinal para potenciais mais negativos, como pode ser visto na **Figura 6B**. Sem o processo, uma resposta de 4,97 µA é alcançada na primeira leitura para o TRP em concentração de 4,08 mg L⁻¹, enquanto para o eletrodo ativado, com essa mesma concentração, a intensidade sobe para 11,68 µA, um aumento de 2,4 vezes. Na **Figura 6C** é possível acompanhar a resposta de intensidade de corrente obtida a cada 10 leituras, tanto para o eletrodo com limpeza eletroquímica, quanto para o que não passou por esse processo. Provavelmente a causa desse comportamento resulta da remoção de polímeros e aglutinantes presentes na superfície de eletrodos novos, reduzindo irregularidades e aumentando a área superficial.⁷⁵ Usando o procedimento de limpeza citado, foi possível reutilizar o mesmo eletrodo por 30 vezes sem alterações significativas na intensidade de resposta obtida e perfil voltamétrico, evitando a necessidade de descarte dos SPCEs a cada leitura e diminuindo significativamente a geração de resíduos.

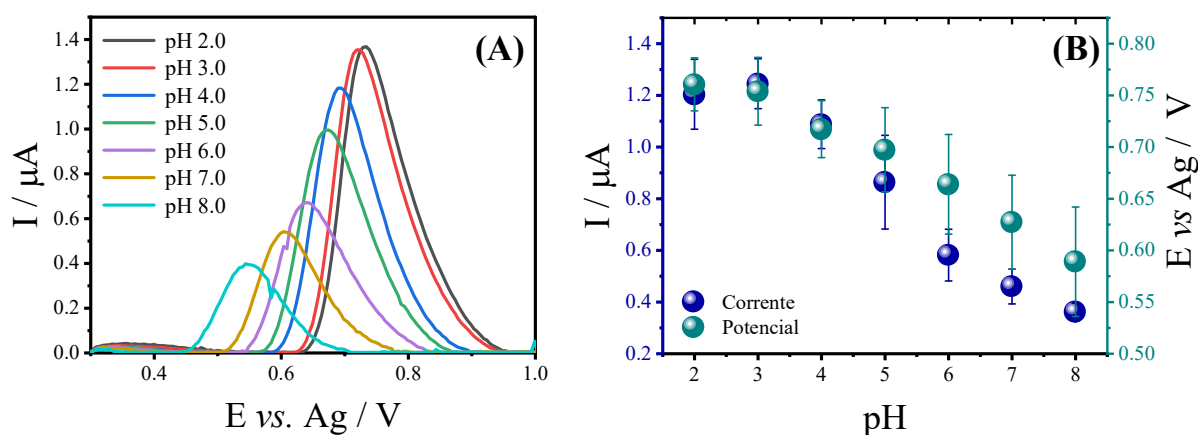
Figura 6. Voltamogramas para TRP 4,08 mg L⁻¹ em B-R 0,5 mol L⁻¹ pH 3,0 em (A) sem limpeza eletroquímica e em (B) com limpeza eletroquímica. (C) comparativo de intensidade de corrente para ambos os métodos.



Otimização dos valores de pH

Realizou-se o estudo da otimização de pH com o intuito de avaliar os efeitos dos diferentes valores na resposta do analito. Utilizando a solução tampão B-R, foram executadas leituras voltamétricas em diferentes pHs. A faixa de pH aplicada neste teste foi de 2,0 a 8,0, sob concentração de 0,1 mol L⁻¹ e velocidade de varredura padronizada a 50,0 mV s⁻¹. A **Figura 7** traz os perfis do TRP com a mudança de pHs. Os resultados mostram um deslocamento no potencial à medida que o pH aumenta ao longo das análises, indicando o envolvimento de prótons nos processos de oxidação.⁷⁶ Levando em consideração o perfil e a maior intensidade da corrente, foi escolhido o valor de pH 3,0 para estudos posteriores.

Figura 7. Estudo de pH em voltametria linear para o TRP $5,1 \text{ mg L}^{-1}$ em solução tampão B-R $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; **(A)** pH 2,0 a 8,0 e **(B)** corrente anódica e valores de potencial versus pH no eletrodo impresso de carbono; velocidade fixa em $50,0 \text{ mV s}^{-1}$.



Estudo eletrólito suporte

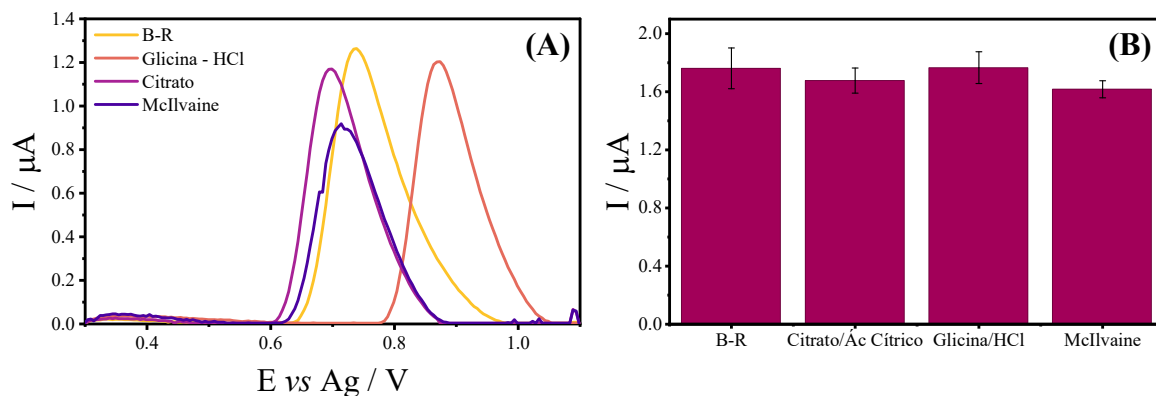
Após averiguar o melhor pH para o TRP, é de suma importância substituir o eletrólito suporte a fim de otimizar o sistema e aumentar a sensibilidade da técnica. O eletrólito suporte possui uma função fundamental em estudos eletroquímicos, certificando a neutralidade de carga e impactando diretamente nos resultados das análises. A escolha adequada e as condições de utilização desse eletrólito são fatores essenciais para assegurar a precisão e a confiabilidade dos dados obtidos.⁷⁷

Dentro da literatura há diversos tipos de tampões disponíveis, escolheu-se aqueles que incluem o pH 3,0 em sua faixa tamponante. Foram utilizados, além do tampão B-R citado anteriormente, as soluções tampões de glicina/HCl, citrato e McIlvaine, todas com concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A **Figura 8A** apresenta os voltamogramas lineares obtidos para o TRP a $5,1 \text{ mg L}^{-1}$. A **Figura 8B** ilustra a relação entre as soluções tampões e a intensidade de corrente de pico. Observando-a é possível perceber que o tampão B-R obteve uma intensidade muito parecida com o tampão de glicina/HCl. Entretanto, o tampão B-R desloca o potencial do sinal para valores mais negativos, reduzindo a energia necessária para o processo de oxidação. Por essas razões, o tampão B-R foi selecionado para experimentos subsequentes.

Entretanto, cabe-se destacar, observando-se a **Figura 8B**, que todos os tampões apresentaram respostas de intensidade de corrente muito semelhantes. Esse comportamento evidencia a possibilidade da utilização de qualquer um dos quatro tampões para aplicação da metodologia, sem comprometimento da corrente, mostrando a versatilidade do método e

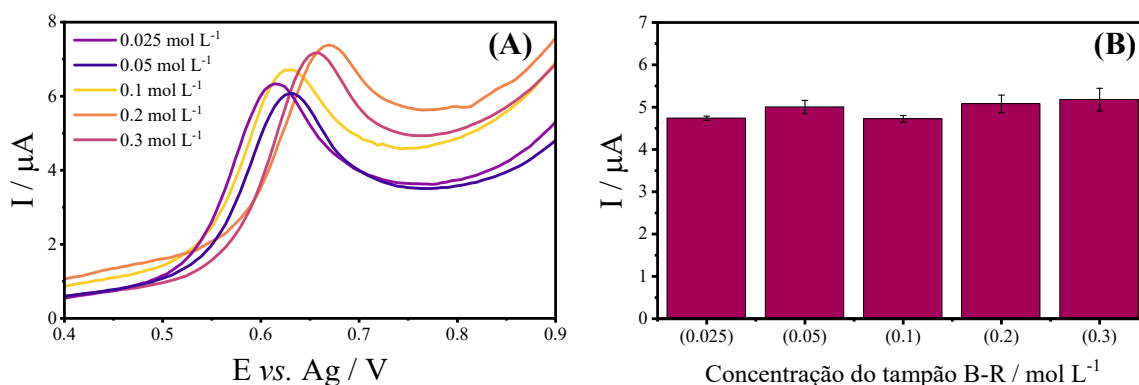
permitindo ao analista maior flexibilidade de escolha conforme sua disponibilidade de reagentes.

Figura 8. (A) Voltamogramas e (B) intensidade de corrente anódica, para os tampões glicina, citrato, Britton-Robinson e McIlvaine, todos a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,0) por voltametria linear utilizando TRP a $5,1 \text{ mg L}^{-1}$ em SPCE; velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .



A otimização da concentração do eletrólito suporte foi realizada em seguida, sendo empregadas diferentes concentrações da solução tampão B-R (pH 3,0) com valores de $0,025$ a $0,3 \text{ mol L}^{-1}$. A **Figura 9** abaixo exibe tanto os voltamogramas referentes às concentrações escolhidas, quanto a intensidade de pico anódica de TRP. Como pode ser visto pela **Figura 9B**, as respostas de corrente foram parecidas entre as concentrações de $0,05$; $0,2$ e $0,3 \text{ mol L}^{-1}$, porém notou-se um maior desvio padrão nas concentrações de $0,2$ e $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ durante as análises. Como a concentração de $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ tem como vantagem também a menor utilização de recursos para sua fabricação por conta de sua menor concentração, esta foi utilizada para realizar os estudos subsequentes.

Figura 9. (A) Voltamogramas para as concentrações de $0,025$, $0,05$, $0,10$, $0,20$ e $0,30 \text{ mol L}^{-1}$ de B-R (pH 3,0) por voltametria linear utilizando TRP a $5,1 \text{ mg L}^{-1}$ em SPCE; velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} e faixa de potencial de $0,3$ a $1,1 \text{ V}$. (B) Intensidade de corrente anódica para as concentrações entre $0,025$ a $0,30 \text{ mol L}^{-1}$ de Britton-Robinson (pH 3,0) obtidas a partir dos voltamogramas anteriores.



Estudo de velocidade de varredura

Um dos estudos realizados para melhorar a forma que são analisadas as amostras dentro da eletroanalítica é a identificação da principal forma que são transferidas as moléculas da amostra para a superfície do eletrodo. Em todas as análises voltamétricas temos duas etapas ocorrendo no momento da leitura, uma é a difusão, onde se tem a transferência de massa do analito do seio da solução para o eletrodo a partir de uma diferença de potencial aplicada. Este processo faz com que ocorra uma diferença de concentração entre a superfície do eletrodo com o restante da solução, gerando, desta forma, a transferência de espécie. Logo após a difusão ocorre a adsorção, onde o analito se prende ao eletrodo até que ocorra a transferência de carga e, assim, seja feita a leitura da corrente. Esses dois processos juntos formam uma cinética onde em diferentes eletrodos e amostras as respostas são distintas. Ou seja, tanto a difusão quanto a adsorção podem ser a etapa lenta do processo e acabar influenciando mais em determinados estudos realizados. Portanto, é necessário entender melhor qual das duas transferências de massa possui maior influência.⁷⁸

A primeira etapa é analisar a linearidade da corrente pela velocidade de varredura. Após plotar os dados obtidos no experimento, fez-se a regressão linear dos pontos da variação da corrente pela velocidade de varredura (**Figura 10B**). A segunda etapa é idêntica à anterior, sendo a única modificação a aplicação da raiz quadrada na velocidade de varredura. Neste procedimento, quando a linearidade do gráfico se aproxima de uma reta, podemos prever que o processo de transferência de massa é primordialmente difusional. Tendo em vista as **Figuras 10B e 10C**, ao analisarmos o valor do coeficiente de determinação R^2 , referente a linearidade dos dados, pode-se insinuar que, provavelmente, a reação ocorreu com um peso maior para a adsorção, que obteve uma linearidade um pouco maior de 0,992. Entretanto, os resultados encontrados não são suficientes para determinar qual processo tem maior influência, sendo necessário seguir para a próxima etapa.⁷⁹

Esta última etapa, diferente das anteriores, está focada na inclinação provocada pelo gráfico do logaritmo da corrente e do logaritmo da velocidade de varredura, onde podemos identificar com maior confiança se o processo é controlado por adsorção ou por difusão.⁸⁰ Para um processo adsorptivo temos que $[i \propto v]$:

$$\log(i) = \text{constante} + \log(v)$$

$$\text{Coeficiente angular} = \frac{\Delta \log(i)}{\Delta \log(v)} = 1,0$$

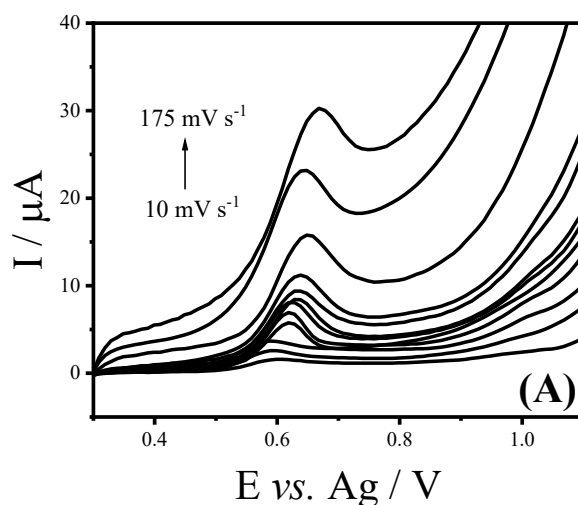
Para um processo controlado por difusão temos que $[i \propto v^{1/2}]$:

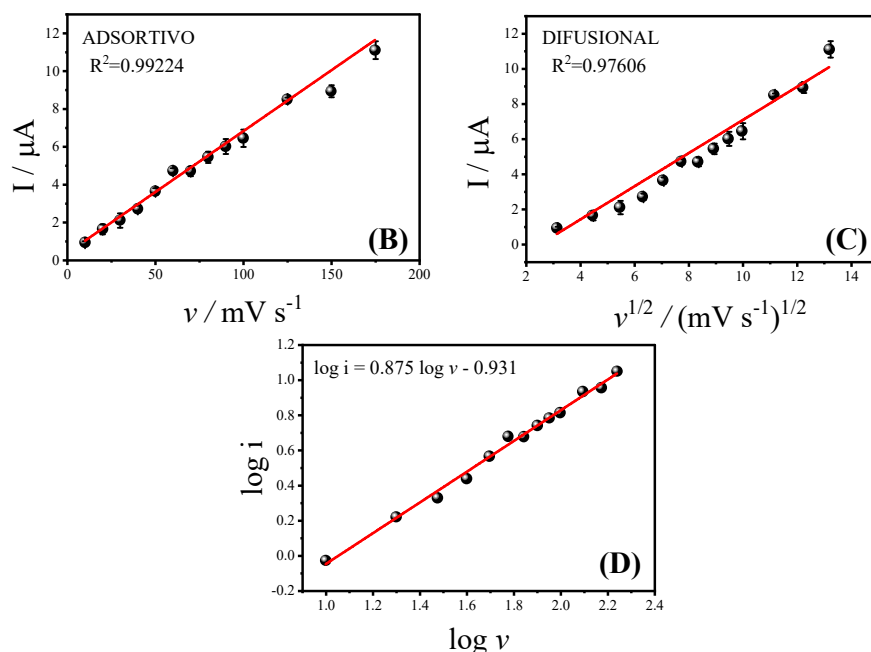
$$\log(i) = \text{constante} + \frac{1}{2} \log(v)$$

$$\text{Coeficiente angular} = \frac{\Delta \log(i)}{\Delta \log(v)} = 0,5$$

O gráfico (**Figura 10D**) logarítmico duplo de corrente *versus* velocidade fornece informações exatas sobre a natureza e a extensão do processo de transferência de carga, onde a inclinação da reta de 0,5 ou 1,0 corresponde aos processos controlados de difusão e adsorção, respectivamente.⁸¹ Inclinações entre 0,5 e 1,0 sugerem que a cinética do sistema não favorece de maneira exclusiva nem a difusão nem a adsorção, resultando em um controle misto do processo.⁸² Esse foi o caso encontrado para o TRP utilizando-se o eletrodo impresso de carbono, que possui uma inclinação de reta de 0,875, apontando que tanto os processos de adsorção quanto de difusão contribuem para a reação, com maior influência da adsorção.

Figura 10. (A) Estudo de velocidade de varredura em voltamogramas lineares para o TRP 5,1 mg L⁻¹ em solução tampão B-R 0,05 mol L⁻¹ (pH 3,0) no SPCE; velocidade entre 10 - 175 mV s⁻¹. (B) I versus v, (C) I versus v^{1/2}, (D) log v versus log i.





Na faixa de potencial estudada, o TRP apresenta apenas um pico de oxidação bem definido no potencial de 0,65 V, indicando um processo irreversível, uma vez que não há nenhum pico de redução observado, sendo esse comportamento característico de aminoácidos essenciais eletroativos.⁸³

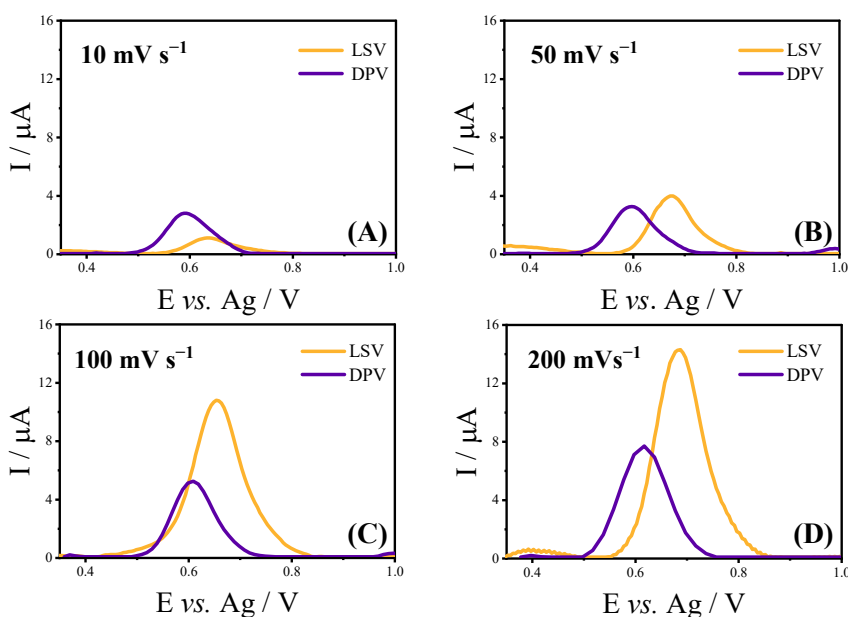
Escolha da técnica eletroanalítica para a determinação do TRP

Dentre os modos de varredura existentes na voltametria três se destacam, sendo eles a voltametria linear (LSV, do inglês *Linear Sweep Voltammetry*), de pulso diferencial (DPV, do inglês *Differential Pulse Voltammetry*) e onda quadrada (SWV, do inglês *Square Wave Voltammetry*). Durante as análises houve dificuldades em obter-se resultados para a SWV, com grande presença de ruídos e deformidades nos picos obtidos, possivelmente pela incompatibilidade dos parâmetros utilizados com o eletrodo impresso. Portanto, apenas as técnicas de LSV e DPV foram testadas para o analito. A fim de comparação, os parâmetros de cada uma foram ajustados de modo que ambas possuíssem a mesma velocidade de varredura.

Os resultados obtidos estão presentes na **Figura 11**. Dentre as quatro velocidades analisadas, a DPV teve a melhor resposta apenas para a de 10,0 mV s^{-1} . Tal resultado provém, possivelmente, da técnica possuir a melhor diferenciação da corrente faradaica quando os valores da velocidade de varredura não ultrapassam 10,0 mV s^{-1} .⁸⁴ Nas três velocidades subsequentes, a LSV foi a técnica que teve o melhor desempenho, principalmente nas maiores

velocidades. Como os suplementos de TRP disponíveis comercialmente apresentam concentrações altas do aminoácido, torna-se adequado utilizar a LSV para os estudos posteriores, mesmo que a técnica não seja tão sensível a concentrações muito baixas. A otimização da técnica também pode ser feita de maneira rápida e simples, tendo apenas a velocidade de varredura como parâmetro relevante para melhorar a análise. Conforme pode visto na **Figura 10A e B**, a velocidade de $125,0 \text{ mV s}^{-1}$ apresentou um sinal definido e com menor contribuição da corrente capacitiva, além de possuir um desvio padrão menor quando comparado a maiores velocidades. Portanto foi a velocidade escolhida para a construção da curva.

Figura 11. Voltamogramas referentes as técnicas de LSV e DPV. Condições experimentais: eletrólito suporte tampão Britton-Robinson $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 3,0) utilizando TRP $5,1 \text{ mg L}^{-1}$ em SPCE com velocidade de varredura variando entre **(A)** $10,0 \text{ mV s}^{-1}$, **(B)** $50,0 \text{ mV s}^{-1}$, **(C)** $100,0 \text{ mV s}^{-1}$, **(D)** $200,0 \text{ mV s}^{-1}$.

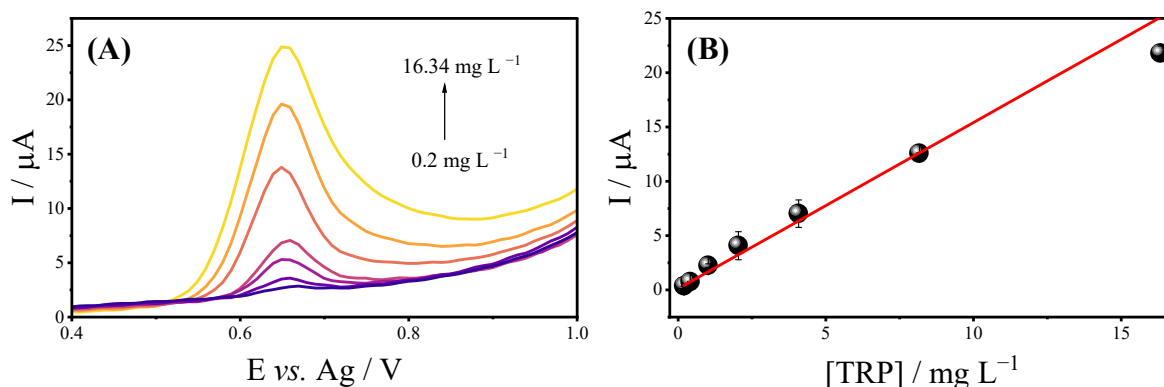


Curva de Calibração

Utilizando a voltametria linear em velocidade de $125,0 \text{ mV s}^{-1}$, seguiu-se para a construção da curva de calibração com diferentes concentrações do TRP. A **Figura 12A** apresenta os voltamogramas que foram obtidos. Para sua elaboração, utilizou-se como eletrólito suporte a solução tampão de B-R $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ajustada para pH 3,0, com concentrações de TRP variando entre 0,20 e $20,4 \text{ mg L}^{-1}$. Entre 0,20 e $16,34 \text{ mg L}^{-1}$ obteve-se uma faixa linear, sendo que valores posteriores à $16,34 \text{ mg L}^{-1}$ tiveram uma diminuição na

intensidade do sinal, possivelmente pela saturação da superfície do eletrodo de carbono pelo analito, fazendo com que concentrações mais altas tendam a atingir uma intensidade constante, devido ao processo de adsorção do TRP. A **Figura 12B** mostra a curva de calibração do TRP ($n = 3$) em SPCE. Pode-se relacionar a concentração de analito e a corrente com a equação de reta encontrada, resultando na equação matemática linear $i = 1,53213$ [TRP] + 0,04604 ($R^2 = 0,9995$), onde i é a corrente de pico em μA e [TRP] é a concentração de triptofano em mg L^{-1} .

Figura 12. (A) Voltamogramas em LSV para diferentes concentrações entre 0,20 e 16,34 mg L^{-1} de triptofano e (B) curva de calibração utilizando valores entre 0,20 e 16,34 mg L^{-1} em SPCE. Condições experimentais: eletrólito suporte tampão Britton-Robinson 0,05 mol L^{-1} (pH 3,0) com velocidade de 125 mV s^{-1} .



Os limites de detecção (do inglês, *limit of detection*, LOD) e quantificação (do inglês, *limit of quantification*, LOQ) foram calculados por meio das seguintes equações, segundo o método recomendado pela ANVISA.⁸⁵

$$LOD = \frac{3,3 DP}{a} \quad (\text{Equação 1})$$

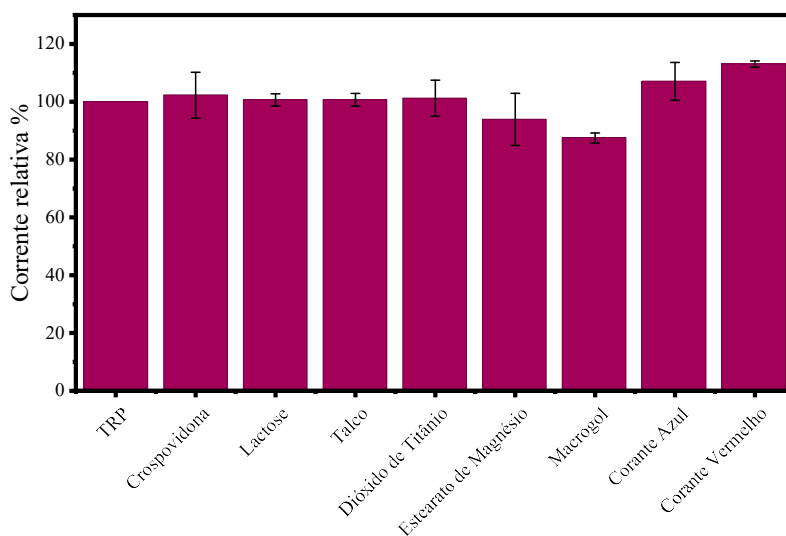
$$LOQ = \frac{10 DP}{a} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde DP representa o valor do desvio padrão do coeficiente linear da equação da reta (0,01639) e a representa o coeficiente angular da reta (1,53213). Aplicando-se os dados resultantes da construção da curva de calibração, pode-se encontrar como limites de detecção e quantificação para o TRP no eletrodo impresso de carbono os seguintes resultados: $LOD = 0,04 \text{ mg L}^{-1}$ e $LOQ = 0,11 \text{ mg L}^{-1}$.

Seletividade e Repetibilidade

Posteriormente aos estudos referentes à curva de calibração, avaliou-se a seletividade do método. Foram selecionados potenciais interferentes que frequentemente são encontrados em formulações farmacêuticas, além dos corantes alimentícios presentes na amostra analisada, sendo eles crospovidona, lactose, talco, dióxido de titânio, estearato de magnésio, macrogol e os corantes azul (INS 133) e vermelho (INS 123). Todos os interferentes foram analisados em concentração 10 vezes superior ao analito. A **Figura 13** apresenta os dados obtidos e os seus respectivos desvios ($n = 3$). Em todos os casos testados, a interferência foi inferior a 13%, estando de acordo com o valor recomendado ($< 15\%$), indicando adequada seletividade do método.⁸⁶

Figura 13. Resposta de corrente relativa de cada interferente em porcentagem. TRP 4,08 mg L⁻¹ em tampão B-R 0,05 mol L⁻¹ pH 3,0 ($n = 3$).



A repetibilidade das medições para TRP 6,12 mg L⁻¹ foi avaliada sob condições otimizadas, monitorando-se o desvio do sinal da corrente de pico. O desvio padrão relativo (DPR) obtido para medições intra-dia foi de 0,60%, enquanto para medições inter-dia foi de 3,22% ao longo de cinco dias consecutivos ($n = 3$). Portanto, os valores de DPR encontrados indicam que a metodologia proposta apresenta uma repetibilidade satisfatória.

Aplicação em amostra de suplemento

A aplicação analítica do método foi feita com formulações farmacêuticas de cápsulas de triptofano por meio de calibração externa ($n = 3$), sendo obtidos valores de média $493,3 \pm 32,4$ mg, uma recuperação de $114,3 \pm 7,6$ % quando comparada ao valor presente no rótulo do suplemento de 430,0 mg. Os valores um pouco elevados da recuperação podem ocorrer devido ao processo de controle de qualidade dos suplementos alimentares, que não são rigorosos como os aplicados aos fármacos,¹¹ podendo haver uma leve variação na concentração dos princípios ativos. Em um estudo de Setyaningsih et al. sobre controle de qualidade em suplementos de prolina, foram apresentados valores de teor que oscilaram entre 73% e 121% do declarado no rótulo, evidenciando a ocorrência tanto de sub-rotulagem quanto de super-rotulagem nesses produtos.⁸⁷ Contudo, os valores de recuperação obtidos para o TRP nesse estudo estão dentro das diretrizes determinadas pela AOAC⁸⁶, onde a porcentagem encontrada deve estar entre 80 e 120% para as concentrações avaliadas.

Tabela 1. Determinação de TRP em formulações farmacêuticas ($n = 3$)

Amostra	Rótulo (mg)	Experimental (mg)	Recuperação (%)
Fórmula farmacêutica	430	$493,3 \pm 32,4$	$114,3 \pm 7,6$

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho o SPCE sem modificação foi utilizado para a detecção do TRP por meio de uma abordagem metodológica simples, rápida, econômica e de baixa produção de resíduos. O eletrodo impresso de carbono apresentou um desempenho promissor em comparação com os SPE de ouro e platina. As melhores condições encontradas foram com a utilização da solução tampão Britton-Robinson com concentração de $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 3,0. O estudo de velocidade resultou que o TRP apresenta um processo controlado tanto pela adsorção quanto pela difusão, sendo um sistema irreversível, já que não possui pico de redução na faixa estudada. A técnica eletroanalítica de LSV foi a escolhida, já que exibiu o melhor comprometimento entre intensidade de corrente e qualidade do sinal analítico. Com os parâmetros obtidos, construiu-se uma curva de calibração apresentando uma faixa linear ($R^2 = 0,9995$) entre $0,20$ e $16,34 \text{ mg L}^{-1}$, possuindo um LOD de $0,04 \text{ mg L}^{-1}$ e um LOQ de $0,11 \text{ mg L}^{-1}$. O estudo da seletividade se mostrou promissor ao apresentar uma interferência inferior a 13%. A avaliação da precisão intradia e interdia, assim como a recuperação relativa, apresentaram resultados dentro das faixas estabelecidas pelas diretrizes da AOAC.

7. REFERÊNCIAS

1. Rautiainen, S., Manson, J. E., Lichtenstein, A. H. & Sesso, H. D. Dietary supplements and disease prevention-a global overview. *Nat Rev Endocrinol* 12, 407–420 (2016).
2. Gurley, B. J., McGill, M. R. & Koturbash, I. Hepatotoxicity due to herbal dietary supplements: Past, present and the future. *Food and Chemical Toxicology* 169, 113445 (2022).
3. Lin, J. K. S. & Tujios, S. R. Hidden Dangers: Herbal and Dietary Supplement Induced Hepatotoxicity. *Livers* 2023, Vol. 3, Pages 618-636 3, 618–636 (2023).
4. Navarro, V. *et al.* The Contents of Herbal and Dietary Supplements Implicated in Liver Injury in the United States Are Frequently Mislabeled. *Hepatol Commun* 3, 792–794 (2019).
5. Marcus, D. M. Dietary supplements: What’s in a name? What’s in the bottle? *Drug Test Anal* 8, 410–412 (2016).
6. Anvisa alerta sobre a baixa qualidade de suplementos alimentares no mercado nacional - Notícias - Portal da Câmara dos Deputados.
<https://www.camara.leg.br/noticias/1190374-anvisa-alerta-sobre-a-baixa-qualidade-de-suplementos-alimentares-no-mercado-nacional/>.
7. Bonetti, G. *et al.* Dietary supplements for obesity. *J Prev Med Hyg* 63, E160 (2022).
8. Batsis, J. A. *et al.* A Systematic Review of Dietary Supplements and Alternative Therapies for Weight Loss. *Obesity* 29, 1102–1113 (2021).
9. Daher, J., Mallick, M. & El Khoury, D. Prevalence of Dietary Supplement Use among Athletes Worldwide: A Scoping Review. *Nutrients* 14, 4109 (2022).
10. Cappellucci, G. *et al.* Investigation on the Efficacy of Two Food Supplements Containing a Fixed Combination of Selected Probiotics and β -Glucans or Elderberry Extract for the Immune System: Modulation on Cytokines Expression in Human THP-1 and PBMC. *Foods* 2024, Vol. 13, Page 458 13, 458 (2024).
11. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da diretoria colegiada - RDC no 243, de 26 de junho de 2018. Dispõe sobre os requisitos sanitários dos suplementos alimentares. Diário Oficial da União, Brasília, 26 jun. 2018.
12. Esquivel, M. K. & Ghosn, B. Current Evidence on Common Dietary Supplements for Sleep Quality. *Am J Lifestyle Med* 18, 323–327 (2024).
13. Imafuku, F., Yamamoto, K., Tanaka, E., Aoki, R. & Nishino, S. Analysis of the Effects of Known Sleep-Support Supplements in Relation to Life Habits, Sleep Conditions, and Sleep Problems. *Nutrients* 15, 2377 (2023).

14. Chan, V. & Lo, K. Efficacy of dietary supplements on improving sleep quality: a systematic review and meta-analysis. *Postgrad Med J* 98, 285–293 (2022).
15. Haidarimoghadam, R. *et al.* The effects of consecutive night shifts and shift length on cognitive performance and sleepiness: a field study. *International Journal of Occupational Safety and Ergonomics* 23, 251–258 (2017).
16. Sutanto, C. N., Loh, W. W. & Kim, J. E. The impact of tryptophan supplementation on sleep quality: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *Nutr Rev* 80, 306–316 (2022).
17. Júnior, D. T. S., Verde, T. F. C. L. & Landim, L. A. S. R. Foods rich in tryptophan and its effect on serotonin release and possible benefits in anxiety disorder. *Research, Society and Development* 10, e471101422190–e471101422190 (2021).
18. Modoux, M., Rolhion, N., Mani, S. & Sokol, H. Tryptophan Metabolism as a Pharmacological Target. *Trends Pharmacol Sci* 42, 60–73 (2021).
19. Zhu, H., Yang, X. & Zhao, Y. Recent Advances in Current Uptake Situation, Metabolic and Nutritional Characteristics, Health, and Safety of Dietary Tryptophan. *J Agric Food Chem* 72, 6787–6802 (2024).
20. Paredes, S. D., Barriga, C., Reiter, R. J. & Rodríguez, A. B. Assessment of the potential role of tryptophan as the precursor of serotonin and melatonin for the aged sleep-wake cycle and immune function: *Streptopelia risoria* as a model. *International Journal of Tryptophan Research* 2, 23–36 (2009).
21. Xue, C. *et al.* Tryptophan metabolism in health and disease. *Cell Metab* 35, 1304–1326 (2023).
22. Vécsei, L., Szalárdy, L., Fülöp, F. & Toldi, J. Kynurenines in the CNS: recent advances and new questions. *Nature Reviews Drug Discovery* 2012 12:1 12, 64–82 (2012).
23. Gabela, A. M., Mthembu, N. & Hadebe, S. Tryptophan metabolism in health and disease- implications for non-communicable diseases. *Immunol Lett* 277, 107093 (2026).
24. Rao, R. *et al.* Tryptophan and Its Metabolite Serotonin Impact Metabolic and Mental Disorders via the Brain–Gut–Microbiome Axis: A Focus on Sex Differences. *Cells* 2025, Vol. 14, Page 384 14, 384 (2025).
25. Li, Y., Hu, N., Yang, D., Oxenkrug, G. & Yang, Q. Regulating the balance between the kynurenine and serotonin pathways of tryptophan metabolism. *FEBS Journal* 284, 948–966 (2017).
26. Szataniak, I. & Packi, K. Melatonin as the Missing Link Between Sleep Deprivation and Immune Dysregulation: A Narrative Review. *International Journal of Molecular Sciences* 2025, Vol. 26, Page 6731 26, 6731 (2025).

27. Kałużna-Czaplińska, J., Gałtarek, P., Chirumbolo, S., Chartrand, M. S. & Bjørklund, G. How important is tryptophan in human health? *Crit Rev Food Sci Nutr* 59, 72–88 (2019).
28. Körtési, T., Spekker, E. & Vécsei, L. Exploring the Tryptophan Metabolic Pathways in Migraine-Related Mechanisms. *Cells* 2022, Vol. 11, Page 3795 11, 3795 (2022).
29. Fila, M. *et al.* Kynurenine Pathway of Tryptophan Metabolism in Migraine and Functional Gastrointestinal Disorders. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 10134 22, 10134 (2021).
30. Zhang, Q. F., Xiao, H. M., Zhan, J. T., Yuan, B. F. & Feng, Y. Q. Simultaneous determination of indole metabolites of tryptophan in rat feces by chemical labeling assisted liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chinese Chemical Letters* 33, 4746–4749 (2022).
31. Yamada, K., Miyazaki, T., Shibata, T., Hara, N. & Tsuchiya, M. Simultaneous measurement of tryptophan and related compounds by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 867, 57–61 (2008).
32. Marcos, J. *et al.* Targeting tryptophan and tyrosine metabolism by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1434, 91–101 (2016).
33. Lan-gan, P., Ai-guo, T., Xi-ming, M., Xi-bo, L. & Xiang, A. More rapid and sensitive method for simultaneous determination of tryptophan and kynurenic acid by HPLC. *Clin Biochem* 42, 420–425 (2009).
34. Eid, S. M., Farag, M. A. & Bawazeer, S. Underivatized Amino Acid Chromatographic Separation: Optimized Conditions for HPLC-UV Simultaneous Quantification of Isoleucine, Leucine, Lysine, Threonine, Histidine, Valine, Methionine, Phenylalanine, Tryptophan, and Tyrosine in Dietary Supplements. *ACS Omega* 7, 31106–31114 (2022).
35. Botella, M. B. *et al.* Direct determination of tyrosine and tryptophane enantiomers in pumpkin (*Cucurbita moschata*) by HPLC-UV/Vis: Effect of cooking treatment on enantiomers profile. *Journal of Food Composition and Analysis* 122, 105469 (2023).
36. Lomenova, A. & Hroboňová, K. Application of achiral–chiral two-dimensional HPLC for separation of phenylalanine and tryptophan enantiomers in dietary supplement. *Biomedical Chromatography* 35, e4972 (2021).
37. Tamili, D., Jana, S. & Bhattacharjee, P. Chromatographic method development for simultaneous determination of serotonin, melatonin, and L-tryptophan: Mass transfer modeling, chromatographic separation factors, and method prediction by artificial neural network. *J Chemom* 37, e3520 (2023).

38. Zhang, S., Ma, Y., Ma, R., Wang, Q. & Dang, J. Combination of Medium- and High-Pressure Liquid Chromatography for Isolation of L-tryptophan (Q-marker) from *Medicago sativa* Extract. *Separations* 2022, Vol. 9, Page 240 9, 240 (2022).
39. Jang, A., Zou, Z., Lee, K. K., Ahn, C. H. & Bishop, P. L. Potentiometric and voltammetric polymer lab chip sensors for determination of nitrate, pH and Cd(II) in water. *Talanta* 83, 1–8 (2010).
40. Pogacean, F. *et al.* Investigation of L-Tryptophan Electrochemical Oxidation with a Graphene-Modified Electrode. *Biosensors (Basel)* 11, (2021).
41. Lima, D., Andrade Pessôa, C., Wohnrath, K., Humberto Marcolino-Junior, L. & Fernando Bergamini, M. A feasible and efficient voltammetric sensor based on electropolymerized L-arginine for the detection of L-tryptophan in dietary supplements. *Microchemical Journal* 181, 107709 (2022).
42. Tasić, Ž. Z. *et al.* Electrochemical determination of L-tryptophan in food samples on graphite electrode prepared from waste batteries. *Sci Rep* 12, 1–11 (2022).
43. Zhang, S., Ling, P., Chen, Y., Liu, J. & Yang, C. 2D/2D porous Co₃O₄/rGO nanosheets act as an electrochemical sensor for voltammetric tryptophan detection. *Diam Relat Mater* 135, 109811 (2023).
44. Li, Y. J. *et al.* Constructing electrochemical sensor using molecular-imprinted polysaccharide for rapid identification and determination of l-tryptophan in diet. *Food Chem* 425, 136486 (2023).
45. Khan, Z. A., Hong, P. J. S., Lee, C. H. & Hong, Y. Recent advances in electrochemical and optical sensors for detecting tryptophan and melatonin. *Int J Nanomedicine* 16, 6861–6888 (2021).
46. Nasimi, H. *et al.* Electrochemical sensors for screening of tyrosine and tryptophan as biomarkers for diseases: A narrative review. *Microchemical Journal* 190, 108737 (2023).
47. Razmi, H., Maleki, F. & Saedi, B. Ultra-sensitive electrochemical sensor based on molecularly imprinted polydopamine grafted with MWCNT-COOH for tryptophan detection. *Microchimica Acta* 192, 1–17 (2025).
48. Sidharthan, P. *et al.* Electrochemical detection of essential amino acid tryptophan in food samples using CuZnS-modified carbon nanofiber composite. *Microchemical Journal* 209, 112793 (2025).
49. Suvari, G. & Guler, M. Electrochemical Tryptophan Sensor Depending on the Electrodeposition of Au Nanoparticles on the Activated Glassy Carbon Electrode. *ChemistrySelect* 10, e01984 (2025).

50. Narasimhappa, P. & Ramamurthy, P. C. An electrochemical approach for tryptophan detection that regulates the kynurenine pathway. *Sci Rep* 15, 1–10 (2025).
51. Aleixo, L. M. Voltametria: conceitos e técnicas. *Revista Chemkeys* 1–21 (2003) doi:10.20396/CHEMKEYS.V0I3.9609.
52. Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. Fundamentos de Química Analítica, Tradução da 8a Edição norte-americana, Ed. Cengage, Thomson, São Paulo-SP, 2006.
53. Biesheuvel, P. M., Porada, S. & Dykstra, J. E. The difference between Faradaic and non-Faradaic electrode processes. (2018).
54. De Souza, D., Machado, S. A. S. & Avaca, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. *Quim Nova* 26, 81–89 (2003).
55. Arellano, M. *et al.* Differential pulse voltammetry as a powerful tool to monitor the electro-Fenton process. *Electrochim Acta* 354, 136740 (2020).
56. Machado, S. A. S. & Cincotto, F. H. Electrochemical Methods Applied for Bioanalysis: Differential Pulse Voltammetry and Square Wave Voltammetry. *Tools and Trends in Bioanalytical Chemistry* 273–282 (2022) doi:10.1007/978-3-030-82381-8_14.
57. Scholz, F. Voltammetric techniques of analysis: the essentials. *ChemTexts* 1, 1–24 (2015).
58. Cardoso Gomes-Junior, P. *et al.* Voltammetric determination of uric acid using a miniaturized platform based on screen-printed electrodes modified with platinum nanoparticles. *Microchemical Journal* 207, 111931 (2024).
59. Fethi, A. & Hicham, M. Carbon Electrodes as Emerging Platforms for Miniaturization of Electrochemical Biosensors. *Miniaturized Biosensing Devices: Fabrication and Applications* 39–55 (2022) doi:10.1007/978-981-16-9897-2_2.
60. de Moraes, N. C., da Silva, E. N. T., Petroni, J. M., Ferreira, V. S. & Lucca, B. G. Design of novel, simple, and inexpensive 3D printing-based miniaturized electrochemical platform containing embedded disposable detector for analytical applications. *Electrophoresis* 41, 278–286 (2020).
61. Materon, E. M. *et al.* Combining 3D printing and screen-printing in miniaturized, disposable sensors with carbon paste electrodes. *J Mater Chem C Mater* 9, 5633–5642 (2021).
62. Renedo, O. D., Alonso-Lomillo, M. A. & Martínez, M. J. A. Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications. *Talanta* 73, 202–219 (2007).

63. García-Miranda Ferrari, A., Rowley-Neale, S. J. & Banks, C. E. Screen-printed electrodes: Transitioning the laboratory in-to-the field. *Talanta Open* 3, 100032 (2021).
64. Screen-Printed Carbon Electrode | Metrohm.
https://www.metrohm.com/pt_br/products/110/110.html.
65. Paimard, G., Ghasali, E. & Baeza, M. Screen-Printed Electrodes: Fabrication, Modification, and Biosensing Applications. *Chemosensors* 2023, Vol. 11, Page 113 11, 113 (2023).
66. Nazarpour, S., Hajian, R. & Sabzvari, M. H. A novel nanocomposite electrochemical sensor based on green synthesis of reduced graphene oxide/gold nanoparticles modified screen printed electrode for determination of tryptophan using response surface methodology approach. *Microchemical Journal* 154, 104634 (2020).
67. Garg, S., Singh, A., Parmar, A. S. & Rosy, N. Boron Carbon Nitride-Assisted Electro-Functionalization of Screen-Printed Electrode for Tryptophan Sensing. *ACS Appl Nano Mater* 6, 14849–14860 (2023).
68. Stan, D. *et al.* What Is the Optimal Method for Cleaning Screen-Printed Electrodes? *Processes* 10, 723 (2022).
69. Araújo, D. A. G. *et al.* A lab-made screen-printed electrode as a platform to study the effect of the size and functionalization of carbon nanotubes on the voltammetric determination of caffeic acid. *Microchemical Journal* 158, 105297 (2020).
70. Thoeny, V. *et al.* Comparison of different noble metal-based screen-printed sensors for detection of PIK3CA point-mutations as biomarker for circulating tumor DNA. *Electrochim Acta* 455, 142336 (2023).
71. García García, D. *et al.* Impact of cleaning procedures on screen-printed gold electrodes performance for mutation detection. *J Appl Electrochem* 55, 1937–1946 (2025).
72. Malfoy, B. & Reynaud, J. A. Electrochemical investigations of amino acids at solid electrodes: Part II. Amino acids containing no sulfur atoms: Tryptophan, tyrosine, histidine and derivatives. *J Electroanal Chem Interfacial Electrochem* 114, 213–223 (1980).
73. Oberhaus, F. V. & Frense, D. Fast, simple, and gentle method for removal of polythiophene and other conductive polymer films from gold electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 895, 115466 (2021).
74. Wei, H. *et al.* Enhanced electrochemical performance at screen-printed carbon electrodes by a new pretreating procedure. *Anal Chim Acta* 588, 297–303 (2007).
75. Wei, H. *et al.* Enhanced electrochemical performance at screen-printed carbon electrodes by a new pretreating procedure. *Anal Chim Acta* 588, 297–303 (2007).

76. Gao, G. & Wang, L. W. The concerted proton-electron transfer mechanism of proton migration in the electrochemical interface. *iScience* 26, 108318 (2023).
77. Fletcher, S. Screen-Printed Carbon Electrodes. *Advances in Electrochemical Science and Engineering* 16, 425–443 (2016).
78. Bard, A. J.; Faulkner, L. R.; White, H. S. *Electrochemical Methods Fundamentals and Applications*, 3rd ed.; John Wiley & Sons, Ltd Edition, 2022.
79. Brett, C. M. A.; Brett, A. M. O. *Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications*; Oxford University Press Inc.: New York, 1993.
80. Shih, Y., Zen, J. M., Kumar, A. S. & Chen, P. Y. Flow injection analysis of zinc pyrithione in hair care products on a cobalt phthalocyanine modified screen-printed carbon electrode. *Talanta* 62, 912–917 (2004).
81. Scholz, F. *Electroanalytical methods: Guide to experiments and applications. Electroanalytical Methods: Guide to Experiments and Applications* 1–359 (2010) doi:10.1007/978-3-642-02915-8/COVER.
82. Zhou, Y. *et al.* Selective determination of dopamine and uric acid using electrochemical sensor based on poly(alizarin yellow R) film-modified electrode. *Analytical Methods* 6, 3474–3481 (2014).
83. Moulae, K. & Neri, G. Electrochemical Amino Acid Sensing: A Review on Challenges and Achievements. *Biosensors 2021, Vol. 11, Page 502* 11, 502 (2021).
84. FATIBELLO FILHO, Orlando; SILVA, Tiago Almeida; MORAES, Fernando Cruz de; SITTA, Elton. *Eletroanálises: Aspectos Teóricos e Práticos*. São Carlos: Edufscar, 2022. 504 p.
85. Ministério da Saúde-MS Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA.
86. Guidelines for Standard Method Performance Requirements - AOAC INTERNATIONAL. <https://www.aoac.org/resources/guidelines-for-standard-method-performance-requirements/>.
87. Stępień, K. A., Krawczyk, W. & Giebułtowicz, J. Dietary Supplements with Proline—A Comprehensive Assessment of Their Quality. *Life* 2023, Vol. 13, Page 263 13, 263 (2023).