

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA APLICADA

DHÉSMON LIMA

ELETRODOS DE PASTA DE CARBONO VÍTREO MODIFICADOS COM
NANOPARTÍCULAS DE OURO ESTABILIZADAS EM PORFIRANA:
POTENCIAIS APLICAÇÕES PARA A DETECÇÃO DO AGENTE ANTITUMORAL
5-FLUOROURACIL

PONTA GROSSA

2016

DHÉSMON LIMA

ELETRODOS DE PASTA DE CARBONO VÍTREO MODIFICADOS COM
NANOPARTÍCULAS DE OURO ESTABILIZADAS EM PORFIRANA:
POTENCIAIS APLICAÇÕES PARA A DETECÇÃO DO AGENTE ANTITUMORAL
5-FLUOROURACIL

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Química Aplicada no Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Prof. Dr^a Christiana Andrade Pessôa
Co-orientador: Prof. Dr. Adriano Gonçalves Viana

PONTA GROSSA

2016

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

Lima, Dhésmon

L732 Eletrodos de pasta de carbono vítreo modificados com nanopartículas de ouro estabilizadas em porfirana: potenciais aplicações para a detecção do agente antitumoral 5-fluorouracil/ Dhésmon Lima. Ponta Grossa, 2016.
141f.

Dissertação (Mestrado em Química Aplicada - Área de Concentração: Química), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Prof^a Dr^a Christiana Andrade Pessôa.

Coorientador: Prof. Dr. Adriano Gonçalves Viana.

1.Eletrodo de pasta de carbono vítreo.
2.Nanopartículas de ouro. 3.Porfirana.
4.Voltametria. 5.5-fluorouracil. I.Pessôa, Christiana Andrade. II. Viana, Adriano Gonçalves. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em Química Aplicada. IV. T.

CDD: 541.37

TERMO DE APROVAÇÃO

DHÉSMON LIMA

**“ELETRODOS DE PASTA DE CARBONO VÍTREO MODIFICADOS
COM NANOPARTÍCULAS DE OURO ESTABILIZADAS EM
PORFIRANA: POTENCIAIS APLICAÇÕES PARA A
DETERMINAÇÃO DE AGENTE ANTITUMORAL 5-
FLUOROURACIL.”**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora.

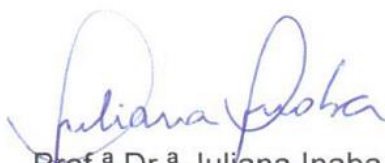
Orientador:



Prof.^a Dr.^a Christiana Andrade Pessoa
UEPG/PR



Prof.^a Dr.^a Eryza Guimarães Castro
UNICENTRO/PR



Prof.^a Dr.^a Juliana Inaba
UEPG/PR

Ponta Grossa, 26 de fevereiro de 2016.

Aos meus queridos pais, Sônia e Luiz César.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço ao meu grandioso Deus e à minha querida Mãe, Nossa Senhora, por terem me abençoado e protegido, permitindo que esta conquista tão importante fosse alcançada. Obrigado por serem a Luz que ilumina o meu caminho!

Meus sinceros agradecimentos à minha amada família, especialmente aos meus pais, Sônia e Luiz César, à minha irmã Adriana e aos meus sobrinhos Jéssyka e Jean, por todo o apoio e incentivos dados a mim. Em vocês, encontrei força, paz e amor em todos os momentos.

Agradeço à prof. Dr^a. Christiana Andrade Pessoa, pela orientação neste trabalho e durante todos os meus anos de iniciação científica, e ao meu co-orientador prof. Dr. Adriano Gonçalves Viana. Obrigado pelos seus ensinamentos e por todo o conhecimento passado, sem os quais este trabalho não poderia ter sido desenvolvido.

Obrigado à minha namorada Ana, cujo apoio e amor foram muito mais do que um incentivo para que esta conquista fosse possível. Sou muito feliz por ter você ao meu lado! Obrigado por fazer parte da minha vida!

Agradeço meus queridos “amigos-irmãos” de infância Eduarda e Renato. A amizade e o apoio de vocês foi determinante para que eu pudesse chegar até aqui! Meus agradecimentos a também meus amigos de graduação Tanna e Rafael pela convivência, amizade e pelos tantos momentos de descontração, que deixaram os anos de mestrado bem mais agradáveis.

Agradeço a meus grandes amigos de laboratório Giselle, Ellen, Cléverson, Luma, Rosana, Silvane, Andressa e Valéria, e a todos os demais integrantes do GDEM, por ajudarem na resolução de minhas dúvidas e pelas conversas descontraídas e animadas. Sem dúvida, não poderia ter escolhido um grupo de pesquisa melhor!

Também agradeço ao Complexo de Laboratórios Multiusuários da UEPG (C-labmu) pela realização das muitas análises que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho.

Por fim, quero agradecer a todos aqueles que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para a execução deste trabalho e me apoiaram durante estes dois anos de mestrado, contribuindo para o meu aprendizado e crescimento pessoal. A todos vocês, muito obrigado!

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais volta ao seu tamanho original.”

(Albert Einstein)

RESUMO

Neste trabalho, eletrodos de pasta de carbono vítreo (EPCV) foram modificados com nanopartículas de ouro estabilizadas no polissacarídeo sulfatado porfirana (PFR) e aplicados para a determinação do agente antitumoral 5-fluorouracil (5-FU), utilizando voltametria de pulso diferencial (VPD). A PFR foi extraída a partir de alga *Nori* comercial, e sua caracterização foi realizada por FTIR, RMN-¹³C e pela determinação dos teores de carboidratos totais e de grupos SO₄²⁻, os quais resultaram em 82,8% e 11,9%, respectivamente. Tais experimentos confirmaram a pureza e a identidade química do polissacarídeo extraído, que foi empregado como agente redutor e estabilizante para a síntese de nanopartículas de ouro (AuNps-PFR). A temperatura, a concentração do precursor AuCl₄⁻ e a concentração de PFR empregadas para a síntese das AuNps-PFR foram otimizadas por meio de um planejamento fatorial 2³ com triplicata no ponto central. Um menor tamanho de partícula (128,7 nm) foi alcançado ao se empregar uma temperatura de 70 °C e concentrações de AuCl₄⁻ e PFR iguais a 2,5 mmol L⁻¹ e 0,25 mg mL⁻¹, respectivamente. As AuNps-PFR obtidas foram caracterizadas pelas espectroscopias UV-VIS, FTIR e DLS, MEV-FEG, potencial zeta e DRX. O espectro de UV-VIS mostrou uma banda em 524 nm (banda *plasmon*), que não apresentou variações significativas na forma e frequência de absorção durante 90 dias. Tais observações sugeriram que as AuNps-PFR são estáveis em suspensão, o que corrobora com o potencial zeta de -30,5 mV obtido para a mesma. O espectro de FTIR evidenciou a existência de interações entre as AuNps e a PFR, devido a deslocamentos das bandas apresentadas no espectro das AuNps-PFR em relação ao obtido para a PFR. A caracterização eletroquímica do EPCV/PFR, realizada por voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica em meio da sonda Fe(CN)₆^{3-/4-}, evidenciou que o polissacarídeo conferiu aos eletrodos maiores valores de corrente e menor resistência à transferência de carga para o processo redox da sonda eletroquímica em comparação aos eletrodos não modificados. Respostas de corrente ainda maiores foram obtidas ao se empregar o EPCV/AuNps-PFR, como uma consequência da elevada condutividade e alta área superficial apresentada pelas nanopartículas. Por VC, verificou-se que o 5-FU foi oxidado irreversivelmente na superfície do EPCV/AuNps-PFR segundo um mecanismo dependente do pH e controlado por difusão, apresentando um processo anódico em +1,1 V em tampão BR 0,04 mol L⁻¹. O pH do tampão BR para a determinação de 5-FU foi otimizado por VPD, tendo-se observado um máximo de corrente em pH 8,0, valor empregado para a obtenção das curvas analíticas. A relação linear observada entre o potencial de pico e o pH do meio com inclinação de -69,0 mV pH⁻¹ evidenciou que o mesmo número de prótons e elétrons estão envolvidos no processo de oxidação. O EPCV/AuNps-PFR apresentou linearidade de resposta na faixa de 29,9 a 234,0 μmol L⁻¹ de 5-FU, com limites de detecção e de quantificação iguais a 0,66 e 2,22 μmol L⁻¹, respectivamente. Além da boa sensibilidade ao 5-FU, o EPCV/AuNps-PFR apresentou reprodutibilidade de resposta, e não sofreu interferência significativa de compostos como glicose, ácido ascórbico, ureia, albumina e íons Na⁺ e K⁺, sugerindo sua potencial aplicação para a determinação de 5-FU em matrizes biológicas. O eletrodo modificado foi aplicado para a quantificação do 5-FU em formulação farmacêutica comercial injetável, tendo-se obtido uma porcentagem média de recuperação igual a 104,0, com desvio padrão relativo dentro dos limites aceitáveis (2,25%). Confirma-se, deste modo, o bom desempenho analítico do sensor e da metodologia voltamétrica desenvolvida para a eletroanálise do 5-FU em amostras reais.

Palavras-chave: eletrodo de pasta de carbono vítreo; nanopartículas de ouro; porfirana; voltametria; 5-fluorouracil.

ABSTRACT

In this work, glassy carbon paste electrodes (GCPE) were modified with porphyran-capped gold nanoparticles (GCPE/AuNps-PFR) and applied for the determination of an anticancer drug, 5-fluorouracil (5-FU), by using differential pulse voltammetry (DPV). The PFR polysaccharide was isolated from commercial *Nori* seaweed, and its characterization was carried out by FTIR and ^{13}C -NMR as well as by determining its total sugar and sulfate contents, which resulted in 82.8% and 11.9%, respectively. These experiments confirmed the chemical identity and purity of the extracted polysaccharide, which was used as reducing and capping agent to the synthesis of gold nanoparticles (AuNps-PFR). The temperature and the concentrations of AuCl_4^- and PFR for the AuNps-PFR synthesis were optimized by a 2^3 full factorial design including a central point assayed in triplicate. The smallest particles were produced with 128.7 nm by employing a temperature of 70 °C and concentrations of 2.5 mmol L $^{-1}$ for AuCl_4^- and 0.25 mg mL $^{-1}$ for PFR. The characterization of the AuNps-PFR nanocomposite was performed by UV-VIS, FTIR and DLS spectroscopies, FESEM, zeta potential and XRD. The UV-VIS spectrum showed an absorption at 524 nm (plasmon band), with no significant changes in its shape and absorption frequency for 90 days. This observation suggests that the AuNps-PFR are stable in suspension, which is in good agreement with the zeta potential of -30.5 mV obtained for the sample. The FTIR spectrum revealed that interactions between the AuNps and the PFR may exist, as a consequence of displacements in the frequency of the bands in the AuNps-PFR spectrum compared to that obtained for the PFR individually. The electrochemical characterization of the porphyran modified GCPE (GCPE/PFR) was carried out by cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy in the presence of the $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ probe, revealing that the polysaccharide had a positive effect on the electrode response, since higher current values and a lower charge transfer resistance for the electrochemical probe redox process were achieved compared to the unmodified GCPE. Even better responses were obtained after the modification of the GCPE with the synthesized AuNps-PFR, as a consequence of the high electrical conductivity and large surface area displayed by the nanocomposite. The 5-FU was oxidized on the GCPE/AuNps-PFR surface according to an irreversible, pH dependent and diffusion controlled mechanism, showing an anodic wave at +1,1 V in BR buffer solution 0.04 mol L $^{-1}$. The highest current value for 5-FU determination was achieved in BR buffer with pH 8.0, by DPV; therefore, this value was chosen for the further analysis. A linear relationship was observed between the anodic peak potential and the pH of the medium with a slope of -69 mV pH $^{-1}$, demonstrating that the same number of protons and electrons participate in the 5-FU oxidation mechanism. The GCPE/AuNps-PFR exhibited a linear relationship between the peak current and 5-FU concentration over the range of 29.9 to 234.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, with low detection (0.66 $\mu\text{mol L}^{-1}$) and quantification limits (2.22 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Besides the good sensitivity for detecting 5-FU, the modified electrode showed reproducibility, and its response was not influenced by interfering compounds such as glucose, urea, albumin, ascorbic acid, Na^+ and K^+ , suggesting its potential application to determine 5-FU in biologic matrices. The practical utility of the developed sensor was demonstrated for the quantification of 5-FU in pharmaceutical injection sample. A good average recovery percentage of 104.0% was achieved, with an acceptable relative standard deviation of 2.25%. So, these results could confirm the promising analytical performance of the modified electrode for the electroanalysis of 5-FU in real samples.

Keywords: glassy carbon paste electrode; gold nanoparticles; porphyran; voltammetry; 5-fluorouracil.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU	5-Fluorouracil
ΔE_p	Separação entre potenciais de pico
a_{pulso}	Amplitude do pulso de potencial
AuNps	Nanopartículas de ouro
AuNps-PFR	Nanopartículas de ouro estabilizadas em porfirana
BR	Tampão Britton-Robinson
CV	Carbono vítreo
DLS	Espalhamento dinâmico da luz
DPR	Desvio padrão relativo à média
DRX	Difração de raios X
ECV	Eletrodo(s) de carbono vítreo
EIE	Espectroscopia de impedância eletroquímica
E_{pa}	Potencial de pico anódico
E_{pc}	Potencial de pico catódico
EPC	Eletrodo(s) de pasta de carbono
EPCV	Eletrodo(s) de pasta de carbono vítreo
EPCV/PFR	Eletrodos(s) de pasta de carbono modificado com porfirana
EPCV/AuNps-PFR	Eletrodos(s) de pasta de carbono modificado com AuNps-PFR
EQM	Eletrodo(s) quimicamente modificado(s)
FTIR	Espectroscopia da região do infravermelho com transformada de Fourier
I_{pa}	Corrente de pico anódico
I_{pc}	Corrente de pico catódico
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MEV-FEG	Microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo
MNps	Nanopartículas metálicas
PBS	Tampão fosfato-salino
PLS	Polissacarídeos sulfatados
PFR	Porfirana(s)
QT	Quitosana
R_{ct}	Resistência à transferência de carga
RMN- ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de ¹³ C
RPS	Ressonância <i>plasmon</i> de superfície
t_{pulso}	Tempo do pulso de potencial
VC	Voltametria cíclica
VPD	Voltametria de pulso diferencial
UV-VIS	Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – (A) Estrutura proposta para o carbono vítreo por Jenkins e Kawamura (1971). (B) Micrografia (microscopia eletrônica de transmissão) obtida por Harris (2004) para uma variedade comercial de CV (Toyo Tanso®).....	23
Figura 2 – Exemplos de nanomateriais e comparação de tamanho com outras estruturas em escala micro e macroscópica.	25
Figura 3 – Algumas propriedades, formas e exemplos de nanopartículas metálicas.....	26
Figura 4 – Mecanismo provável para a síntese de MNps via procedimento <i>bottom up</i>	27
Figura 5 – Métodos convencionalmente empregados para estabilização de nanopartículas metálicas em suspensão: (A) estabilização eletrostática, (B) estabilização estérica e (C) estabilização eletrostérica.	29
Figura 10 – Estrutura química das porfiranas (PFR).....	34
Figura 6 – Representação esquemática do fenômeno de RPS em uma nanopartícula metálica, mostrando a oscilação dos elétrons da banda de condução com a radiação incidente.	36
Figura 7 – Micrografias obtidas por MEV/FEG para AuNps estabilizadas em citrato e dispersas em água (A-D), com diâmetros de (A) 13 (± 1) nm, (B) 33 (± 3) nm, (C) 49 (± 4) nm e (D) 72 (± 4) nm, e em tolueno (E-F), com diâmetros de (E) 13 (± 1) nm, (F) 32 (± 2) nm, (G) 46 (± 5) nm e (H) 72 (± 5) nm). As imagens inseridas mostram as cores das suspensões observadas para cada tamanho.....	37
Figura 8 – Diferentes formas e morfologias observadas para AuNps: (A) nanoesferas, (B) nanobastões, (C) nanoconchas (nanopartículas <i>core shell</i> SiO ₂ /Au), (D) <i>nanobowls</i> , (E) nanocubos, (F) nanoestrelas, (G) bipirâmides e (H) octaedros.....	38
Figura 9 – Algumas propriedades físicas e químicas de AuNps e exemplo de funcionamento de um sistema de detecção baseado neste nanomaterial.	38
Figura 11 – Obtenção da quitosana a partir da quitina.	40
Figura 12 – Estrutura química da goma guar.	42
Figura 13 – Estrutura química do agente quimioterápico 5-FU (A) e da base nitrogenada uracila (B).....	46
Figura 14 – Espectro vibracional na região do IV (FTIR) de amostra do polissacarídeo sulfatado PFR em pastilha de KBr.	61
Figura 15 – Estrutura geral da PFR e espectro de RMN- ¹³ C totalmente desacoplado de amostra da mesma dissolvida em D ₂ O.	63
Figura 16 – Dispersão de tamanho de partícula de uma suspensão aquosa da PFR extraída (1 mg mL ⁻¹), obtida por DLS.....	64
Figura 17 – Curvas analíticas obtidas na determinação da composição química da PFR extraída: (A) determinação de açúcar total e (B) determinação de grupos SO ₄ ²⁻	65
Figura 18 – Equação química simplificada do processo de oxidação do monossacarídeo β -D-galactopiranosose.	66

Figura 19 – (A) Solução aquosa a 5 mmol L ⁻¹ do complexo AuCl ₄ ⁻ , empregado como precursor metálico para síntese das AuNps-PFR. (B) Suspensão de AuNps-PFR, obtida empregando-se [AuCl ₄ ⁻] = 2,50 mmol L ⁻¹ ; [PFR] = 0,25 mg mL ⁻¹ e T = 70 °C.	67
Figura 20 – (A) Diagrama de Pareto para os efeitos padronizados e (B) interpretação geométrica dos efeitos obtidos para a otimização da síntese das AuNps-PFR via planejamento fatorial 2 ³ (o vértice do cubo correspondente às condições ótimas para a síntese é mostrado em destaque).	71
Figura 21 – Espectros de absorção na região do UV-VIS da suspensão de AuNps-PFR obtida nas condições otimizadas logo após o término da síntese. O gráfico inserido contém os espectros da suspensão de AuNps-PFR, e de soluções de HAuCl ₄ 0,625 mmol L ⁻¹ e PFR 0,25 mg mL ⁻¹	71
Figura 22 – Distribuição de tamanho de partículas obtida por DLS para a suspensão de AuNps-PFR sintetizada nas condições ótimas.	72
Figura 23 – (A) Espectros de absorção na região do UV-VIS da suspensão de AuNps-PFR 1%, sintetizada nas condições otimizadas, ao longo de 3 meses. (B) Correlação entre os máximos de absorbância e o número de dias.	73
Figura 24 – Micrografias obtidas por MEV-FEG das AuNps-PFR, sintetizadas nas condições ótimas, nas magnificações (A) 6000, (B) 8000, (C) 10000, (D) 12000, (E) 15000 e (F) 40000.	75
Figura 25 – Espectros vibracionais na região do infravermelho de (A) filmes <i>cast</i> de PFR (10 mg mL ⁻¹) e (B) das AuNps-PFR sobre substratos de silício (os gráficos inseridos mostram para cada caso uma ampliação da região destacada).	76
Figura 26 – Difratoograma de raios X das AuNps-PFR após liofilização, com atribuição dos picos observados.	78
Figura 27 – Micrografias obtidas por MEV-FEG, em magnificação de 4000 vezes, para: (A) CV em pó, (B) pasta de CV não modificada, (C) CV + PFR (proporção 1%), (D) pasta de carbono vítreo modificada com PFR (proporção 1%), (E) CV + AuNps-PFR (proporção 1%) e (F) pasta de carbono vítreo modificada com AuNps-PFR.	80
Figura 28 – Micrografias de amostra de carbono vítreo modificada com AuNps-PFR (proporção 1%), obtidas por MEV-FEG em magnificação de 18000 vezes.	81
Figura 29 – (A) Voltamogramas cíclicos e (B) espectros de impedância eletroquímica (diagramas de Nyquist) do EPC-grafite e do EPCV, ambos sem modificação, em meio de solução equimolar de K ₄ Fe(CN) ₆ /K ₃ Fe(CN) ₆ 0,010 mol L ⁻¹ preparada em tampão PBS 0,15 mol L ⁻¹ (pH 6,5).	82
Figura 30 – (A) Voltamogramas cíclicos e (B) espectros de impedância eletroquímica do EPCV/PFR 1% e do EPCV sem modificação, em meio de solução equimolar de K ₄ Fe(CN) ₆ /K ₃ Fe(CN) ₆ 0,010 mol L ⁻¹ preparada em tampão PBS 0,15 mol L ⁻¹ (pH 6,5).	84
Figura 31 – (A) Voltamogramas cíclicos e (B) espectros de impedância eletroquímica de EPCV's/PFR em diferentes proporções, em meio de solução equimolar de K ₄ Fe(CN) ₆ /K ₃ Fe(CN) ₆ 0,010 mol L ⁻¹ preparada em tampão PBS 0,15 mol L ⁻¹ (pH 6,5).	85
Figura 32 – Voltamogramas cíclicos (A) de um eletrodo de ouro sólido e (B) do EPCV/AuNps-PFR 1%, EPCV/PFR 1% e EPCV não modificado, em meio ácido (tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ pH 2,0).	87

Figura 33 – (A) Voltamogramas cíclicos e (B) espectros de impedância eletroquímica do EPCV/AuNps-PFR 1%, EPCV/PFR 1% e EPCV não modificado, em meio de solução equimolar de $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ 0,010 mol L ⁻¹ preparada em tampão PBS 0,15 mol L ⁻¹ (pH 6,5).	88
Figura 34 – Voltamogramas cíclicos do EPCV não modificado, EPCV/PFR 1% e EPCV/AuNps-PFR 1% em meio de solução de $K_3[Fe(CN)_6]$ 5 mmol L ⁻¹ preparada em KCl 0,1 mol L ⁻¹ ($v = 50$ mV s ⁻¹).	90
Figura 35 – Estabilidade de resposta do EPCV/AuNps-PFR 1%, do EPCV/PFR 1% e do EPCV não modificado analisada em termos da variação da (A) I_{pa} e do (B) E_{pa} em função do número de ciclos voltamétricos.	92
Figura 36 – Voltamogramas cíclicos do EPCV não modificado, do EPCV/PFR 1% e do EPCV/AuNps-PFR 1% na presença de $9,09 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ de 5-FU, em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ pH 8,0. As linhas pontilhadas representam os voltamogramas dos mesmos eletrodos na ausência dos analitos ($v = 50$ mV s ⁻¹).	93
Figura 37 – Provável mecanismo do processo de oxidação eletroquímica do 5-FU sobre os eletrodos estudados.	94
Figura 38 – Gráfico de E_{pa} contra $\ln v$ do EPCV/AuNps-PFR 1% na presença de $9,09 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ de 5-FU, com v variando de 50 a 100 mV s ⁻¹ .	96
Figura 39 – Voltamogramas cíclicos obtidos para $4,76 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ de 5-FU, em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ em pH 8,0, com v variando de 10 a 100 mV s ⁻¹ .	97
Figura 40 – Correlações de (A) I_{pa} vs. $v^{1/2}$ e (B) I_{pa} vs. v do EPCV/AuNps-PFR 1% na presença de $4,76 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ de 5-FU.	98
Figura 41 – Relação do duplo logaritmo ($\log I_{pa}$ vs. $\log v$) obtida para o 5-FU.	100
Figura 42 – Gráfico da relação $I_{pa} v^{-1/2}$ em função da velocidade de varredura de potencial.	101
Figura 43 – (A) Voltamogramas de pulso diferencial do EPCV/AuNps-PFR 1% na presença de $4,76 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ de 5-FU, em meio de tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ , com valores de pH variando na faixa de 2,0 a 10,0 (parâmetros utilizados: amplitude de pulso = 75 mV; tempo de pulso = 75 ms; $E_{step} = 10$ mV; $v = 50$ mV s ⁻¹). (B) Relações de E_{pa} e I_{pa} em função do pH obtidas a partir dos voltamogramas.	102
Figura 44 – Desprotonação do 5-FU.	102
Figura 45 – Voltamogramas de pulso diferencial do EPCV/AuNps-PFR 1% na presença de $4,76 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ de 5-FU, em diferentes tipos de solução tampão, em pH 8,0 (parâmetros utilizados: amplitude de pulso = 75 mV; tempo de pulso = 75 ms; $E_{step} = 10$ mV; $v = 50$ mV s ⁻¹).	104
Figura 46 – (A) Voltamogramas de pulso diferencial do EPCV/AuNps-PFR na presença de $4,76 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ de 5-FU em tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ pH 8,0, variando-se o t_{pulso} de 10 a 100 ms, com $v = 30$ mV s ⁻¹ e $a_{pulso} = 75$ mV. (B) Correlação obtida entre a I_{pa} e o t_{pulso} , com o tempo escolhido em destaque.	105
Figura 47 – (A) Voltamogramas de pulso diferencial do EPCV/AuNps-PFR na presença de $4,76 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ de 5-FU em tampão BR 0,04 mol L ⁻¹ pH 8,0, variando-se a v de 10 a 100 mV s ⁻¹ , com $t_{pulso} = 20$ ms e $a_{pulso} = 75$ mV. (B) Correlação obtida entre a I_{pa} e a v , com a velocidade escolhida em destaque.	106

- Figura 48 – (A) Voltamogramas de pulso diferencial do EPCV/AuNps-PFR na presença de $4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de 5-FU em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 8,0, variando-se a a_{pulso} de 10 a 150 mV, com $t_{\text{pulso}} = 20 \text{ ms}$ e $\nu = 40 \text{ mV s}^{-1}$. (B) Correlação obtida entre a I_{pa} e a a_{pulso} , com a amplitude escolhida em destaque. 107
- Figura 49 – (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com o EPCV/AuNps-PFR 1% na faixa de $2,99 \times 10^{-5}$ a $2,34 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de 5-FU, em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 8,0, com $t = 20 \text{ ms}$, $\nu = 40 \text{ mV s}^{-1}$; $a = 150 \text{ mV}$ e $E_{\text{step}} = 10 \text{ mV}$. (B) Curvas analíticas obtidas para o EPCV/AuNps-PFR 1%, EPCV/PFR 1% e EPCV não modificado (média de três determinações para cada eletrodo). 108
- Figura 50 – (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em estudo de recuperação em eletrólito puro (tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 8,0) para 5-FU, com as concentrações do analito variando de $2,99 \times 10^{-5}$ a $1,47 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ($t = 20 \text{ ms}$, $\nu = 40 \text{ mV s}^{-1}$; $a = 150 \text{ mV}$ e $E_{\text{step}} = 10 \text{ mV}$). (B) Curva de recuperação extrapolada. 113
- Figura 51 – (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em diferentes concentrações de 5-FU na presença de glicose ($850,0 \text{ mg L}^{-1}$), ácido ascórbico ($10,0 \text{ mg L}^{-1}$), ureia ($250,0 \text{ mg L}^{-1}$), Na^+ ($140,0 \text{ mmol L}^{-1}$), K^+ ($4,5 \text{ mmol L}^{-1}$) e albumina ($3,0 \text{ g L}^{-1}$). (B) Curvas analíticas obtidas para o 5-FU na ausência (valores de corrente calculados a partir da equação da reta para o EPCV/AuNps-PFR apresentada na Tabela 13) e na presença dos interferentes estudados. 115
- Figura 52 – (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em estudo de recuperação de 5-FU em amostra de formulação farmacêutica injetável (tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 8,0), com as concentrações do analito variando de $2,99 \times 10^{-5}$ a $1,47 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ($t = 20 \text{ ms}$, $\nu = 40 \text{ mV s}^{-1}$; $a = 150 \text{ mV}$ e $E_{\text{step}} = 10 \text{ mV}$). (B) Curva de recuperação extrapolada. 117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores dos níveis ¹ das variáveis empregados na otimização da síntese do nanocompósito AuNps-PFR via planejamento fatorial 2 ³	53
Tabela 2 – Parâmetros instrumentais da VPD com as respectivas faixas de variação analisadas e valores padrões empregados para estudo de otimização para a determinação de 5-FU.....	58
Tabela 3 – Principais bandas observadas no espectro de FTIR da PFR extraída, com as respectivas atribuições (ν : deformação axial; δ : deformação angular).....	61
Tabela 4 – Deslocamentos químicos (δ) observados no espectro de RMN- ¹³ C para amostra de PFR extraída, com suas respectivas atribuições.....	63
Tabela 5 – Coeficientes de contraste para o planejamento fatorial 2 ³ empregado para a otimização das condições de síntese das AuNps-PFR e respostas obtidas.....	69
Tabela 6 – Efeitos principais e de interação calculados a partir dos resultados do planejamento fatorial 2 ³ empregado para otimizar as condições de síntese das AuNps-PFR.....	70
Tabela 7 – Principais bandas observadas no espectro de FTIR para filmes <i>cast</i> de PFR (10 mg mL ⁻¹) e de AuNps-PFR, com as respectivas atribuições.....	77
Tabela 8 – Valores de I_{pa} , I_{pc} , ΔE_p e R_{ct} obtidos em estudo comparativo para o EPC-grafite e para o EPCV.....	83
Tabela 9 – Parâmetros voltamétricos e valores de R_{ct} observados para o EPCV não modificado e para o EPCV/PFR 1%.....	84
Tabela 10 – Valores de I_{pa} , I_{pc} e R_{ct} obtidos por VC e EIE para o estudo de proporção do EPCV/PFR.....	86
Tabela 11 – Valores de I_{pa} , I_{pc} , ΔE_p e R_{ct} obtidos para o EPCV, para o EPCV/PFR 1% e para o EPCV/AuNps-PFR 1%.....	89
Tabela 12 – Valores médios da área eletroativa estimados do EPCV não modificado, EPCV/PFR 1% e EPCV/AuNps-PFR 1% (n = 3 para cada um dos eletrodos).....	90
Tabela 13 – Porcentagens de variação nos valores de I_{pa} e de E_{pa} calculadas para o EPCV não modificado, EPCV/PFR 1% e EPCV/AuNps-PFR 1% após varredura de 100 ciclos voltamétricos sucessivos na presença da sonda eletroquímica [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-}	92
Tabela 14 – Parâmetros instrumentais da VPD otimizados para a determinação de 5-FU com o EPCV/AuNps-PFR.....	107
Tabela 15 – Parâmetros analíticos obtidos a partir da regressão linear das curvas para a determinação de 5-FU com o EPCV não modificado, EPCV/PFR 1% e EPCV/AuNps-PFR 1%.....	109
Tabela 16 – Valores de LD e LQ obtidos para a determinação de 5-FU com o EPCV não modificado, EPCV/PFR 1% e EPCV/AuNps-PFR 1%.....	110
Tabela 17 – Valores de LD e de LQ obtidos para a determinação de 5-FU por diferentes trabalhos reportados na literatura.....	111

Tabela 18 – Resultados para repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade de preparação do eletrodo para a determinação de 5-FU com o EPCV/AuNps-PFR 1%.....	112
Tabela 19 – Resultados para estudo de recuperação em eletrólito puro 5-FU empregando-se o EPCV/AuNps-PFR 1%.	114
Tabela 20 – Influência de potenciais interferentes biológicos na resposta do EPCV/AuNps-PFR 1% para $8,26 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de 5-FU.....	116
Tabela 21 – Resultados obtidos por VPD para o estudo de recuperação em amostra de formulação farmacêutica injetável empregando-se o EPCV/AuNps-PFR 1%.....	117

SUMÁRIO

1 DELIMITAÇÃO DO PROBLEMA E JUSTIFICATIVA	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 ELETRODOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS	18
2.2 ELETRODOS DE PASTA DE CARBONO	19
2.3 NANOMATERIAIS E NANOPARTÍCULAS METÁLICAS.....	23
2.4 SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS.....	29
2.5 POLISSACARÍDEOS SULFATADOS E PORFIRANAS	32
2.6 NANOPARTÍCULAS DE OURO: PROPRIEDADES E APLICAÇÕES.....	35
2.7 ELETRODOS MODIFICADOS COM NANOPARTÍCULAS E POLISSACARÍDEOS.	39
2.8 CÂNCER E AGENTES QUIMIOTERÁPICOS: 5-FLUOROURACIL (5-FU) .	44
3 OBJETIVOS	49
3.1 OBJETIVO GERAL	49
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
4 MATERIAIS E MÉTODOS	50
4.1 REAGENTES E SOLUÇÕES	50
4.2 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO POLISSACARÍDEO SULFATADO PFR... ..	50
4.2.1 Extração.....	50
4.2.2 Caraterização física e química	51
4.3 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO ESTABILIZADAS NA PFR (AuNps-PFR)	53
4.4 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS ELETRODOS NÃO MODIFICADOS (EPCV) E MODIFICADOS (EPCV/PFR OU EPCV/AuNps- PFR).....	54
4.5 DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE 5-FLUOROURACIL	56
4.5.1 Otimização dos parâmetros da voltametria de pulso diferencial (VPD).....	57
4.5.2 Obtenção de curvas analíticas e estudo de interferentes biológicos	58
4.5.3 Determinação de 5-FU em formulação farmacêutica comercial.....	59
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.1 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO POLISSACARÍDEO SULFATADO PFR... ..	60
5.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS AuNps-PFR.....	66
5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS EPCV MODIFICADOS	79
5.3.1 Caracterização morfológica	79

5.3.2 Caracterização eletroquímica	82
5.4 DETERMINAÇÃO DO AGENTE ANTITUMORAL 5-FLUOROURACIL (5-FU).....	93
5.4.1 Comportamento voltamétrico.....	93
5.4.2 Influência da velocidade de varredura de potencial (v).....	96
5.4.3 Influência do pH na resposta voltamétrica para o 5-FU	101
5.4.4 Influência do eletrólito de suporte.....	103
5.4.5 Otimização dos parâmetros instrumentais da VPD.....	105
5.4.6 Obtenção de curvas analíticas	107
5.4.7 Ensaios de recuperação	113
5.4.8 Estudo de interferentes	114
5.4.9 Ensaios de recuperação em formulação farmacêutica comercial.....	116
6 CONCLUSÕES.....	119
7 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	121
REFERÊNCIAS	122

1 DELIMITAÇÃO DO PROBLEMA E JUSTIFICATIVA

O agente antitumoral 5-fluorouracil (5-FU) é um dos fármacos mais empregados para o tratamento quimioterápico de uma variedade de tumores, principalmente os colorretais e de mama. Entretanto, a possibilidade da ocorrência de efeitos colaterais severos, como resultado da não especificidade tipicamente apresentada pelos agentes quimioterápicos, faz com que o desenvolvimento de metodologias analíticas para sua determinação em amostras de medicamentos e de fluidos biológicos consista em um tópico de considerável relevância para a medicina oncológica.

Neste cenário, técnicas eletroanalíticas surgem como alternativas aos métodos espectroscópicos e cromatográficos comumente aplicados para a determinação de 5-FU, pois possibilitam análises mais rápidas, com boa sensibilidade e seletividade, além de possuírem um custo consideravelmente menor e permitirem a miniaturização do sistema de detecção. A utilização dos chamados eletrodos quimicamente modificados (EQM) torna os métodos eletroanalíticos ainda mais atrativos, pois a modificação química dos eletrodos pode aumentar sua seletividade, sensibilidade e estabilidade.

Os eletrodos de pasta de carbono (EPC) estão entre os mais empregados para o desenvolvimento de EQM, pois possuem vantagens como estabilidade em uma ampla faixa de potenciais, baixa corrente de fundo e também um baixo custo, e podem ser fabricados com uma variedade de materiais. Sua modificação com compostos inorgânicos, orgânicos e biomoléculas vem sendo extensivamente estudada, como uma estratégia para aprimorar o seu desempenho eletroquímico. De maneira especial, EPC modificados com nanopartículas metálicas podem constituir dispositivos analíticos sensíveis, estáveis e seletivos, pois combinam propriedades atrativas apresentadas por tais nanomateriais, como elevada condutividade elétrica e alta área superficial, com as características positivas apresentadas pela pasta de carbono. Assim, tais eletrodos são ferramentas em potencial a serem aplicadas na determinação de 5-FU em procedimentos clínicos, assim como para o controle de qualidade de medicamentos.

Neste sentido, este trabalho propõe o desenvolvimento de eletrodos de pasta de carbono vítreo (EPCV) modificados com nanopartículas de ouro estabilizadas no polissacarídeo sulfatado porfirana (PFR), o qual é encontrado na parede celular de algas vermelhas. Tais eletrodos foram caracterizados eletroquimicamente, e sua potencialidade para detecção de 5-FU em amostras reais foi investigada.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ELETRODOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS

O estudo da modificação química da superfície de eletrodos dos mais diferentes gêneros, assim como as potenciais aplicações destes novos dispositivos, tem sido uma das mais atrativas áreas de pesquisa científica em Química nas últimas décadas. O desenvolvimento de estratégias para a modificação de eletrodos surgiu como uma poderosa ferramenta para melhorar o seu desempenho, uma vez que o funcionamento satisfatório e aplicação de um eletrodo eram muitas vezes comprometidos por fatores como o potencial aplicado, o meio em que o eletrodo seria empregado e o tipo de material a partir do qual o eletrodo era confeccionado. (ALKIRE et al., 2010).

O desenvolvimento de eletrodos quimicamente modificados é particularmente importante para pesquisa em Química Eletroanalítica, uma vez que a modificação confere aos mesmos um aumento em sua sensibilidade, além de melhorar suas propriedades eletrocatalíticas e aumentar sua seletividade, o que possibilita a sua aplicação em amostras complexas, como fluidos biológicos ou amostras ambientais. (ALKIRE et al., 2010)

O termo eletrodo quimicamente modificado (EQM) foi introduzido em 1975 por Murray e colaboradores para definir eletrodos que possuem espécies quimicamente ativas convenientemente imobilizadas sobre suas superfícies, numa tentativa de controlar a natureza físico-química da interface eletrodo-solução, resultando em uma alteração na sensibilidade e seletividade do sensor base frente às espécies de interesse. (PEREIRA; SANTOS; KUBOTA, 2002; SOUZA, 1997).

Um EQM é constituído por duas partes: o eletrodo base e o modificador químico, responsável por melhorar o desempenho do eletrodo. A forma de preparação de um EQM é escolhida levando-se em conta as características analíticas desejadas no sensor. (PEREIRA; SANTOS; KUBOTA, 2002; KALCHER, 1990). De maneira geral, os métodos mais importantes para a modificação consistem em adsorção, ligação covalente a sítios específicos da superfície do eletrodo, recobrimento com filmes poliméricos e utilização de materiais compósitos. É importante ressaltar que os modificadores a serem imobilizados ou incorporados ao eletrodo base devem manter suas propriedades físicas, químicas e/ou biológicas mesmo após o processo de imobilização. (RADI, 2010).

A fim de que os propósitos de aumento de seletividade e sensibilidade sejam alcançados, além da escolha adequada do material modificador, é importante que se selecione corretamente o material do qual é constituído o eletrodo base. Este deve apresentar características eletroquímicas apropriadas e também ser adequado para o método de imobilização selecionado. A grande variedade de materiais disponíveis, aliada à possibilidade de combinação entre os mesmos, proporciona a esses dispositivos um grande campo de aplicação. (PEREIRA; SANTOS; KUBOTA, 2002). Entre os materiais mais empregados para a modificação estão os de carbono, como carbono vítreo, grafite, diamante (dopado com boro) e nanotubos (SERPI; KOVATSI; GIROUSI, 2014; SIARA et al., 2015; TAEI; RAMAZANI, 2015; TYSZCZUK-ROTKO et al., 2014) e os metálicos, como ouro e platina (OLIVEIRA, F. C.; SERRANO, 2014; POGACEAN et al., 2014).

No que diz respeito aos materiais modificadores, pode-se afirmar que uma imensa variedade de compostos foi e continua a ser empregada na tentativa de desenvolver novos dispositivos, com potencial cada vez maior de aplicação em procedimentos industriais, clínicos e ambientais na investigação de espécies químicas e biológicas de interesse. Neste sentido, é constante o emprego de compostos orgânicos, como polímeros condutores, calixarenos, alcanotióis, entre outros (LI, B. et al., 2015; ROUIS et al., 2013; SHERVEDANI et al., 2014; WANG, H. et al., 2012); inorgânicos, como complexos, ftalocianinas, porfirinas, óxidos metálicos, entre outros (CASELLA; CONTURSI, 2015; SANTOS et al., 2014; SANDRINO et al., 2013); e biológicos, como enzimas, anticorpos, proteínas, polissacarídeos e ácidos nucleicos (JESUS et al., 2013; MENG et al., 2012; SATYANARAYANA; REDDY; GOBI, 2014; SILVA et al., 2015). Com o advento da nanotecnologia, é ainda cada vez mais comum a modificação de eletrodos com materiais nanoestruturados, podendo-se citar as nanopartículas metálicas e de óxidos metálicos (CHEN, J. et al., 2015; IBRAHIM et al., 2015), nanotubos de carbono (FAGAN-MURPHY; ALLEN; PATEL, 2015) *quantum dots* (WANG, G. et al., 2015) e dendrímeros (ERDEM; CONGUR; MESE, 2014).

2.2 ELETRODOS DE PASTA DE CARBONO

Os eletrodos de pasta de carbono (EPC) são um tipo especial de eletrodos de carbono desenvolvidos por Adams nos anos 1950. (KALCHER, 1990). A chamada pasta de carbono, que consiste em uma mistura preparada à base de um material de carbono em pó com um líquido orgânico, tornou-se, com o passar dos anos, um dos mais populares materiais utilizados para a preparação laboratorial de eletrodos e sensores. (ŠVANCARA et al., 2009). Este fato pode ser tomado como uma consequência das vantagens que os EPC oferecem à Eletroanálise, tais como fácil preparação, baixo custo, superfície renovável, baixa corrente de fundo, possibilidade de utilização em uma ampla faixa de potenciais e também possibilidade de miniaturização. (AFKHAMY et al., 2012; KALCHER, 1990).

Para que o desempenho eletroquímico de um EPC seja satisfatório, é conveniente que o material de carbono empregado para a fabricação da pasta possua alta pureza química e seja homogêneo no que diz respeito ao tamanho das partículas, as quais devem ter dimensão micrométrica. (ŠVANCARA et al., 2009). Embora o material mais empregado seja o grafite em pó, existe uma crescente utilização de outros materiais carbonáceos para a confecção da pasta. Tais materiais incluem carvão ativado (GHOLIVAND; MOHAMMADI-BEHZAD, 2013), negro de fumo (DENG; XU; FENG, 2014), pó de diamante (STEFAN; BAIRU, 2004), grafeno (SREEDHAR; KUMAR; KRISHNAVENI, 2015) nanotubos (IZADKHAH; FARMANY; MORTAZAVI, 2015), carbono vítreo (IBRAHIM; TEMERK, 2015), entre outros.

O líquido orgânico atua na pasta como um aglutinante, unindo mecanicamente as partículas do material de carbono, de modo a fixar a mistura resultante ao corpo do eletrodo. Ele deve ainda apresentar características como imiscibilidade com a água, não possuir caráter eletrolítico, ser inerte e ter uma pureza elevada. (AFKHAMY et al., 2012; PEREIRA; SANTOS; KUBOTA, 2002; USLU; OZKAN, 2007). É importante mencionar que a quantidade de líquido orgânico empregada na obtenção da pasta tem um grande impacto sobre a resposta eletroquímica dos eletrodos, pois uma elevada quantidade faz com que a velocidade de transferência de elétrons seja reduzida, provocando uma diminuição nos valores de corrente resultante. Portanto, este parâmetro deve ser rigorosamente controlado. (KALCHER, 1990; USLU; OZKAN, 2007). Os líquidos orgânicos mais utilizados para a confecção de EPC são os óleos minerais (Nujol[®] e Uvasol[®]), porém outros tipos, como parafina e graxa de silicone, também podem ser empregados. (ŠVANCARA et al., 2009).

Recentemente, a utilização de líquidos iônicos como aglutinantes em EPC tem sido reportada em uma crescente quantidade de trabalhos (AFKHAMI et al., 2014; GAN et al., 2014; OPALLO; LESNIEWSKI, 2011). Tais compostos são fluidos inteiramente compostos por íons e que são líquidos à temperatura ambiente. Sua utilização na preparação de EPC é uma consequência de sua estabilidade química e eletroquímica, boa condutividade iônica, baixa volatilidade e viscosidade adequada para unir mecanicamente as partículas do material de carbono empregado. Neste sentido, EPC preparados com líquidos iônicos podem apresentar uma maior sensibilidade, e, portanto, um melhor desempenho eletroanalítico do que os seus análogos preparados com líquidos orgânicos como agentes aglutinantes. (OPALLO; LESNIEWSKI, 2011; SHE et al., 2010)

A preparação dos EPC é bastante simples, sendo esta uma das principais vantagens de sua utilização. Primeiramente, é realizada a mistura física do material de carbono em pó juntamente com a quantidade adequada de aglutinante e, após a sua completa homogeneização, a pasta resultante é inserida e compactada no corpo do eletrodo. Este geralmente consiste em um tubo confeccionado de material apropriado (como vidro, plástico ou Teflon[®]), e que possui contato elétrico.

Além das propriedades já citadas, os EPC são extensivamente empregados para a obtenção de EQM, uma vez que a pasta constitui uma matriz adequada para a incorporação de diferentes tipos de modificadores. (USLU; OZKAN, 2007). A diversidade de formas de modificação e a ampla gama de modificadores disponíveis podem ser consideradas como algumas das principais vantagens do emprego da pasta para a fabricação de eletrodos. (ŠVANCARA et al., 2009).

A modificação dos EPC permite a fabricação de eletrodos mais sensíveis e seletivos ao analito em estudo, já que os modificadores podem facilitar os processos de transferência de elétrons que ocorrem na interface eletrodo/solução (JOSEPH; KUMAR, 2009) e também estabelecer interações com moléculas específicas. Outro fato importante acerca da modificação dos EPC é que estes eletrodos possibilitam a modificação interna do material eletródico, ao contrário do que ocorre com eletrodos sólidos convencionais, em que a modificação ocorre apenas na superfície. Isto permite a co-imobilização de diferentes tipos de modificadores, resultando em uma configuração de eletrodo onde não existe a necessidade de adição de reagentes durante a determinação. (PEREIRA; SANTOS; KUBOTA, 2002.).

A modificação química da pasta pode dar-se por uma variedade de metodologias, sendo que podem ser consideradas como as principais: (i) a incorporação mecânica do

modificador no momento da preparação da pasta, sendo bastante útil no caso de modificadores sólidos; (ii) a dissolução do modificador no líquido aglutinante, o que é aplicado muitas vezes no caso de compostos lipofílicos; e (iii) a impregnação do material de carbono, onde este é primeiramente disperso em uma solução do modificador, e, após, a evaporação do solvente, o material resultante é misturado com o aglutinante escolhido. (ŠVANCARA et al., 2009).

As principais classes de compostos empregados na modificação de EPC podem ser verificadas em um considerável número de trabalhos de revisão (BELLIDO-MILLA et al., 2013; RADI, 2006; STOZHKO et al., 2008; ŠVANCARA et al., 2009; ŠVANCARA et al., 2009; ZIMA et al., 2009), podendo-se citar principalmente as nanopartículas e óxidos metálicos (GHOLIVAND; TORKASHVAND; YAVARI, 2015; JEREZ et al., 2014; IBRAHIM; TEMERK, 2015), complexos inorgânicos (BENVIDI et al., 2013; MUENA; VILLAGRÁN; AGUIRRE, 2013; OLIVEIRA, K. M. et al., 2013), polímeros condutores (XU, G. et al., 2015) e biomoléculas como enzimas (MATERON et al., 2014) e polissacarídeos. (CAVALCANTI et al., 2014; XU, J. et al., 2014).

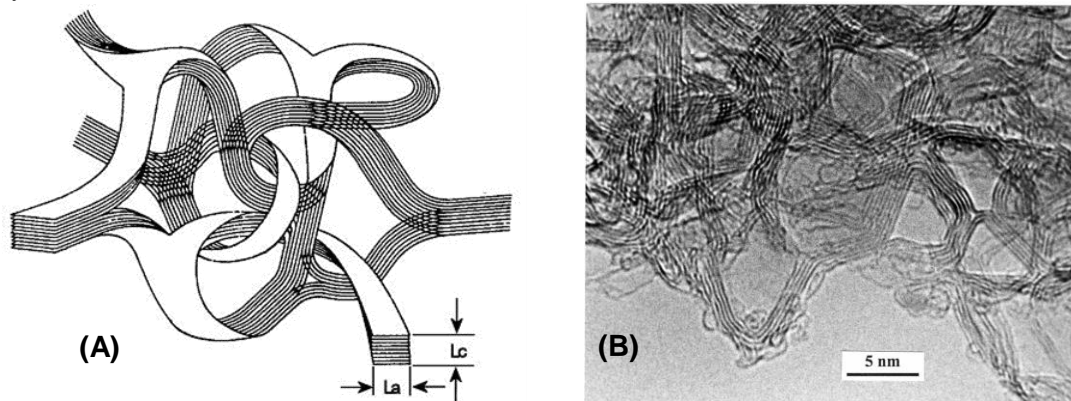
O carbono vítreo (CV) em pó está entre os materiais de carbono que podem ser empregados para a construção de EPC. Trata-se de um tipo de material carbonáceo dito como não-grafitizável (o que significa que o mesmo não pode ser transformado em grafite cristalino mesmo a temperaturas superiores a 3000 °C), preparado por meio da pirólise lenta de materiais poliméricos, incluindo cloreto de polivinila, cloreto de polivinilideno, celulose, resina fenólica e poliácridonitrila. (HARRIS, 1997; POCARD et al., 1992).

As principais características que fazem do CV em pó um material com boa potencialidade de aplicação na preparação de EPC são sua boa estabilidade eletroquímica (o fato do CV possuir uma baixa velocidade de oxidação permite que os eletrodos confeccionados possam ser utilizados em uma ampla faixa de potenciais), sua biocompatibilidade (CHEN; SWAIN, 1998; DEKANSKI et al., 2001; HARRIS, 2004; ZHAO et al., 2008) (o que possibilita a aplicação dos eletrodos em sistemas biológicos e a sua modificação com biomoléculas) e sua elevada condutividade elétrica.

A estrutura do CV tem sido objeto de investigação científica desde que o mesmo foi pela primeira vez produzido, no início da década de 60. (HARRIS, 2004). Entre as estruturas propostas e mais bem aceitas encontra-se a descrita por Jenkins e Kawamura (1971 apud HARRIS, 2004), representada na Figura 1A. Segundo estes autores, o CV é formado por um emaranhado de estreitas fibrilas (fitas) de carbono grafítico, que se curvam e torcem, resultando em uma estrutura randomicamente orientada. (POCARD et

al., 1992). Na micrografia apresentada na Figura 1B e obtida por Harris (2004), é possível observar claramente a estrutura desordenada do CV, assim como as fibrilas contendo diversos planos de carbono grafítico.

Figura 1 – (A) Estrutura proposta para o carbono vítreo por Jenkins e Kawamura (1971). (B) Micrografia (microscopia eletrônica de transmissão) obtida por Harris (2004) para uma variedade comercial de CV (Toyo Tanso®).



Fontes: (A) GLASSY CARBON, 2015. (B) HARRIS, 2004.

Nota: L_a e L_c são as dimensões das fibrilas grafíticas.

2.3 NANOMATERIAIS E NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

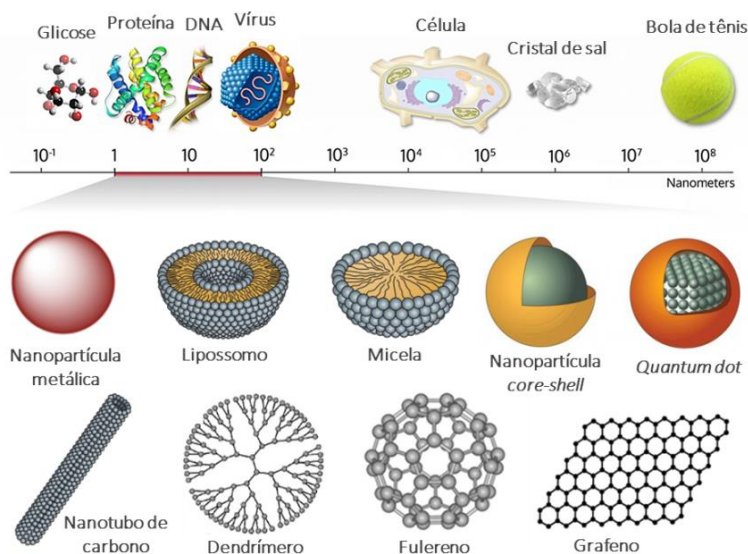
O desenvolvimento, estudo e aplicação de materiais constituídos por partículas cujo tamanho encontra-se em dimensão nanométrica ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$, um bilionésimo de um metro) ganhou importância significativa no final do século XX, levando ao surgimento e consolidação de uma nova área do conhecimento, denominada Nanotecnologia. (ZARBIN, 2007). Este ramo inovador e revolucionário da ciência tem como principais objetivos planejar, sintetizar e aplicar os referidos materiais, que devem possuir pelo menos uma de suas dimensões no que se convencionou chamar de nanoescala. (BUZEA; PACHECO; ROBBIE, 2007). Tais nanoestruturas, convencionalmente denominadas como nanomateriais, podem consistir em soluções para desafios tecnológicos e ambientais, em áreas como geração de energia, catálise e medicina. (SHARMA; YNGARD; LIN, 2009), como uma consequência de novas e revolucionárias propriedades químicas, físicas, mecânicas e ópticas que emergem quando a matéria está nanometricamente estruturada. (BUZEA; PACHECO; ROBBIE, 2007).

Os nanomateriais apresentam propriedades distintas comparando-se às observadas quando o mesmo encontra-se em escala macroscópica (ou *bulk*). Este fenômeno é uma clara evidência de que as propriedades dos materiais são dependentes, entre outros fatores, das dimensões do mesmo. (FILIPPONI; SUTHERLAND, 2012). Em outras palavras, é possível dizer que todas as propriedades, de qualquer material, manifestam-se a partir de um determinado tamanho – o chamado tamanho crítico. Quando as partículas de um material estão abaixo do referido tamanho crítico, as propriedades tornam-se diferenciadas. Além disso, quando abaixo do tamanho crítico, as propriedades do material dependem também da forma das partículas que o constituem. (ZARBIN, 2007).

Os nanomateriais podem ser definidos, neste sentido, como materiais que possuem ao menos uma dimensão em escala nanométrica, abaixo do tamanho crítico capaz de alterar alguma de suas propriedades. Deste modo, os limites de tamanho convencionalmente tidos como característicos para os nanomateriais (1 a 100 nm) (ADAMS; BARBANTE, 2013; FILIPPONI; SUTHERLAND, 2012; SHARMA; YNGARD; LIN, 2009; KHARISSOVA et al., 2013), nem sempre podem ser considerados como corretos. Isto porque não basta a um material ter apenas dimensões nanométricas para que seja considerado um nanomaterial, já que, para isso, deve possuir um tamanho que seja inferior ao tamanho crítico. (ZARBIN, 2007).

Uma ampla variedade de nanomateriais continua a ser desenvolvida por pesquisadores de diferentes áreas do conhecimento. De modo especial, podem ser citados aqueles constituídos a partir de metais (nanopartículas metálicas e de óxidos metálicos, *quantum dots*), de alótropos de carbono (nanotubos de carbono, fulerenos e grafeno) e de biomoléculas e estruturas orgânicas (dendrímeros, micelas, lipossomos). Na Figura 2 estão representados os nanomateriais citados, assim como uma comparação simplificada dos mesmos com estruturas e objetos de dimensões micro e macroscópicas.

Figura 2 – Exemplos de nanomateriais e comparação de tamanho com outras estruturas em escala micro e macroscópica.

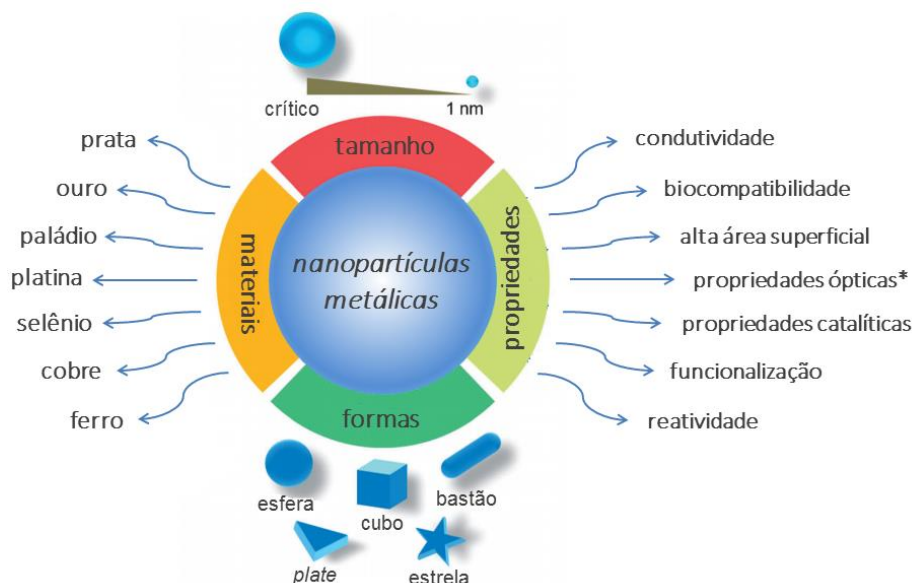


Fonte: Adaptado de: MULTIFUNCTIONAL BIOPOLYMERS, 2016.

Em relação às aplicações, podem ser destacadas aquelas em medicina e ciências biomédicas (SMITH; SIMON; BAKER JR., 2013; SASIDHARAN; MONTEIRO-RIVIERE, 2015; SUN, T. et al., 2014;), biotecnologia (BEYTH et al., 2015; PERREAULT et al., 2015), cosmetologia (KATZ; DEWAN; BRONAUGH, 2015), ciências ambientais (PATIL et al., 2016; PERREAULT; FARIA; ELIMELECH, 2015; XIA et al., 2014), geração e armazenamento de energia (HUSSEIN, 2015; QIU et al., 2015), eletrônica (YAO; ZHU, 2015) e desenvolvimento de sensores e biossensores (KUMAR et al., 2015; SANGHAVI et al., 2015; YANG, C. et al., 2015).

As nanopartículas metálicas (MNps) consistem nos tipos de nanomateriais mais estudados pelas mais diferentes áreas. Suas propriedades altamente atrativas e muitas vezes únicas diferem significativamente das apresentadas pelos materiais metálicos quando estes estão em escala *bulk*, o que confere às mesmas uma grande versatilidade e possibilita um substancial número de diferentes aplicações que podem trazer impactos positivos à sociedade. Entre tais propriedades, podem ser citadas sua biocompatibilidade, sua elevada área superficial (que pode ainda ser facilmente funcionalizada), sua pronunciada condutividade elétrica e suas interessantes propriedades ópticas (principalmente para MNps à base de ouro, prata e cobre) (Figura 3). Devido a estas características, um crescimento quase exponencial de publicações e patentes que relatam o desenvolvimento e novas aplicações de MNps têm sido observado. (ALEXANDRIDIS, 2011; KLEIJN et al., 2014; MODY et al., 2010).

Figura 3 – Algumas propriedades, formas e exemplos de nanopartículas metálicas.



Fonte: Adaptado de SUN, T. et al., 2014.

*Principalmente para nanopartículas de Ag, Au e Cu.

As propriedades diferenciadas apresentadas pelas MNps surgem como uma consequência, principalmente, de efeitos de superfície e efeitos quânticos que estão presentes quando os materiais são constituídos por partículas nanométricas. Os efeitos de superfície relacionam-se ao fato de que a fração de átomos na superfície de uma nanopartícula metálica é maior comparada ao que se observa para o material quando este está nas dimensões *bulk*, o que faz com que sua área superficial seja drasticamente maior. Esta particularidade faz com que propriedades dependentes de fenômenos de superfície, como reatividade química e atividade catalítica, sejam incrementadas. A maior reatividade observada é uma consequência do fato de que os átomos situados na superfície do nanomaterial possuem menos vizinhos que os átomos da superfície do material *bulk*. Logo, tais átomos possuem uma maior energia, possuindo uma maior tendência a formar ligações. (BUZEA; PACHECO; ROBBIE, 2007; CASTRO, 2009; FILIPPONI; SUTHERLAND, 2012).

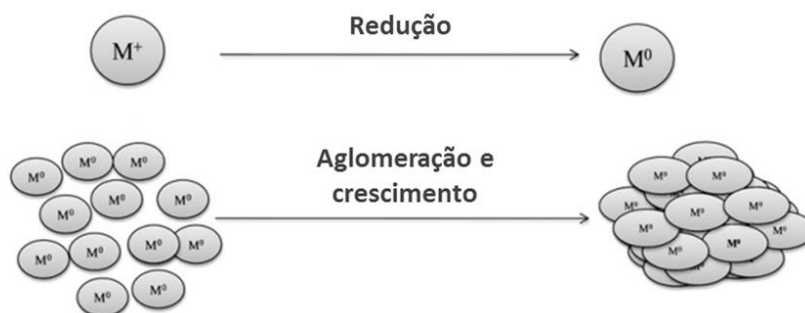
Os efeitos quânticos são aqueles relacionados ao fato de que os portadores de carga, nos nanomateriais, ficam confinados nas dimensões reduzidas das nanopartículas (o que é comumente chamado de confinamento quântico). (FILIPPONI; SUTHERLAND, 2012; ZARBIN, 2007). Os nanomateriais que exibem este comportamento são conhecidos como *quantum dots*. Possuindo tamanho de apenas alguns nanômetros, estas nanoestruturas comportam-se como átomos individuais, obedecendo às leis da mecânica quântica. Outros resultados do efeito de confinamento quântico são o aparecimento de

momento magnético em nanopartículas de materiais que não são magnéticos na dimensão *bulk* (como ocorre com o ouro, a platina e o paládio) e alterações na tendência do material de aceitar ou doar elétrons. (BUZEA; PACHECO; ROBBIE, 2007), o que afeta diretamente a sua reatividade.

Entre os métodos empregados para a síntese de MNps, duas principais estratégias podem ser citadas: os procedimentos denominados “*top down*” e aqueles conhecidos como “*bottom up*”. Em uma síntese do tipo *top down*, as MNps são produzidas por meio da redução de tamanho de um material de partida, geralmente na escala *bulk*. Isto pode ser alcançado principalmente utilizando-se processos físicos (como desintegração térmica e mecânica). (ZAHMAKIAN; ÖZKAR, 2011; MITTAL; CHISTI; BANERJEE, 2013). Este procedimento pode induzir imperfeições na superfície das MNps sintetizadas, o que é considerado como uma limitação, pois as propriedades físicas e químicas destes nanomateriais são diretamente dependentes de sua estrutura superficial. (MITTAL; CHISTI; BANERJEE, 2013).

Em contrapartida, a estratégia *bottom up* (Figura 4) é geralmente preferida e mais utilizada para a síntese de MNps. Neste caso, primeiramente são gerados átomos (valência zero) por meio da redução ou decomposição química de um precursor metálico (sal ou complexo). Em seguida, os átomos gerados se aglomeram e geram *clusters*, que crescem e dão origem às MNps. (MITTAL; CHISTI; BANERJEE, 2013; ZAHMAKIAN; ÖZKAR, 2011). O processo de redução do precursor é realizado com a utilização de agentes redutores tais como sais e compostos inorgânicos (como citrato de sódio, borohidreto de sódio, hidrazina e gás hidrogênio), compostos orgânicos (como ácido fórmico, ácido ascórbico e compostos fenólicos) e biomoléculas (como mono e polissacarídeos), entre outros. (DUAN; WANG; LI, 2015; RAUWEL et al., 2015; TAURAN et al., 2013; ZAHMAKIAN; ÖZKAR, 2011).

Figura 4 – Mecanismo provável para a síntese de MNps via procedimento *bottom up*.



Fonte: Adaptado de: MITTAL; CHISTI; BANERJEE, 2013.

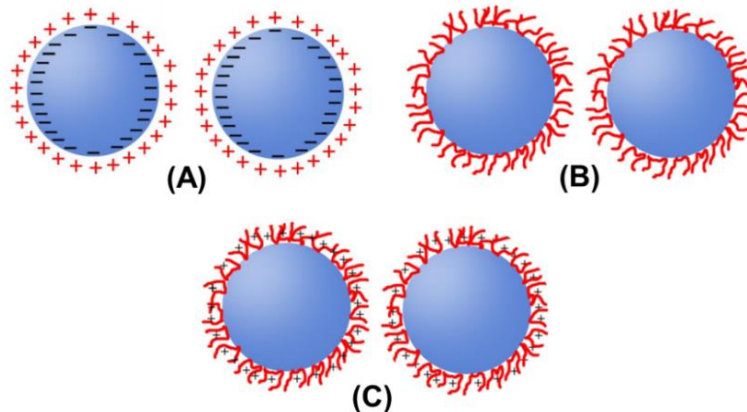
O fato das nanopartículas possuírem uma alta área superficial, e, por consequência, uma alta energia associada à superfície, faz com que as mesmas sejam termodinamicamente instáveis. Assim, tais nanoestruturas possuem uma tendência natural de diminuir este estado energético, sendo que isto é alcançado principalmente por meio de sua coagulação e aglomeração, resultando em partículas maiores e mais estáveis. (KRAYNOV; MÜLLER, 2011; VOLLMER; JANIÁK, 2011). Do ponto de vista da nanotecnologia, a aglomeração não é desejável, pois pode culminar na perda das novas propriedades manifestadas pelos materiais quando estes encontram-se em escala nanométrica. Assim, estratégias para que nanopartículas em suspensão sejam estabilizadas precisam ser aplicadas, a fim de se superar as forças atrativas e deste modo, conservar as propriedades.

A estabilização de nanopartículas é tradicionalmente realizada de três modos principais, os quais estão representados na Figura 5:

- *Estabilização eletrostática.* Esta estratégia para estabilização é originada a partir de forças de repulsão eletrostática que as partículas experimentam quando são envolvidas por uma dupla camada de cargas elétricas. (KRAYNOV; MÜLLER, 2011). No meio de suspensão (que neste caso precisa ser aquoso), íons podem se adsorver à superfície das partículas e formar uma camada carregada, que é contrabalanceada por íons de carga oposta. Logo, a repulsão entre estas duas camadas de uma partícula para outra assegura a estabilização (Figura 7A). (SHI, J., 2002).
- *Estabilização estérica.* Este tipo de estabilização é alcançada por meio da ligação ou adsorção de macromoléculas (como polímeros ou biopolímeros de alto peso molecular) à superfície das partículas, podendo ser empregada tanto para meios aquosos quanto orgânicos. A repulsão estérica existente entre as camadas poliméricas envolvendo as partículas é o que confere estabilidade a estas últimas. A interação existente entre a camada polimérica e a partícula é frequentemente um resultado da doação de densidade eletrônica de átomos do polímero para orbitais vazios existentes nos átomos do metal do qual a partícula é constituída (Figura 7B). (KRAYNOV; MÜLLER, 2011).
- *Estabilização eletrostérica.* Como a própria denominação sugere, estes mecanismos de estabilização ocorrem pela combinação de efeitos eletrostáticos e estéricos. Podem acontecer para o caso, por exemplo, de partículas carregadas

envoltas por uma camada polimérica neutra, ou, como é mais comum, quando as partículas são estabilizadas por polieletrólitos (Figura 7C). (SHIH, 2002).

Figura 5 – Métodos convencionalmente empregados para estabilização de nanopartículas metálicas em suspensão: (A) estabilização eletrostática, (B) estabilização estérica e (C) estabilização eletrostérica.



Fonte: Adaptado de: HE, 2014.

Entre os principais agentes estabilizantes já empregados na síntese de nanopartículas metálicas encontram-se, de maneira geral, polímeros (como polivinilpirrolidona, polivinilálcool, polietilenoglicol, polipropilenoglicol, ácido poliacrílico e polieletrólitos), hidrocarbonetos de cadeia longa funcionalizados (como oleilamina, ácido oleico, dodecanotiol, octadecilamina, docecilamina e trioctilfosfina), biomoléculas (como peptídeos, proteínas e polissacarídeos), compostos estudados pela chamada química supramolecular (calixarenos, dendrímeros e éteres-coroa), moléculas pequenas (glicose, oxalato, citrato, etileno glicol, formaldeído, dimetilformamida e ácido ascórbico) (DUAN; WANG; LI, 2015; DUMUR et al., 2011; NIU; LI, 2014; TAURAN et al., 2013), e, mais recentemente, líquidos iônicos (VOLLMER; JANIÁK, 2011; KRAYNOV; MÜLLER; 2011).

2.4 SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

A utilização de processos “verdes” para o desenvolvimento de rotas químicas de síntese que sejam mais sustentáveis e menos agressivas ao meio ambiente está se tornando cada vez mais popular e necessária, como uma consequência de problemas mundiais associados à contaminação ambiental. (KHARISSOVA et al., 2013). No ramo da

nanotecnologia, a demanda por princípios verdes ocorre porque, apesar das propriedades inovadoras e extremamente atrativas que os materiais nanoestruturados possuem, um impacto ambiental e à saúde pode ocorrer como consequência do emprego de compostos potencialmente tóxicos para a produção de tais materiais. Esta situação pode ser agravada pelo fato de que a produção e aplicação dos mesmos em procedimentos industriais é crescente, o que aumenta a possibilidade de descarte de resíduos no ambiente. Por outro lado, a possibilidade de se encontrar resíduos destes reagentes no produto final pode não somente impactar de modo negativo a saúde humana, como também diminuir as suas possibilidades de aplicação. (KUMAR; LATHER; PANDITA, 2015).

Nos dias atuais, portanto, existe um constante e considerável esforço por parte da comunidade científica para a minimização do uso de solventes, agentes redutores e estabilizantes nocivos que são empregados para a síntese de nanomateriais (representados principalmente pelas MNps), assim como para a substituição dos mesmos por alternativas que sejam eco e biocompatíveis, no intuito de se diminuir os riscos à saúde. Neste cenário, a chamada “nanotecnologia verde” vem como uma alternativa para se reduzir as possíveis consequências negativas associadas à produção de nanomateriais, por meio da introdução de reagentes de fontes naturais nos processos sintéticos. (KUMAR; LATHER; PANDITA, 2015). Entre tais reagentes podem ser citados extratos vegetais, vitaminas, polissacarídeos, polímeros biodegradáveis, peptídeos, proteínas e até mesmo microorganismos que atuam como agentes redutores e/ou estabilizantes, sobretudo para síntese de MNps. (DUAN; WANG; LI, 2015; KHARISSOVA et al., 2013; KUMAR; LATHER; PANDITA, 2015; MITTAL; CHISTI; BANERJEE, 2013; RAUWEL et al., 2015).

A utilização de estratégias verdes para a produção de MNps traz substanciais vantagens tanto ao processo de síntese quanto ao produto final. Uma vez que são empregados para as reações compostos e extratos de fontes naturais, procedimentos economicamente mais viáveis podem ser desenvolvidos. Em alguns casos é possível ainda a obtenção de tais extratos a partir de resíduos oriundos de atividades agrícolas e agroindustriais, como de cascas, sementes e bagaços (desde que estejam livres de contaminantes), o que pode otimizar ainda mais o custo do processo. (KUMAR; LATHER; PANDITA, 2015).

Nanopartículas obtidas por métodos verdes possuem também uma maior biocompatibilidade, o que leva a um aumento das suas possíveis aplicações biológicas. O emprego de reagentes originados de fontes naturais pode minimizar prováveis efeitos

tóxicos (KUMAR; LATHER; PANDITA, 2015; SCHRÖFEL et al., 2014), e também favorecer a interação com células, tecidos, proteínas e outros alvos existentes em sistemas biológicos.

A praticidade das rotas verdes é outro ponto positivo que pode ser destacado, principalmente quando emprega extratos vegetais, os quais contêm biomoléculas (como compostos fenólicos, terpenoides, flavonoides, polissacarídeos, proteínas, enzimas e aminoácidos) que podem atuar tanto como agentes redutores quanto como agentes estabilizantes. Deste modo, a reação de formação das MNps ocorre em apenas uma etapa, sem a necessidade da adição de outros reagentes durante o processo. (KHARISSOVA et al., 2013; KUMAR; LATHER; PANDITA, 2015; RAUWEL et al., 2015). Como resultado, tem-se a obtenção de MNps geralmente em bom rendimento, com a geração de uma grande quantidade de nanoestruturas que possuem tamanho e morfologia bem definidos. (MITTAL; CHISTI; BANERJEE, 2013; SCHRÖFEL et al., 2014).

Considerando-se as vantagens apresentadas pela utilização de reagentes verdes na síntese de MNps, é possível pressupor uma gama ainda maior de aplicações que podem ser dadas a tais nanomateriais. Sua utilização para propósitos biomédicos é talvez a mais estudada atualmente. Assim, são frequentemente reportados na literatura trabalhos que relatam a síntese verde de MNps com a posterior investigação de sua atividade antimicrobiana (SHENDE et al., 2015), anticancerígena (JIA et al., 2015) e antioxidante (SATHISHKUMAR et al., 2016), assim como da sua possibilidade de aplicação em sistemas de liberação controlada de fármacos (*drug delivery*) (PATRA et al., 2015) e em sensores e biosensores para diagnóstico de doenças (BRONDANI et al., 2014). Além da aplicação em sistemas biomédicos, podem ser encontrados trabalhos recentes que aplicam MNps no desenvolvimento de soluções para problemas ambientais, como para degradação de poluentes (PAUL et al., 2016) e adsorção de metais pesados (AN; ZHAO, 2012). Merecem destaque também as aplicações no âmbito industrial e tecnológico, como para a catálise de reações orgânicas (NASROLLAHZADEH et al., 2014), desenvolvimento de sensores para detecção de compostos de relevância farmacológica (SATYANARAYANA et al., 2015), e no desenvolvimento de dispositivos para armazenamento de energia (NAGAMUTHU; VIJAYAKUMAR; MURALIDHARAN, 2013).

A utilização de polissacarídeos para a síntese de MNps é, no âmbito da nanotecnologia verde, uma das estratégias mais exploradas. A natureza polar apresentada por estas biomoléculas permite que as reações sejam realizadas em meio aquoso,

eliminando a necessidade de se utilizar solventes tóxicos. A elevada quantidade de ligações de hidrogênio existentes entre as cadeias biopoliméricas pode prevenir as nanopartículas sintetizadas de sofrer agregação, o que, juntamente com a presença de grupos funcionais em sua estrutura que são passíveis de oxidação, permite que os polissacarídeos, em muitos casos, possam atuar simultaneamente como agentes redutores e estabilizantes. O fato de que as interações entre os polissacarídeos e as MNps formadas são relativamente fracas possibilita ainda que as partículas obtidas sejam separadas das misturas reacionais quando desejado. (DUAN; WANG; LI, 2015; SHARMA; YNGARD; LIN, 2009). Tais características, juntamente com a biocompatibilidade e biodegradabilidade tipicamente apresentadas para estas biomoléculas (YAN et al., 2015), fazem com que os polissacarídeos estejam entre os reagentes verdes mais estudados para a síntese de MNps.

2.5 POLISSACARÍDEOS SULFATADOS E PORFIRANAS

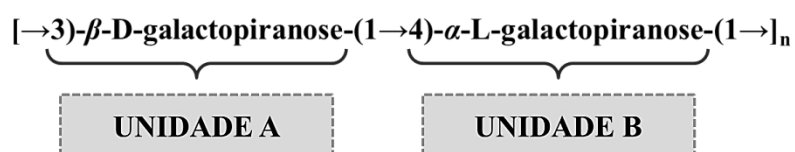
Os polissacarídeos são um dos principais constituintes dos organismos vivos, estando presentes em plantas, animais (vertebrados e invertebrados) e micro-organismos. São constituídos por longas cadeias poliméricas de mono, di ou oligossacarídeos unidos através de variadas possibilidades de ligações éteres, especificamente denominadas de ligações glicosídicas. São responsáveis por desempenhar papéis biológicos de extrema importância, como constituição estrutural e geração de energia. Tais biomoléculas apresentam geralmente um ou mais grupos funcionais ligados covalentemente ao esqueleto de carboidrato em diferentes posições (RAVEENDRAN et al., 2013), como por exemplo NH_2 , $-\text{COOH}$, $-\text{OSO}_3^-$ e $-\text{NH}(\text{CO})\text{CH}_3$. O grande número de polissacarídeos com diferentes estruturas químicas e propriedades físicas faz desta classe de biomoléculas uma expressiva fonte de materiais para aplicação em diversas áreas, como farmácia, medicina, biotecnologia e engenharia. (RINAUDO, 2008).

Polissacarídeos com um elevado grau de funcionalização com grupos sulfatos (OSO_3^-) são chamados de polissacarídeos sulfatados (PLS). Sua principal fonte natural são as algas marinhas, onde estão presentes em sua matriz extracelular, desempenhando funções estruturais, além de auxiliar na regulação osmótica, iônica e mecânica para

adaptação ao ambiente marinho. (KADAM; TIWARI; O'DONNELL, 2015; SOUZA, 2010; ZHANG, Z. et al., 2010). Esta classe de polissacarídeos tem chamado a atenção de pesquisadores de diversas áreas devido às suas propriedades bioquímicas, das quais podem ser citadas suas atividades anticoagulantes, antioxidantes, antitumorais, anti-inflamatórias e antivirais. (COSTA et al., 2010; RAVEENDRAN et al., 2013; WIJESSEKARA; PANJESTUTI; KIM, 2011; SOKOLOVA et al., 2014). Além das atrativas propriedades farmacológicas, os PLS podem ainda encontrar aplicações em biotecnologia e engenharia, atuando como estabilizantes, geleificantes, emulsificantes e espessantes em indústrias de alimentos, de cosméticos e farmacêuticas. (JIAO et al., 2011; KADAM; TIWARI; O'CONNELL, 2015).

Nos últimos anos, o emprego de PLS para a síntese verde de MNps tem ganhado destaque como consequência das características observadas para estas biomoléculas, como biocompatibilidade, biodegradabilidade, atoxicidade, baixo custo e abundância natural. Portanto, MNps produzidas a partir de PLS combinam em si as interessantes propriedades biológicas de tais biomoléculas com as propriedades físico-químicas únicas apresentadas pelas nanopartículas. (MANIVASAGAN; OH, 2016). Assim, é frequente na literatura o desenvolvimento de MNps com a utilização de PLS como fucoïdanas (LEUNG; WONG; XIE, 2010), carragenanas (ELSUPIKHE et al., 2015) e porfiranas (VENKATPURWAR; POKHARKAR, 2011; VENKATPURWAR; SHIRAS; POKHARKAR, 2011), sobretudo visando aplicações biotecnológicas e biomédicas.

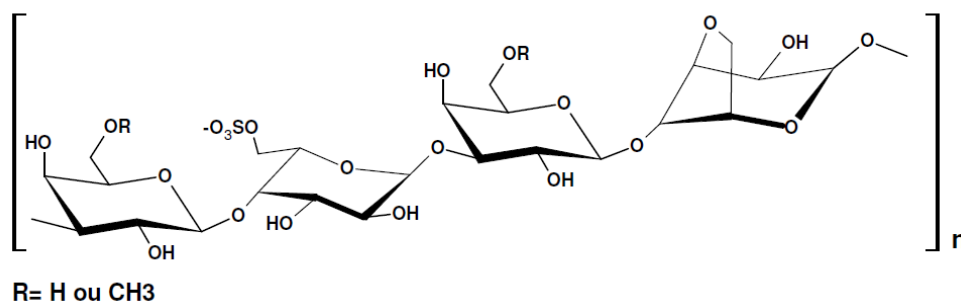
As porfiranas (PFR) estão entre os PLS mais estudados (JIAO et al., 2011). São produzidas pelas algas vermelhas da ordem Bangiales, especialmente as do gênero *Porphyra* (VO et al., 2015), as quais são extensivamente cultivadas no leste e sudeste asiáticos para consumo como alimento. Sua estrutura consiste em uma cadeia polimérica linear formada por unidades de β -D-galactopiranosose substituídas glicosidicamente no carbono 3 (unidade A) e de α -L-galactopiranosose substituídas no carbono 4 (unidade B), mostrando um arranjo dissacarídico alternante repetitivo (STEWART, 1974; VIANA, 2005):



As unidades dissacarídicas apresentadas acima podem ainda possuir variado padrão e grau de substituição por grupos funcionais, principalmente metil éter (no

carbono 6 de unidades de β -D-galactopiranoose) e grupos sulfato (os quais esterificam o carbono 6 de unidades de α -L-galactopiranoose), conferindo às biomoléculas em questão uma ampla variabilidade estrutural. (STEWART, 1974; VIANA, 2005). É importante ressaltar também que resíduos do tipo 3,6-anidro- α -L-galactopiranoose também estão presentes, o que aumenta a complexidade estrutural destes polissacarídeos (Figura 10). (JIANG et al., 2012; JIAO et al., 2011; NOSEDA et al., 2000; STEWART, 1974; VIANA, 2005).

Figura 10 – Estrutura química das porfiranas (PFR).



Fonte: VIANA, 2005.

Assim como os demais PLS, as PFR são conhecidas por suas propriedades farmacológicas antitumorais, antivirais, imunoestimulantes, hipotensivas, antioxidantes, anticoagulantes, entre outras. (VO et al., 2015; ZHOU et al., 2012). Por também possuírem uma elevada quantidade de grupos sulfato ligados à cadeia, configuram-se como autênticos poliânions biológicos, podendo apresentar propriedades em comum com os polieletrólitos convencionais sintéticos. (RAVEENDRAN et al., 2013). Neste sentido, quando aplicadas como agentes modificadores de eletrodos, podem melhorar o desempenho destes dispositivos, conferindo a eles maior sensibilidade, estabilidade e seletividade. A existência de uma elevada quantidade de grupos polares ligados à cadeia polimérica pode modificar ainda as propriedades da interface eletrodo/solução (RICE; GALUS; ADAMS, 1983), e permitir desta maneira a interação com moléculas específicas, otimizando o processo de detecção.

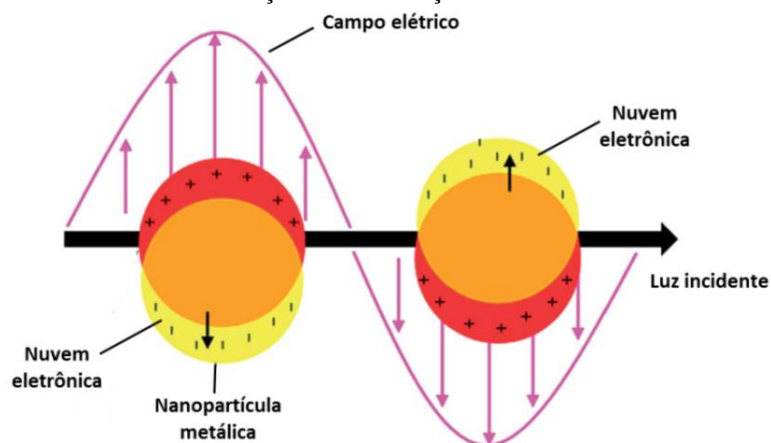
A possibilidade de síntese de MNps utilizando PFR, juntamente com o elevado potencial de aplicação de tais polissacarídeos e das nanopartículas na modificação de eletrodos, sugere que nanocompósitos constituídos por estes dois materiais podem encontrar uma atrativa e promissora aplicabilidade no desenvolvimento de EQM, sendo esta característica explorada neste trabalho.

2.6 NANOPARTÍCULAS DE OURO: PROPRIEDADES E APLICAÇÕES

As propriedades únicas apresentadas pelo ouro na forma nanoestruturada faz com que tais nanopartículas encontrem aplicações em inúmeras áreas. Consideráveis avanços científicos têm demonstrado com sucesso a utilização de nanopartículas de ouro (AuNps) em aplicações em medicina e biomedicina (por exemplo, no tratamento de câncer, em sistemas de diagnóstico por imagem e como carregadores de fármacos em sistemas *drug delivery*), biotecnologia (como consequência de sua pronunciada atividade antimicrobiana), catálise (principalmente em reações de degradação e hidrogenação de compostos orgânicos), ciências ambientais (como adsorvente de poluentes como corantes e pesticidas) (NORUZI, 2015) e no desenvolvimento de sensores para detecção de uma ampla diversidade de analitos de importância biomédica, farmacológica, industrial e ambiental. (SAHA et al., 2012).

As propriedades ópticas das AuNps constituem uma de suas características mais marcantes, e que possibilitam grande parte de suas aplicações. Quando uma suspensão de AuNps é exposta à radiação, o campo eletromagnético incidente induz uma oscilação coletiva dos elétrons livres presentes na banda de condução do metal, deslocando-os de suas posições de equilíbrio e causando uma separação global de cargas ou polarização em toda a superfície das partículas. O dipolo criado oscilará, portanto, juntamente com o componente elétrico da radiação (Figura 6). Este fenômeno, que ocorre sempre em valores de frequência específicos, é denominado ressonância *plasmon* de superfície (RPS), e também ocorre em nanopartículas de outros metais, tais como prata e cobre. (HUANG; EL-SAYED, 2010; KHLEBTSOV; DYKMAN, 2010). A energia associada a tal fenômeno é dependente de fatores que afetam a densidade eletrônica na superfície das partículas, como o tamanho, a forma e a morfologia, a natureza do meio em que estão dispersas e a distância existente entre as mesmas. (HUANG; EL-SAYED, 2010; SAHA et al., 2012; YESHCHENKO et al., 2013). No caso específico de AuNps, o fenômeno da RPS ocorre dentro da região visível do espectro eletromagnético, o que explica a intensa coloração apresentada pelas suspensões das referidas nanoestruturas. (SAHA et al., 2012).

Figura 6 – Representação esquemática do fenômeno de RPS em uma nanopartícula metálica, mostrando a oscilação dos elétrons da banda de condução com a radiação incidente.

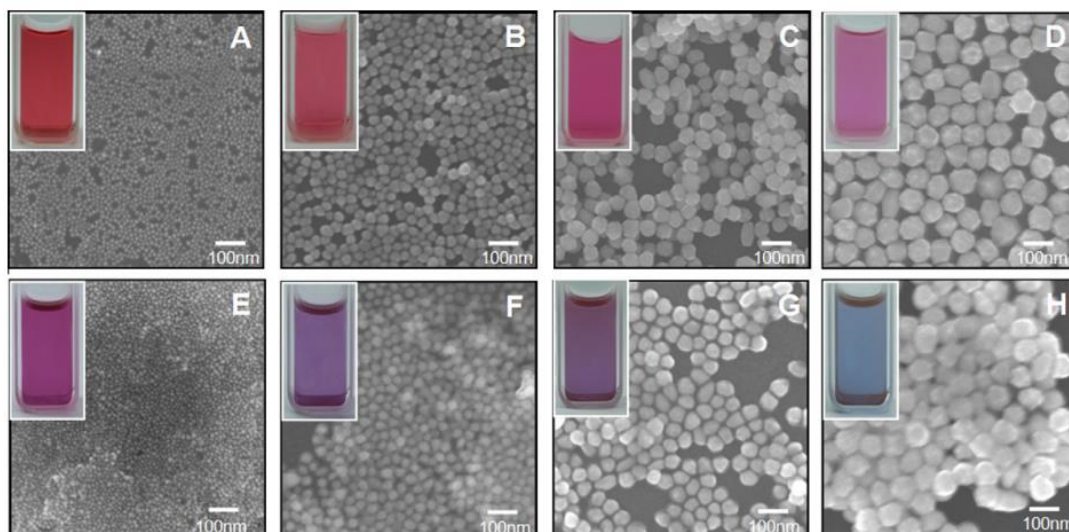


Fonte: Adaptado de: FONG; YUNG, 2013.

Assim, o espectro de absorção de uma suspensão de AuNps é caracterizado pela presença de uma única banda, denominada de banda *plasmon* ou plasmônica, que ocorre por volta de 520 nm. Entretanto, este valor pode variar de acordo com os fatores mencionados anteriormente. Para AuNps com tamanho inferior a 10 nm, a banda plasmônica apresenta-se pouco proeminente, como uma consequência de mudanças de fase resultantes do elevado número de colisões entre os elétrons que oscilam na superfície da partícula. Em contrapartida, um alargamento da banda *plasmon* é observado para suspensões de AuNps com mais de 100 nm, como resultado da contribuição de oscilações de ordens superiores para o fenômeno de RPS. (HUANG; EL-SAYED, 2010).

Assim como mencionado, um dos fatores que afetam a energia da absorção decorrente do fenômeno da RPS é o tamanho das partículas em suspensão. Conseqüentemente, uma variação no diâmetro das AuNps será acompanhada por uma alteração visual da coloração da suspensão. A Figura 7, retirada do trabalho de Baik; Hong e Park (2011), ilustra bem tal afirmação. São representadas micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo (MEV-FEG) de AuNps com diferentes tamanhos estabilizadas em citrato e dispersas em meio aquoso (Figuras 7A a 7D) e em tolueno (Figuras 7E a 7H). Nota-se, para os dois casos, uma clara variação na coloração das suspensões com a variação nos tamanhos médios das partículas. Além disso, comparando-se os dois conjuntos de micrografias, é possível verificar que o meio de dispersão possui também influência direta sobre o fenômeno da RPS, já que cores diferenciadas para os mesmos tamanhos médios podem ser observadas ao se empregar água ou tolueno como dispersantes.

Figura 7 – Micrografias obtidas por MEV/FEG para AuNps estabilizadas em citrato e dispersas em água (A-D), com diâmetros de (A) 13 (± 1) nm, (B) 33 (± 3) nm, (C) 49 (± 4) nm e (D) 72 (± 4) nm, e em tolueno (E-F), com diâmetros de (E) 13 (± 1) nm, (F) 32 (± 2) nm, (G) 46 (± 5) nm e (H) 72 (± 5) nm. As imagens inseridas mostram as cores das suspensões observadas para cada tamanho.

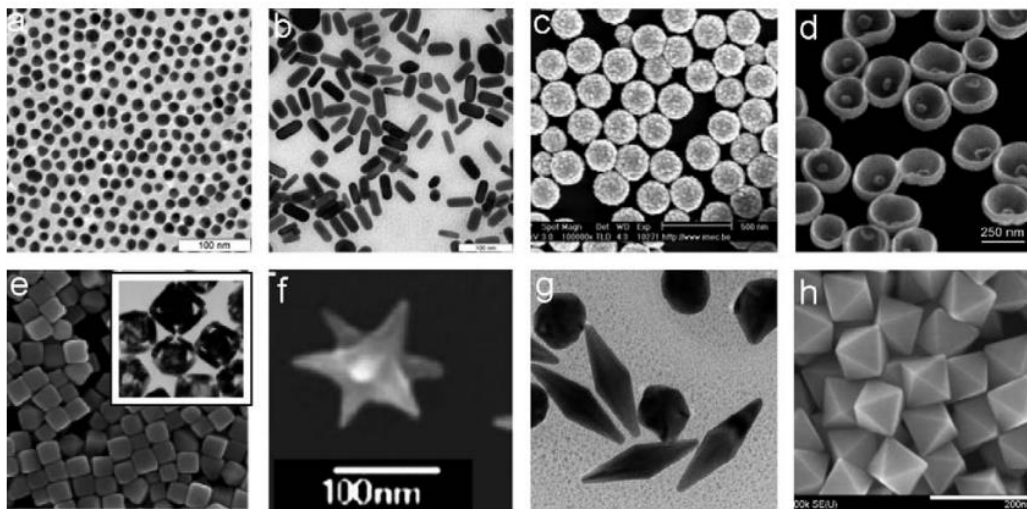


Fonte: BAIK; HONG; PARK, 2011.

O estado de agregação é outro fator que altera a energia da RPS para AuNps. Geralmente, um alargamento da banda plasmônica é observado quando as partículas formam agregados, o qual costuma ser acompanhado por um deslocamento do máximo de absorção para maiores comprimentos de onda e mudança da coloração da suspensão de vermelho para azul. Devido a isto, AuNps constituem um plataforma atrativa e prática para o desenvolvimento de sensores colorimétricos. (SAHA et al., 2012).

Outra propriedade que diversifica as aplicações das AuNps é a possibilidade de sua obtenção em uma variedade de formas e morfologias, assim como destacado por Dykman e Khlebtsov (2012) e por Langille e colaboradores (2012). A síntese de AuNps em diferentes morfologias e formas pode favorecer, por exemplo, a interação com moléculas e biomoléculas específicas, além de modificar suas propriedades ópticas (fenômeno RPS). Dependendo das condições empregadas durante o processo de obtenção, AuNps podem ser produzidas em formas como nanoesferas, nanobastões, nanocubos, nanoestrelas, nanoconchas, *nanobowls*, octaedros, bipirâmides e tetraedros, para citar apenas algumas das formas já observadas (Figura 8).

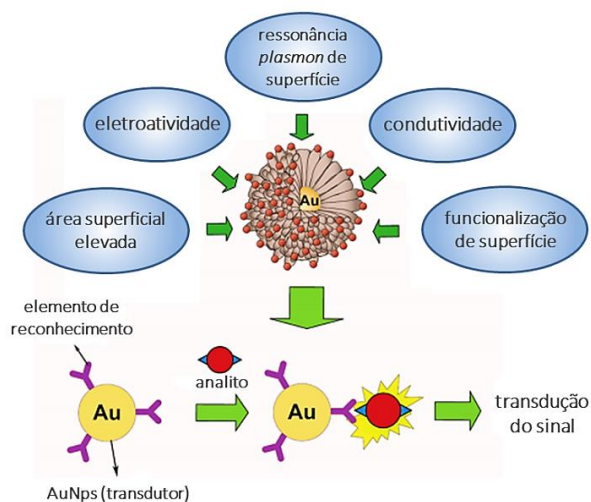
Figura 8 – Diferentes formas e morfologias observadas para AuNps: (A) nanoesferas, (B) nanobastões, (C) nanoconchas (nanopartículas *core shell* SiO₂/Au), (D) *nanobowls*, (E) nanocubos, (F) nanoestrelas, (G) bipirâmides e (H) octaedros.



Fonte: KHLEBTSOV; DYKMAN, 2012.

As nanopartículas de ouro possuem propriedades diferenciadas e características que favorecem a sua aplicação no desenvolvimento de sensores químicos e bioquímicos (Figura 9). Fatores como facilidade de preparação, biocompatibilidade, estabilidade em suspensão e possibilidade de funcionalização, juntamente com propriedades como interação com a luz visível, elevada condutividade elétrica e alta área superficial, fazem com que estes nanomateriais estejam entre os mais empregados para detecção de uma ampla diversidade de analitos de importância biomédica, farmacológica, industrial e ambiental. (SAHA et al., 2012).

Figura 9 – Algumas propriedades físicas e químicas de AuNps e exemplo de funcionamento de um sistema de detecção baseado neste nanomaterial.



Fonte: Adaptado de: SAHA et al., 2012.

Particularmente, a utilização de AuNps como agentes modificadores de eletrodos consiste em um tópico de elevado interesse para o desenvolvimento de sensores e biossensores eletroquímicos, uma vez que a alta condutividade e área superficial apresentadas por este tipo de nanomaterial fazem com que a sensibilidade dos dispositivos seja geralmente aumentada. Suas propriedades catalíticas podem reduzir o sobrepotencial de muitas reações eletroquímicas, aperfeiçoando desta maneira o processo de detecção. Assim, eletrodos modificados com AuNps são frequentemente reportados para a determinação, por exemplo, de íons de metais pesados, fármacos, pesticidas, hormônios e compostos fenólicos, com um bom desempenho analítico e elevada sensibilidade. (KUMAR et al., 2015; SAHA et al., 2012).

Adicionalmente, a interação de AuNps com biomoléculas permite que este nanomaterial seja explorado como uma eficiente plataforma de imobilização para estruturas biológicas, como anticorpos, enzimas, antígenos e ácidos nucleicos, sem que as mesmas percam sua bioatividade. Além de atuar como suporte, as AuNps geralmente atuam como amplificadores nanométricos de sinal, possibilitando a detecção *in vitro* e até mesmo *in vivo* de antígenos, tais como vírus e bactérias, e de uma série de biomarcadores para diagnóstico precoce de câncer e outras doenças. (DEVI; DOBLE; VERMA, 2015; KHAN; VISHAKANTE; SIDDARAMAIAH, 2013; SAHA et al., 2012).

2.7 ELETRODOS MODIFICADOS COM NANOPARTÍCULAS E POLISSACARÍDEOS

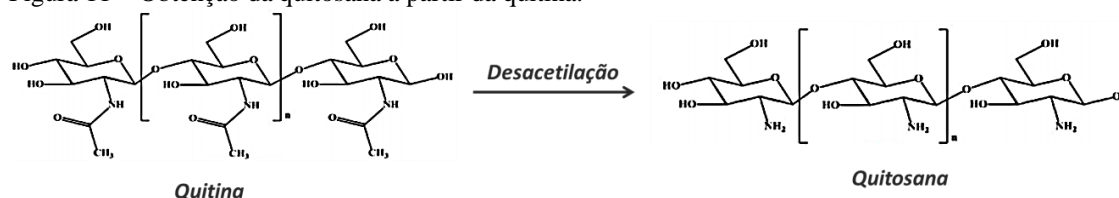
A versatilidade apresentada por MNps sintetizadas por rotas verdes empregando extratos naturais e biomoléculas como polissacarídeos faz com que exista um aumento considerável em suas possibilidades de aplicação. Além das aplicações já citadas, tem-se percebido nos últimos anos um crescente interesse relacionado à utilização destes nanomateriais em ramos como eletroquímica e eletroanalítica, para desenvolvimento de sensores e biossensores capazes de detectar níveis traço de compostos de relevância biológica, farmacológica e ambiental. Isto acontece como uma consequência das vantagens que as rotas verdes trazem ao processo de síntese e ao produto final, as quais são também desejáveis para o desenvolvimento de sensores. Dentre essas vantagens, podem ser destacadas a maior viabilidade econômica do processo, o que minimiza o custo total do dispositivo, assim como a maior biocompatibilidade das MNps resultantes, a qual

permite a interação com biomoléculas (como proteínas, enzimas e anticorpos) e favorece as aplicações do sensor desenvolvido em sistemas biológicos.

De fato, há na literatura um número considerável e crescente de trabalhos envolvendo a modificação química de eletrodos de diferentes materiais condutores com nanocompósitos constituídos por nanopartículas metálicas ou de óxidos metálicos e polissacarídeos para determinação de diferentes tipos de analito em vários tipos de matrizes. Dentre os polissacarídeos estudados nos trabalhos mais recentes, estão a quitosana, a goma guar e o amido, cujas aplicações serão abordadas com mais detalhes nos parágrafos a seguir.

A quitosana (QT) é um dos polissacarídeos mais empregados como estabilizante de nanopartículas para a construção de sensores eletroquímicos, estando presente em diversos trabalhos recentes (ÇİFTÇİ et al., 2014; DEHDASHTIAN et al, 2016; MALIK et al., 2016; TIWARI; KUMAR; PRAKASH, 2015; XIANG et al., 2015). Trata-se de um biopolímero obtido pela desacetilação da quitina (Figura 11), a qual é o principal constituinte estrutural do exoesqueleto de crustáceos. (SATYANARAYANA; REDDY; GOBI, 2014). Sua estrutura é linear e caracterizada por ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 4) entre unidades de glucosamina. Devido à grande quantidade de grupos amino, a QT pode facilmente ser solubilizada em meio ácido, graças à protonação dos referidos grupos. (MANIVASAGAN; OH, 2016). A existência de tais cargas positivas faz aumentar ainda mais as suas possibilidades de aplicação. Devido a propriedades como biocompatibilidade, baixa toxicidade, biodegradabilidade, hidrofiliicidade, baixo custo e alta capacidade de adsorção, entre outras, a QT é considerada um excelente agente estabilizante para a síntese de nanopartículas, e também um atrativo modificador de eletrodos para a construção de sensores e biossensores eletroquímicos. (DEHDASHTIAN et al., 2016).

Figura 11 – Obtenção da quitosana a partir da quitina.



Fonte: Adaptado de: MANIVASAGAN; OH, 2016.

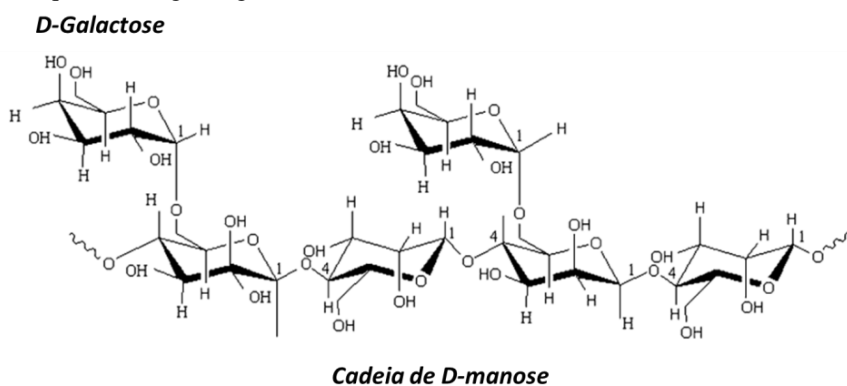
Como exemplo, pode-se citar o trabalho desenvolvido por Brondani e colaboradores (2014), onde imunossensores para diagnóstico de infarto agudo do miocárdio por meio da detecção da proteína troponina cardíaca (Tn) foram desenvolvidos, baseados na modificação de um eletrodo com carbono vítreo com a molécula iônica I-Py (iodeto de (*E*)-4-[(4-deciloxyfenil)diazetil]-1-metilpiridínio) e com AuNps estabilizadas em QT e ligadas ao anticorpo monoclonal anti-Tn (AuNps-QT-antiT-n). As nanopartículas foram caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e de varredura por efeito de campo (MEV/FEG) e por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-VIS). Tais experimentos evidenciaram que as nanopartículas foram obtidas com um tamanho médio igual a 13 nm, e provaram que uma ligação estável foi formada entre as AuNps-QT e os anticorpos anti-Tn (por meio dos grupos $-\text{NH}_3^+$ da QT com os grupos $-\text{COO}^-$ dos anticorpos). O princípio de detecção baseou-se no processo redox da molécula I-Py, cujo sinal de corrente foi diminuído de modo proporcional à concentração dos antígenos Tn ligados aos anticorpos anti-Tn imobilizados na superfície do eletrodo. Utilizando voltametria de onda quadrada (VOQ) e após a otimização de fatores como as quantidades dos modificadores no eletrodo, parâmetros voltamétricos e tempo de incubação do sensor na solução do antígeno Tn, uma resposta linear na faixa de 0,20 a 1,00 ng mL⁻¹ de Tn foi obtida (em meio de tampão PBS 0,01 mol L⁻¹ pH 7,4). O limite de detecção (LD) encontrado foi igual a 0,10 ng mL⁻¹, valor que está abaixo do limite considerado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para diagnóstico de infarto (0,3 ng mL⁻¹). O imunossensor apresentou ainda seletividade, reprodutibilidade e exatidão para a determinação de Tn em amostras reais de soro sanguíneo.

Tiwari; Kumar; e Prakash (2015), por sua vez, empregaram a QT como estabilizante de nanopartículas de prata (AgNps-QT), as quais foram aplicadas como modificadores de eletrodos de grafite impressos, a fim de se desenvolver sensores descartáveis e de baixo custo para a detecção de azidotimidina (AZT, que consiste no fármaco mais empregado para tratamento de pessoas infectadas com o vírus HIV) em plasma humano. As AgNps-QT foram sintetizadas pelo método da redução química com NaBH₄ e caracterizadas por meio de técnicas como espectroscopia de absorção na região do UV-VIS e do infravermelho (FTIR), MET, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva por raios X. Tais experimentos sugeriram que interações eletrostáticas existiam entre a QT e as AgNps, e foram as responsáveis para a boa estabilidade encontrada para a suspensão (potencial zeta de +38,2 mV). A

modificação de eletrodos de grafite impressos modificados com as AgNps-QT possibilitou a determinação de AZT por voltametria cíclica (VC) na faixa de 10 a 533 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (em tampão PBS 0,1 mol L^{-1} pH 7,6) em amostra de plasma sanguíneo humano diluído, com um LD baixo e da ordem de 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$. As boas respostas apresentadas pelos eletrodos modificados foram atribuídas à alta condutividade aliada à elevada área superficial das nanopartículas, assim como a interação existente entre as moléculas de AZT e as nanoestruturas presentes no eletrodo. Além disso, percebeu-se que as AgNps-QT electrocatalisaram o processo de oxidação da AZT, já que um menor potencial foi apresentado para a reação, em comparação aos eletrodos não modificados.

A chamada goma guar (GG) consiste em outro polissacarídeo relatado na literatura como estabilizante de nanopartículas sintetizadas para aplicações em eletroanalítica. A GG possui origem vegetal (encontrada na leguminosa *Cyamopsis tetragonoloba*), e sua estrutura é caracterizada pela presença de resíduos de D-manose e galactose, em um arranjo onde os resíduos de manose são unidos por ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 4), formando uma cadeia linear principal, à qual está ligado um resíduo de D-galactose a cada duas unidades de manose (ligação α (1 \rightarrow 6)), como cadeia lateral (Figura 12). (MUDGIL; BARAK; KHATAR, 2014). Propriedades como hidrofiliicidade, alta solubilidade em meio aquoso, biodegradabilidade, baixo custo, capacidade de formar filmes sobre diferentes superfícies e de atuar como agente estabilizante (MALIK et al., 2016; PANDEY; GOSWAMI; NANDA, 2013; RASTOGI; GANESAN; KRISHNAMOORTHY, 2014) fazem com que este biopolímero possa ser explorado tanto para a síntese de nanoestruturas, quanto para a modificação de eletrodos.

Figura 12 – Estrutura química da goma guar.



Fonte: Adaptado de: MUDGIL; BARAK; KHATAR, 2014.

O trabalho de Malik e colaboradores (2016) pode ser tomado como exemplo da aplicação da GG. Neste estudo, nanopartículas de SnO₂ encapsuladas em GG (SnO₂-GG) foram sintetizadas e aplicadas na modificação de substratos de ITO (vidro recoberto com filme fino de óxido de índio) para a determinação do poluente emergente hidrazina. O nanocompósito SnO₂-GG foi caracterizado por técnicas como difração de raios X, FTIR, UV-VIS, MEV e MET, que indicaram a natureza cristalina das partículas de SnO₂, assim como a formação e estabilidade do compósito SnO₂-GG. Estudos por VC na presença da sonda eletroquímica [Fe(CN)₆]^{3-/4-} revelaram que o eletrodo ITO/SnO₂-GG apresentou um melhor comportamento do que o substrato de ITO não modificado e do que os eletrodos modificados com SnO₂ ou com GG separadamente. Os maiores valores de corrente e menores potenciais observados para o ITO/SnO₂-GG foram consequência da elevada condutividade e área superficial disponível no nanocompósito SnO₂-GG. O dispositivo desenvolvido mostrou-se eficiente para a determinação de hidrazina em tampão PBS 5 mmol L⁻¹ pH 7,0, uma vez que a corrente de oxidação da sonda eletroquímica cresceu de modo linear com o aumento da concentração do analito na faixa de 3 a 22 mmol L⁻¹. O sensor desenvolvido apresentou ainda estabilidade, bons níveis de reprodutibilidade e um LD igual a 2,76 mmol L⁻¹, de maneira que tais resultados potencializam a aplicação do ITO/SnO₂-GG para a determinação de hidrazina em amostras ambientais, farmacêuticas e clínicas.

Eletrodos modificados com nanopartículas sintetizadas em amido também têm sido desenvolvidos, pelo fato de ser um biopolímero altamente hidrofílico, biocompatível, biodegradável e de baixo custo. (ENGELBREKT et al., 2009; HAN et al., 2012; OLIVEIRA, R. D., 2014; WANG, W.; WANG, Q.; ZHANG, Z., 2008). O amido é o principal polissacarídeo de armazenamento e reserva energética encontrado em células vegetais, estando presente em elevadas quantidades especialmente nos tubérculos e nas sementes. Sua estrutura é caracterizada pela presença de dois polímeros de D-glicose: a amilose, de estrutura linear e não-ramificada, formada pela união dos resíduos de D-glicose por meio de ligações $\alpha(1\rightarrow4)$; e a amilopectina, que apresenta alta quantidade de ramificações. Na amilopectina, as ligações também são do tipo $\alpha(1\rightarrow4)$, mas os pontos de ramificação são $\alpha(1\rightarrow6)$. (NELSON; COX, 2002).

Han e colaboradores (2012), por exemplo, sintetizaram nanopartículas de paládio por redução com hidrazina estabilizadas em amido (PdNps-Am), e aplicaram o nanomaterial para a modificação de eletrodos de carbono vítreo (ECV/PdNps-Am). As PdNps-Am foram caracterizadas por MET, e o seu processo de formação foi estudado por

meio de espectroscopia UV-VIS. Os ECV/PdNps-Am foram aplicados para a determinação de H_2O_2 utilizando-se amperometria em potencial fixo de $-0,45\text{ V}$. Além de ter aumentado a área e a condutividade do eletrodo, as PdNps-Am catalisaram o processo de redução do H_2O_2 (em tampão PBS $0,1\text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0) possibilitando sua determinação na faixa linear de 1 a $820\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$, com um LD igual a $0,68\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$. A imobilização da enzima glicose-oxidase sobre os eletrodos possibilitou a detecção de glicose, por meio da determinação do H_2O_2 produzido pela reação enzimática, tendo-se observado linearidade de resposta entre $0,004$ a 22 mmol L^{-1} , com LD de $6,1\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ (em meio de tampão PBS $0,1\text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0). O biossensor desenvolvido apresentou estabilidade, reprodutibilidade e seletividade para glicose, o que possibilitou a sua aplicação para a determinação do monossacarídeo em amostras de sangue humano, alcançando níveis de recuperação satisfatórios entre $95,7$ a $105,1\%$.

Até o momento, não existem na literatura relatos de trabalhos que estudam a modificação química de eletrodos com nanopartículas metálicas estabilizadas em PFR. Neste sentido, a síntese de nanopartículas de ouro empregando a PFR simultaneamente como agente estabilizante e redutor foi realizada neste trabalho, e o nanocompósito resultante foi aplicado na modificação de EPCVs. Tais eletrodos foram então empregados para a determinação do fármaco antitumoral 5-fluorouracil (5-FU), a fim de se verificar a potencialidade de aplicação dos mesmos como sensores para o referido analito.

2.8 CÂNCER E AGENTES QUIMIOTERÁPICOS: 5-FLUOROURACIL (5-FU)

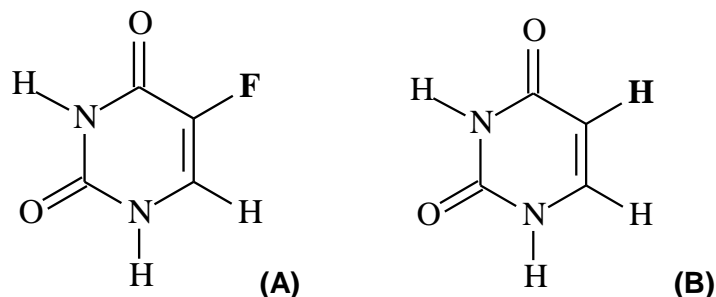
Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer está entre as maiores causas de mortalidade no mundo, com aproximadamente 14 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes registradas em 2012 (STEWART; WILD, 2014). O câncer consiste na rápida multiplicação e disseminação de células anormais, que crescem em ritmo superior ao natural e de modo desordenado, podendo invadir outros órgãos e regiões do corpo. (INCA, 2015). Tais células são, geralmente, menos especializadas em suas funções do que as duas correspondentes normais. Assim, conforme as células cancerosas vão substituindo as saudáveis, os tecidos invadidos vão perdendo progressivamente as suas funções. (ALMEIDA et al., 2005).

A quimioterapia consiste em uma das principais formas de tratamento empregadas contra o câncer. Seu principal objetivo consiste na destruição das células doentes, com a preservação das normais. Entretanto, a maior parte dos agentes quimioterápicos utilizados atualmente ainda atua de modo não específico. Assim, são lesadas tanto as células malignas quanto as saudáveis, principalmente as de rápido crescimento, como as gastrointestinais, capilares e as do sistema imunológico. Isto explica o aparecimento dos muitos efeitos colaterais da quimioterapia, como náuseas, perda de cabelo e maior susceptibilidade a infecções. (ALMEIDA et al., 2005). O mecanismo de ação da maior parte dos agentes quimioterápicos consiste na interação direta com os ácidos nucleicos DNA e RNA, e/ou na inibição dos mecanismos bioquímicos envolvidos em sua síntese e replicação. (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003).

O agente quimioterápico 5-fluorouracil (5-FU) está entre os fármacos mais empregados para o tratamento quimioterápico de tumores como os colorretais e os de mama, possuindo eficácia também no combate a outros tipos de câncer do sistema gastrointestinal e também cerebrais. (HEIDELBERGER; ANSFIELD, 1963; HUA et al., 2013). É considerado pela OMS como um medicamento fundamental para a saúde básica, estando presente na sua Lista Modelo de Medicamentos Essenciais. (WHO MODEL LIST OF ESSENTIAL MEDICINES, 2013).

O 5-FU (Figura 13A) atua nas células cancerosas tanto por incorporação direta aos ácidos nucleicos quanto por meio da inibição de sua biossíntese. Por ser um análogo estrutural da base nitrogenada uracila (Figura 13B), seus metabólitos podem ser incorporados ao DNA e ao RNA, além de possuírem ação inibitória sobre a enzima timidilato sintase, que é uma das enzimas responsáveis pela síntese de nucleotídeos. (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003). Como pode ser visto na Figura 13, a única diferença estrutural entre o 5-FU e a uracila consiste no átomo de flúor ligado ao carbono 5 do anel, em substituição ao átomo de hidrogênio existente na molécula da base nitrogenada.

Figura 13 – Estrutura química do agente quimioterápico 5-FU (A) e da base nitrogenada uracila (B).



Fonte: O autor.

O uso clínico dos agentes quimioterápicos em geral exige que os benefícios obtidos pelo tratamento sejam confrontados com a toxicidade e os efeitos colaterais, de modo que um índice terapêutico adequado seja encontrado para a administração aos pacientes. (ALMEIDA et al., 2005). Neste sentido, a determinação de tais agentes na corrente sanguínea consiste em um aspecto de suma importância para a maximização dos resultados positivos do tratamento e minimização dos efeitos tóxicos. De modo especial, o monitoramento da concentração de 5-FU livre circulante na corrente sanguínea consiste na melhor estratégia clínica para estudar variações individuais no metabolismo e na resposta ao tratamento. (CATALDI et al., 1988). Uma vez que a elevada toxicidade do fármaco em questão pode causar danos severos ao organismo se uma dosagem inadequada for administrada, sua determinação em plasma sanguíneo e em formulações farmacêuticas torna-se também um aspecto de elevada importância. (PRASAD et al., 2012).

No caso particular do 5-FU, uma considerável gama de técnicas foi e continua sendo empregada e pesquisada para a sua quantificação e também de seus metabólitos, tanto em amostras de fluidos biológicos quanto em amostras comerciais do medicamento. Assim pode-se citar as espectroscopias UV-VIS (MORIMOTO et al., 1981 apud BRENDA; BARATTÈ, 2010), de fluorescência (KHOT et al., 2010) e de espalhamento Raman (FARQUHARSON et al., 2005), eletroforese capilar (MAHNIK et al., 2004), cromatografia líquida de alta eficiência (ZHU et al., 2012), e as cromatografias gasosa e líquida acopladas à espectrometria de massas (LIU et al., 2010; RUBINO et al., 2006).

Apesar do bom desempenho analítico dos métodos citados, estes muitas vezes proporcionam análises lentas e de custo elevado, uma vez que usualmente exigem procedimentos laboriosos de preparação de amostras, além de fazerem uso de equipamentos bastante caros. Em particular, as técnicas cromatográficas utilizam uma

elevada quantidade de solventes orgânicos, que, se não forem corretamente descartados, podem ser prejudiciais ao meio ambiente. Frente a esta situação, o desenvolvimento de métodos mais práticos, rápidos e de baixo custo para a determinação de 5-FU torna-se um tópico de grande importância. (HUA et al., 2013). Neste contexto, técnicas eletroquímicas despontam como alternativas às técnicas mencionadas para a detecção de 5-FU, devido a vantagens como baixo custo, boa sensibilidade e seletividade, possibilidade de miniaturização e versatilidade. Adicionalmente, o tempo necessário para a realização das análises geralmente é menor, já que em vários casos não são necessários procedimentos complexos para o preparo de amostras.

Ainda que o número de estudos que reportam a determinação eletroanalítica de 5-FU seja relativamente pequeno, existe um crescente interesse por parte de pesquisadores no desenvolvimento de métodos para aplicação na detecção do analito em questão em amostras comerciais e biológicas, e também para avaliação da interação do mesmo. Os estudos mais recentes relatam a determinação de 5-FU empregando-se tanto eletrodos não modificados (SHAH et al., 2012; SATARADDI; NANDIBEWOR, 2011) quanto modificados. (HUA et al., 2013; PATTAR; NANDIBEWOR, 2015; PRASAD et al., 2012; SATARADDI; NANDIBEWOR, 2011; SATYANARAYANA et al., 2015; ZEYBEK et al., 2015; ZHAN et al., 2011).

Como exemplo, pode-se mencionar o trabalho desenvolvido por Satyanarayana e colaboradores (2015), onde um eletrodo de carbono vítreo (ECV) foi modificado com um nanocompósito formado por AuNps estabilizadas em QT e nanotubos de carbono de paredes múltiplas (ECV/AuNps-QT-MWCNT), com posterior aplicação na determinação de 5-FU em amostras de formulação farmacêutica e de fluidos biológicos. A caracterização eletroquímica realizada para os eletrodos evidenciou que o ECV/AuNps-QT-MWCNT possuía uma maior área eletroativa e menor resistência à transferência de carga em relação ao eletrodo não modificado, como uma consequência da presença do compósito AuNps-MWCNT, altamente condutor. O comportamento voltamétrico do 5-FU sobre os eletrodos modificados foi investigado por VC, de modo que melhores respostas foram alcançadas para o ECV/AuNps-QT-MWCNT ($E_{pa} = +1,10$ V em comparação a $+1,25$ V, valor observado para o eletrodo não modificado). Uma boa relação linear entre a concentração de 5-FU e a corrente de pico anódico foi observada utilizando voltametria de pulso diferencial (VPD) para o ECV/AuNps-MWCNT (em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 8,0), na faixa de $0,03$ a $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ do fármaco, com LD igual a 20 nmol L^{-1} . O sensor mostrou-se estável e seletivo para o 5-FU, apresentando

bons níveis de reprodutibilidade de resposta. A análise de amostras do medicamento na forma injetável e de amostras de urina demonstrou que o método desenvolvido pode ser eficazmente aplicado na determinação do 5-FU em análises de rotina, já que recuperações médias próximas a 100% foram alcançadas para ambos os casos.

No trabalho de Zeybek e colaboradores (2015), um ECV foi modificado com poli(púrpura de bromocresol) seguido pela deposição de DNA (dupla-fita) oriundo de células de peixe (ECV/PPBC/DNA). As duas etapas de modificação foram realizadas eletroquimicamente, e o sensor produzido foi aplicado tanto para a detecção de 5-FU, quanto para avaliação do processo de interação do fármaco com o ácido nucleico presente no eletrodo. Experimentos de caracterização comprovaram a eletropolimerização do PPBC e também a imobilização do DNA. O princípio de detecção do 5-FU sobre os eletrodos modificados baseou-se no decréscimo da corrente de oxidação da base nitrogenada guanina, como uma consequência da interação do analito com o material genético. Um comportamento linear entre a corrente e a concentração de 5-FU foi observado entre 1 a 8,5 e entre 8,5 a 50 mg mL⁻¹ do fármaco, com um LD igual a 0,31 mg L⁻¹ (em tampão acetato 0,5 mol L⁻¹ pH 4,8). O biossensor apresentou resposta estável e reprodutível, e também uma boa sensibilidade, que possibilitou a sua aplicação para a determinação de 5-FU em amostra real de medicamento na forma injetável, com porcentagens de recuperação satisfatórias no intervalo 93,2 a 102,6%.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo sintetizar e caracterizar nanopartículas de ouro estabilizadas no polissacarídeo sulfatado porfirana (AuNps-PFR), as quais serão utilizadas na modificação de eletrodos de pasta de carbono vítreo (EPCV/AuNps-PFR) aplicados à determinação eletroanalítica do agente antitumoral 5-fluorouracil (5-FU).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Extrair uma fração polissacarídica a partir de algas vermelhas obtidas de fonte comercial (*Nori*) e caracterizá-la por meio da determinação dos teores de açúcar total e grupos sulfato, por técnicas espectroscópicas (infravermelho – FTIR; ressonância magnética nuclear de ^{13}C – RMN- ^{13}C) e por espalhamento dinâmico da luz (DLS);
- II. Otimizar a síntese das AuNps-PFR a partir de planejamento fatorial 2^3 com triplicata no ponto central;
- III. Caracterizar as AuNps-PFR utilizando as técnicas de espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-VIS) e FTIR; DLS; determinação do potencial zeta (potencial- ζ); e por meio de microscopia eletrônicas de varredura por efeito de campo (MEV-FEG);
- IV. Preparar eletrodos de pasta de carbono vítreo modificados com AuNps-PFR (EPCV/AuNps-PFR), assim como eletrodos não modificados (EPCV) e eletrodos modificados apenas com PFR, e caracterizar os mesmos por técnicas eletroquímicas e estudos morfológicos;
- V. Determinar as melhores condições de resposta do EPCV/AuNps-PFR (como pH, tipo de eletrólito e parâmetros da voltametria de onda quadrada (VOQ)) para a determinação de 5-FU em formulação farmacêutica comercial.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todas as soluções foram preparadas com água destilada. O carbono vítreo em pó, o 5-FU, os sais $K_4Fe(CN)_6$ e $K_3Fe(CN)_6$, o ácido tetracloroáurico trihidratado ($HAuCl_4 \cdot 3H_2O$), a albumina de soro bovino, o ácido ascórbico e a glicose foram adquiridos da Sigma-Aldrich[®]. A galactose foi adquirida da Merck[®]. Todos os demais reagentes empregados na preparação de soluções e dos eletrodos foram de grau analítico, e utilizados sem purificação prévia. O tampão fosfato-salino (PBS) $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparado empregando-se os sais Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 e $NaCl$. Para a preparação do tampão Britton-Robinson (BR) $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ empregou-se os ácidos acético (CH_3COOH), fosfórico (H_3PO_4) e bórico (H_3BO_3). As soluções estoque de 5-FU foram preparadas imediatamente antes uso, dissolvendo-se a quantidade apropriada de fármaco em água destilada, em banho de ultra-som, para obtenção de uma concentração igual a $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. A solução do analito 5-FU foi mantida ao abrigo da luz e sob refrigeração a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, quando não utilizada.

4.2 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO POLISSACARÍDEO SULFATADO PFR

4.2.1 Extração

O polissacarídeo sulfatado utilizado neste trabalho foi obtido a partir de algas vermelhas do gênero *Porphyra* em uma de suas formas comerciais, conhecida como Nori (Otafuku[®]), por meio de extração aquosa segundo procedimento previamente descrito (NOSEDA et al., 2000). Utilizou-se 55,0 g da alga desidratada cortados manualmente em pequenos fragmentos, que foram inicialmente triturados em um liquidificador com um pequeno volume de água destilada. A mistura resultante foi submetida à extração aquosa sob agitação mecânica durante 5 horas à $60 \text{ }^\circ\text{C}$, empregando-se um volume total de água

destilada igual a 2 L. O extrato assim obtido foi posteriormente filtrado e centrifugado (25 °C e 10000 rpm, em centrífuga Hitachi, modelo Himac CR21GII), reservando-se o sobrenadante. A este foram adicionados 6 L de etanol absoluto, e após a total precipitação do polissacarídeo, a fração resultante foi submetida novamente à centrifugação, nas mesmas condições da etapa anterior. Os polissacarídeos foram purificados por redissolução em água destilada e diálise, que foi monitorada por meio da realização de testes qualitativos para Cl^- utilizando uma solução de AgNO_3 0,25 mol L^{-1} . Após a diálise (cujo fim foi determinado pelos resultados negativos para a presença de Cl^-), a fração polissacarídica obtida foi congelada e liofilizada (liofilizador Liotop, modelo L202), para obtenção do polissacarídeo em sua forma sólida.

4.2.2 Caracterização física e química

Os espectros de absorção na região do infravermelho (*Fourier Transform Infrared Spectrophotometer* – FTIR) para a fração polissacarídica extraída foram obtidos em equipamento da marca PerkinElmer, modelo Frontier, no modo transmitância e empregando amostras do polissacarídeo em pastilhas de brometo de potássio (KBr), na faixa de 4000 a 500 cm^{-1} .

A aquisição de espectros de ressonância magnética nuclear de ^{13}C (RMN de ^{13}C) foi realizada em espectrômetro Bruker, modelo Avance III, em *probe* de diâmetro externo de 5 mm. As amostras foram dissolvidas em água deuterada (D_2O) para análise, a uma temperatura de 80 °C. Os deslocamentos químicos, expressos em ppm, foram determinados utilizando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. As análises para o núcleo de carbono (^{13}C) foram obtidas na frequência base de 100,61 MHz, com intervalo de aquisição de sinal de 2,0 segundos, sendo feitas no total 8000 aquisições.

As medidas de espalhamento dinâmico da luz (*dynamic light scattering* – DLS) foram realizadas a fim de se avaliar o padrão de distribuição das cadeias polissacarídicas em suspensão, como um meio de se estimar o grau de homogeneidade da fração polissacarídica. As suspensões de PFR foram preparadas em água destilada, em uma concentração igual a 1 mg mL^{-1} e as medidas foram realizadas à temperatura ambiente em equipamento da marca Malvern, modelo NanoZ590.

A caracterização química da fração polissacarídica obtida neste trabalho foi realizada por meio da quantificação de açúcar total (carboidratos totais) e de grupos sulfato presente nas amostras nas amostras.

A determinação do teor de açúcar total foi realizada segundo o método colorimétrico Fenol-Ácido Sulfúrico, descrito por Dubois e colaboradores (1956), empregando-se como padrão o monossacarídeo galactose. Um volume de 1 mL da solução padrão ou da solução da amostra polissacarídica foi adicionado em um tubo de ensaio, seguido pela adição de 1 mL de solução aquosa de fenol a 5%. A seguir, acrescentou-se rapidamente à mistura 5 mL de H₂SO₄ concentrado. Os tubos foram homogeneizados, e, após resfriamento, a coloração resultante foi lida em 490 nm em espectrofotômetro da marca Varian, modelo Cary 50 Bio. As curvas analíticas para a determinação foram construídas na faixa de 10 a 70 µg mL⁻¹ de galactose, e a leitura das amostras e dos padrões foram realizadas em triplicata.

O teor de grupos SO₄²⁻ foi determinado nas amostras por meio do método turbidimétrico desenvolvido por Dogson e Price (1962). Inicialmente, realizou-se a reação de hidrólise do polissacarídeo, utilizando para tanto 32 mg da amostra pesada em um *vial*, seguido pela sua dissolução em 1 mL de solução de HCl 1 mol L⁻¹. A mistura foi mantida em estufa a 105 °C durante 5 horas. Utilizou-se como padrão soluções de Na₂SO₄ anidro, preparadas em HCl 1 mol L⁻¹. Em um tubo de ensaio adicionou-se 0,2 mL de amostra hidrolisada ou de solução padrão, 3,8 mL de solução de ácido tricloroacético 3,8% e 1 mL de reativo gelatina-bário (preparado por meio da dissolução de 200 mg de gelatina em pó em 40 mL de água destilada, seguido por 5 horas de repouso sob resfriamento e por fim adição e dissolução de 200 mg de BaCl₂). O conteúdo dos tubos foi homogeneizado, e, após repouso de 20 minutos, realizou-se a leitura em 360 nm, no mesmo equipamento empregado para a determinação de açúcar total. As curvas analíticas foram construídas na faixa de 0,1 a 1 mg mL⁻¹ de SO₄²⁻, sendo a leitura das amostras e dos padrões realizadas também em triplicata.

4.3 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO ESTABILIZADAS NA PFR (AuNps-PFR)

A síntese das AuNps-PFR foi realizada de acordo com a metodologia descrita no trabalho de Venkatpurwar, Shiras e Pokharkar (2011). Uma determinada alíquota da solução estoque de PFR (10 mg mL^{-1}) foi adicionada a um volume apropriado de solução de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, sob aquecimento em banho térmico, seguido pela adição de gotas de uma solução de $\text{NaOH } 2 \text{ mol L}^{-1}$ até pH 11,0. A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética e ao abrigo da luz durante 2 horas. Após este intervalo de tempo, a suspensão resultante foi resfriada até temperatura ambiente, ainda sob agitação. As AuNps-PFR formadas foram acondicionadas em recipientes protegidos da luz, com a posterior realização das análises de DLS e de potencial Zeta (equipamento Malvern, modelo NanoZ590). Quando não utilizadas, as suspensões foram mantidas ao abrigo da luz e sob refrigeração a $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

A fim de que um menor tamanho de partícula fosse obtido, as variáveis experimentais concentração da solução de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ($[\text{AuCl}_4^-]$), concentração da solução de PFR ($[\text{PFR}]$) e a temperatura de reação (T) foram otimizadas por meio de um planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata no ponto central, sendo os resultados de tamanho (diâmetro) obtidos por DLS e tratados em *software* Statistica[®]7.0. Os valores dos níveis utilizados para cada variável são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Valores dos níveis¹ das variáveis empregados na otimização da síntese do nanocompósito AuNps-PFR via planejamento fatorial 2^3 .

Variável	(-)	(0)	(+)
$[\text{AuCl}_4^-]$ (mmol L^{-1})	2,50	3,00	3,50
$[\text{PFR}]$ (mg mL^{-1})	0,25	0,50	0,75
T ($^\circ\text{C}$)	50	60	70

¹Valores baseados no trabalho de Venkatpurwar, Shiras e Pokharkar (2011).

A suspensão de AuNps-PFR, sintetizada nas condições ótimas, foi caracterizada pelas espectroscopias na região do UV-VIS (equipamento Varian, modelo Cary 50) e de FTIR, difração de raios X (DRX) e por microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo (MEV-FEG). A obtenção dos espectros de FTIR foi realizada no modo de reflectância total atenuada (*attenuated total reflectance* – ATR) em espectrômetro

PerkinElmer (modelo Frontier), para filme *cast* da suspensão de AuNps-PFR depositado sobre substrato de silício previamente limpo em solução composta por $\text{H}_2\text{O}_2:\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (proporção 1:1:5), sob aquecimento a $100\text{ }^\circ\text{C}$. O filme foi obtido pelo gotejamento de uma alíquota da suspensão sobre o substrato, seguido pela secagem do mesmo sob fluxo de ar. Para fins de comparação, espectros de FTIR para um filme *cast* de uma solução de PFR 10 mg mL^{-1} foram também obtidos. Em ambos os casos, os espectros foram registrados na faixa de $4000\text{ a }500\text{ cm}^{-1}$.

As análises de MEV-FEG foram realizadas em microscópio eletrônico TESCAN (modelo MIRA3) operando a 10 ou 15 kV para filme *cast* da suspensão de AuNps-PFR, depositado diretamente no porta-amostra do equipamento (*stub*). As micrografias foram obtidas nas magnificações 6000, 8000, 10000, 12000, 15000 e 40000 vezes.

Os difratogramas de raios X foram obtidos em difratômetro Rigaku Ultima IV operando a 40 kV com corrente de 30 mA e com fonte de radiação $\text{Cu K}\alpha$ de comprimento de onda igual a $1,54\text{ \AA}$, para amostra das AuNps-PFR liofilizadas (em liofilizador Liotop, modelo L202). Os dados foram coletados para valores de 2θ na faixa de 10° a 80° , a uma velocidade de varredura igual a 2° min^{-1} .

4.4 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS ELETRODOS NÃO MODIFICADOS (EPCV) E MODIFICADOS (EPCV/PFR OU EPCV/AuNps-PFR)

A pasta de carbono vítreo não modificada foi preparada por meio da mistura e homogeneização de 80 mg de carbono vítreo em pó com um volume fixo de $25\text{ }\mu\text{L}$ de óleo mineral (Nujol[®]). A pasta foi então devidamente introduzida e compactada na extremidade do corpo do eletrodo com auxílio de uma placa de vidro, resultando no EPCV não modificado. O corpo de eletrodo empregado consiste em um tubo de Teflon[®], com cavidade para inserção da pasta de carbono medindo $0,3\text{ cm}$ de diâmetro e $0,3\text{ cm}$ profundidade, e com um disco de cobre conectado a um fio de níquel-cromo para contato elétrico.

A confecção dos eletrodos modificados (EPCV/PFR ou EPCV/AuNps-PFR) deu-se de maneira semelhante à dos não modificados, à exceção de que ao carbono vítreo em pó foi acrescentado um volume determinado de uma solução do polissacarídeo sulfatado PFR de concentração 10 mg mL^{-1} , no caso do EPCV/PFR, ou uma alíquota da

suspensão AuNps-PFR, no caso do EPCV/AuNps-PFR. Após homogeneização e secagem de tais misturas sob fluxo de ar, acrescentou-se para cada caso 25 μ L de óleo mineral, homogeneizando-se as misturas novamente. As pastas de carbono vítreo modificadas foram então inseridas no corpo de eletrodo, assim como no caso do EPCV não modificado. A limpeza dos eletrodos foi realizada a partir da renovação de sua superfície em papel e em placa de vidro. Quando não utilizados, os mesmos foram acondicionados à seco e à temperatura ambiente.

As medidas eletroquímicas com os eletrodos modificados e com os sem modificação foram todas realizadas à temperatura ambiente em uma célula convencional de capacidade 10 mL, à qual foram devidamente conectados três eletrodos, sendo empregados o EPCV/AuNps-PFR, o EPCV/PFR ou o EPCV sem modificação como eletrodos de trabalho, um eletrodo de Ag/AgCl como eletrodo de referência e um fio de platina como contra-eletrodo.

A caracterização morfológica dos materiais empregados na construção dos eletrodos foi realizada utilizando-se a técnica de MEV-FEG (microscópio TESCAN, modelo MIRA3). Foram obtidas micrografias para amostras de CV em pó, CV + PFR e CV + AuNps-PFR (proporções 1%), assim como para as respectivas pastas de carbono (proporções 1%, após adição de óleo mineral e homogeneização). As micrografias para cada um dos materiais foram obtidas na magnificação de 4000 vezes.

A maior parte dos experimentos para a caracterização eletroquímica dos eletrodos foram realizados por meio das técnicas de voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) utilizando-se como eletrólito suporte uma solução equimolar de $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ 0,010 mol L⁻¹ (sonda eletroquímica), preparada em tampão fosfato-salino (PBS) 0,15 mol L⁻¹ pH 6,5. As medidas de VC foram realizadas na faixa de -0,5 a +0,9 V, com uma velocidade de varredura de potencial igual a 50 mV s⁻¹. Para as medidas de EIE, uma onda senoidal de 10 mV foi aplicada sobre os eletrodos em potencial de circuito aberto, na faixa de frequências 10 kHz a 100 mHz. Os experimentos de ambas as técnicas foram conduzidos em um potenciostato/galvanostato Autolab (modelo PGSTAT 100), controlado pelos *softwares* GPES 4.9 (para VC) e FRA 4.9 (para EIE).

Para a determinação da área eletroativa dos eletrodos, foi utilizada uma solução de $K_3[Fe(CN)_6]$ 5,0 mmol L⁻¹ como eletrólito suporte, preparada em meio de KCl 0,1 mol L⁻¹, e então realizadas medidas de VC na faixa de -0,5 a +1,2 V. Foram empregados, em todos os experimentos de caracterização eletroquímica, o EPCV, o EPCV/PFR e o

EPCV/AuNps-PFR, a fim de que comparações entre as respostas apresentadas por cada um pudessem ser estabelecidas.

Inicialmente, por meio de VC e EIE foi realizado um estudo em diferentes valores de proporção PFR/CV, a fim de se avaliar a influência que apenas a PFR possui para resposta dos eletrodos. Os valores de proporção (m/m) testados foram: 0,5%, 1,0%, 3,0%, 5,0%, 7,0% e 10,0%, de modo que a proporção escolhida foi a utilizada nos experimentos subsequentes.

A influência do nanocompósito AuNps-PFR (nas condições de síntese otimizadas) na resposta dos EPCV foi também avaliada, porém neste caso por meio de comparações com o EPCV/PFR e com o EPCV sem modificação. A mesma quantidade de modificador foi utilizada na preparação tanto do EPCV/AuNps-PFR quanto do EPCV/PFR, com base nos resultados obtidos anteriormente no estudo de proporção PFR/CV.

A estabilidade de resposta voltamétrica de cada um dos eletrodos empregados no estudo anterior foi verificada na presença da sonda $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$, utilizando-se um potenciostato PalmSens[®], controlado pelo *software* PsTrace. Para isso, cem ciclos voltamétricos sucessivos na mesma faixa de potencial dos estudos anteriores foram obtidos para os três eletrodos, e a estabilidade de resposta de cada um foi avaliada por meio da reprodutibilidade nos valores das correntes de pico anódico (I_{pa}) e também nos valores do potencial de separação entre os picos anódico e catódico (ΔE_p).

4.5 DETERMINAÇÃO VOLTAMÉTRICA DE 5-FLUOROURACIL

O comportamento voltamétrico do 5-FU foi verificado por VC empregando-se o EPCV/AuNps-PFR, o EPCV/PFR e o EPCV não modificado, a fim de que a influência das AuNps-PFR sobre a resposta dos eletrodos frente ao analito fosse verificada. Para estes estudos, empregou-se uma concentração de 5-FU igual a $4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, sendo as medidas realizadas em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 8,0. Nestas mesmas condições e empregando o EPCV/AuNps-PFR 1%, um estudo em diferentes velocidades de varredura de potencial ($10\text{-}100 \text{ mV s}^{-1}$) foi realizado, para determinação da natureza do transporte de massa que governa a reação de oxidação do 5-FU sobre o eletrodo modificado.

Para avaliação do efeito da variação do pH do eletrólito de suporte sobre a resposta voltamétrica do EPCV/AuNps-PFR na presença do analito foi empregada a técnica de VPD. As medidas foram realizadas em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, em diferentes valores de pH (2,0 a 10,0), e na presença de uma concentração fixa de 5-FU igual a $4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Os parâmetros voltamétricos utilizados foram: tempo de aplicação do pulso de potencial (t_{pulso}) = 75 ms, velocidade de varredura (v) = 30 mV s^{-1} e amplitude do pulso de potencial (a_{pulso}) = 75 mV.

Uma vez estabelecido o pH ótimo para a determinação de 5-FU, avaliou-se a influência do eletrólito de suporte sobre a resposta do EPCV/AuNps-PFR na presença do analito na concentração de $4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Tais medidas foram realizadas utilizando-se VPD, assim como no experimento anterior. As seguintes soluções-tampão foram testadas (no pH escolhido): tampão PBS $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ (Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 e NaCl), tampão McIlvaine (ácido cítrico e Na_2HPO_4), tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ (H_3PO_4 , H_3BO_3 e CH_3COOH), tampão $\text{H}_3\text{BO}_3 \cdot \text{KCl} - \text{NaOH}$ e tampão fosfato (Na_2HPO_4 e NaH_2PO_4).

4.5.1 Otimização dos parâmetros da voltametria de pulso diferencial (VPD)

A fim de que uma maior sensibilidade de corrente fosse alcançada para a detecção de 5-FU com o EPCV/AuNps-PFR, os parâmetros da VPD (tempo de aplicação do pulso de potencial (t_{pulso}), velocidade de varredura (v) e amplitude do pulso de potencial (a_{pulso})) foram otimizados. As medidas foram realizadas em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, na presença de $4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de 5-FU. A otimização foi conduzida de maneira univariada, ou seja, fixando-se dois parâmetros nos valores considerados padrões e variando-se o terceiro em um faixa pré-determinada, de acordo com a Tabela 2. Os parâmetros da VPD otimizados foram então aplicados na obtenção das curvas analíticas para o fármaco em estudo.

Tabela 2 – Parâmetros instrumentais da VPD com as respectivas faixas de variação analisadas e valores padrões empregados para estudo de otimização para a determinação de 5-FU.

Parâmetro	Valor padrão ¹	Faixa estudada
Tempo de pulso (t_{pulso})	75 ms	10 ms – 100 ms
Velocidade de varredura (v)	30 mV s ⁻¹	10 mV s ⁻¹ – 100 mV s ⁻¹
Amplitude de pulso (a_{pulso})	75 mV	10 mV – 150 mV

¹Valores baseados nos trabalhos de Satyanarayana e colaboradores (2015) e de Zhan e colaboradores (2011).

4.5.2 Obtenção de curvas analíticas e estudo de interferentes biológicos

As curvas analíticas foram obtidas por VPD, na faixa linear de concentrações de 4,98 a 47,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de 5-FU, e empregando-se o EPCV/AuNps-PFR nas condições experimentais otimizadas nos itens anteriores. Os valores dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados segundo os critérios definidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2003). Parâmetros como precisão intra e inter-corrida, assim como a reprodutibilidade de preparação dos eletrodos foram também avaliados, com os resultados expressos na forma de porcentagem de desvio padrão relativo à média (%DPR).

O nível de exatidão dos EPCV/AuNps-PFR para a determinação de 5-FU foi avaliado por meio de ensaios de recuperação em eletrólito suporte puro. Em tais ensaios, uma quantidade conhecida do fármaco foi adicionada ao eletrólito, e sua determinação foi feita em seguida empregando-se o método da adição de padrão.

A influência de compostos que poderiam estar presentes em amostras biológicas (como soro sanguíneo ou urina) na resposta do EPCV/AuNps-PFR para o 5-FU foi também avaliada, empregando-se a VPD. Para isso, foram empregados interferentes como glicose, ácido ascórbico, ureia, albumina e íons Na^+ e K^+ , de modo que o efeito de cada um foi avaliado individualmente na resposta de corrente gerada por $8,26 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de 5-FU, por meio da comparação com a resposta do eletrodo para o fármaco na ausência dos interferentes. A influência simultânea de todos os compostos sobre a resposta do EPCV/AuNps-PFR foi também estudada; porém, neste caso, a partir da obtenção de curvas analíticas para o 5-FU, na faixa de $7,44 \times 10^{-5}$ a $1,96 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

4.5.3 Determinação de 5-FU em formulação farmacêutica comercial

A potencialidade de aplicação do EPCV/AuNps-PFR para a determinação de 5-FU em amostra de formulação farmacêutica foi estudada por meio da realização de ensaios de recuperação empregando amostras do medicamento FAULDFLUOR[®] (fabricante: Libbs[®]), na forma de solução injetável. Baseando-se na quantidade declarada pelo rótulo da formulação (50 mg mL⁻¹), uma solução estoque do medicamento de concentração 1×10^{-2} mol L⁻¹ foi preparada em água destilada, e então utilizada para a análise voltamétrica. Novamente, empregou-se o método da adição de padrão, com a adição de alíquotas de 30 mL de uma solução padrão de 5-FU de concentração $1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ à célula eletroquímica. Como eletrólito suporte, empregou-se o tampão BR 0,04 mol L⁻¹ em pH 8,0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO POLISSACARÍDEO SULFATADO PFR

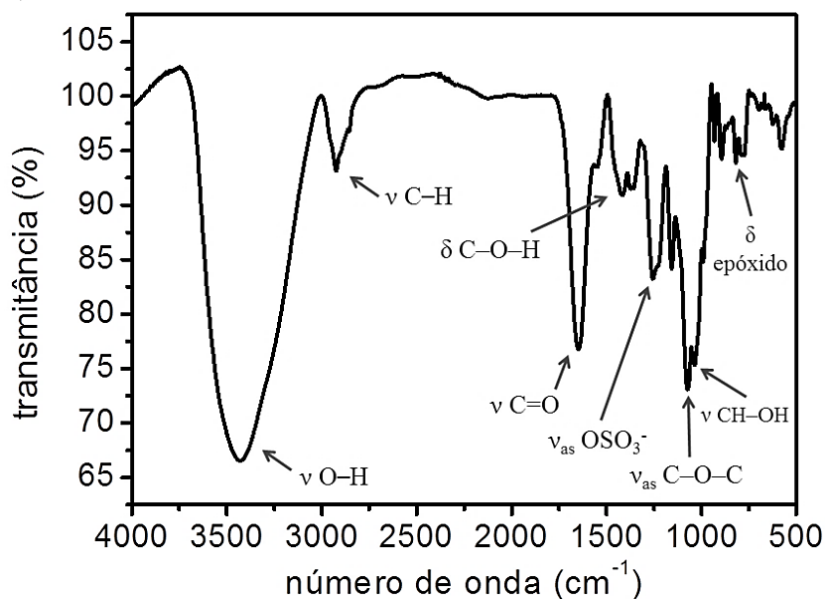
O polissacarídeo sulfatado utilizado neste trabalho foi obtido por extração aquosa a partir de alga Nori comercial segundo procedimento previamente descrito (NOSEDA et al., 2000). Devido ao fato da estrutura química dos polissacarídeos possuir uma elevada quantidade de grupos polares, os mesmos puderam ser facilmente obtidos por extração aquosa a partir das amostras de alga triturada. O aquecimento a 60 °C teve por finalidade a maximização do rendimento do processo e uma diminuição no tempo de extração.

Após o término das etapas de extração, purificação e liofilização da fração polissacarídica, verificou-se que a mesma apresentava uma leve coloração rósea, sendo que esta mesma coloração também foi observada na fração polissacarídica em solução. Esta característica pode ser atribuída à presença do pigmento vegetal denominado ficoeritrina, tipicamente presente nas algas vermelhas e passível de extração aquosa, mesmo que em condições amenas como as utilizadas neste trabalho. No entanto, não foram realizadas etapas posteriores para a remoção de tais pigmentos, tendo em vista a inexistência de evidências químicas de que tais contaminantes pudessem interferir nos resultados experimentais que se seguiram.

Os polissacarídeos extraídos mostraram-se solúveis em meio aquoso, fornecendo soluções cuja viscosidade aumentava com o aumento da concentração do mesmo. Isto está de acordo com o esperado, corroborado pelas propriedades geleificantes e espessantes apresentadas por esta classe de biomoléculas. (BATHIA et al., 2008).

O espectro de FTIR da amostra do polissacarídeo é apresentado na Figura 14, e foi obtido com o intuito de se verificar vibrações de grupos funcionais que pudessem caracterizar sua estrutura química.

Figura 14 – Espectro vibracional na região do IV (FTIR) de amostra do polissacarídeo sulfatado PFR em pastilha de KBr.



Como esperado, o espectro obtido apresentou grande similaridade com outros previamente descritos para polissacarídeos sulfatados padrão porfirana. (BHATIA et al., 2013; ZHANG, Q. et al., 2005; ZHANG, Z. et al., 2010; ZHOU et al., 2012). As principais bandas observadas no espectro acima e o modo vibracional atribuído a cada uma são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 – Principais bandas observadas no espectro de FTIR da PFR extraída, com as respectivas atribuições (ν : deformação axial; δ : deformação angular).

Modo vibracional	Frequência observada (cm^{-1})
ν O-H	3430
ν C-H	2924
ν C=O	1646
δ C-O-H	1421
ν_{as} OSO ₃ ⁻	1256
ν_{as} C-O-C	1156; 1073
ν CH-OH	1036
ν_{as} anel epóxido	931
δ anel epóxido	819

Verifica-se a presença de bandas em 3430 cm^{-1} referente ao estiramento do grupo O-H em ligação de hidrogênio, 1256 cm^{-1} devido ao estiramento assimétrico do grupo

SO_4^{2-} e 931 e 819 cm^{-1} referentes à deformação assimétrica e simétrica do anel epóxido do resíduo de 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose, respectivamente. Pode-se notar ainda a presença de uma banda forte em 1646 cm^{-1} , que pode ser atribuída ao estiramento do grupo C=O (PAVIA et al., 2009; PRETSCH; BÜHLMANN; BADERTSCHER, 2009; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005), presente nas extremidades das cadeias do polissacarídeo. Isto ocorre porque a PFR é constituída por resíduos de galactose, que apresentam um grupo aldeído exposto nas extremidades das cadeias poliméricas.

O espectro de RMN- ^{13}C da PFR é mostrado na Figura 15. A interpretação dos sinais apresentados foi realizada por comparação com espectros de PFR previamente reportados na literatura (BHATIA et al., 2013; CAVALCANTI et al., 2014; ZHANG, Q. et al., 2005; ZHANG, Z. et al., 2010; ZHOU et al., 2012). Os sinais identificados puderam confirmar a presença de cada um dos resíduos de galactose participantes das díades que constituem a estrutura da PFR. Pode-se destacar os sinais referentes aos carbonos anoméricos (C1) das díades: (i) [\rightarrow 3- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-3,6-anidro- α -L-Gal-1 \rightarrow] (G-A) em 102,19 e 98,21 ppm; e (ii) [\rightarrow 3- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)- α -L-Gal-6-sulfato-1 \rightarrow] (G'-L6S) em 103,49 e 101,25 ppm; e também o sinal do C6 sulfatado dos resíduos de α -L-Gal-6-sulfato em 67,36 ppm. A Tabela 4 apresenta os demais picos, com suas respectivas atribuições.

Figura 15 – Estrutura geral da PFR e espectro de RMN-¹³C totalmente desacoplado de amostra da mesma dissolvida em D₂O.

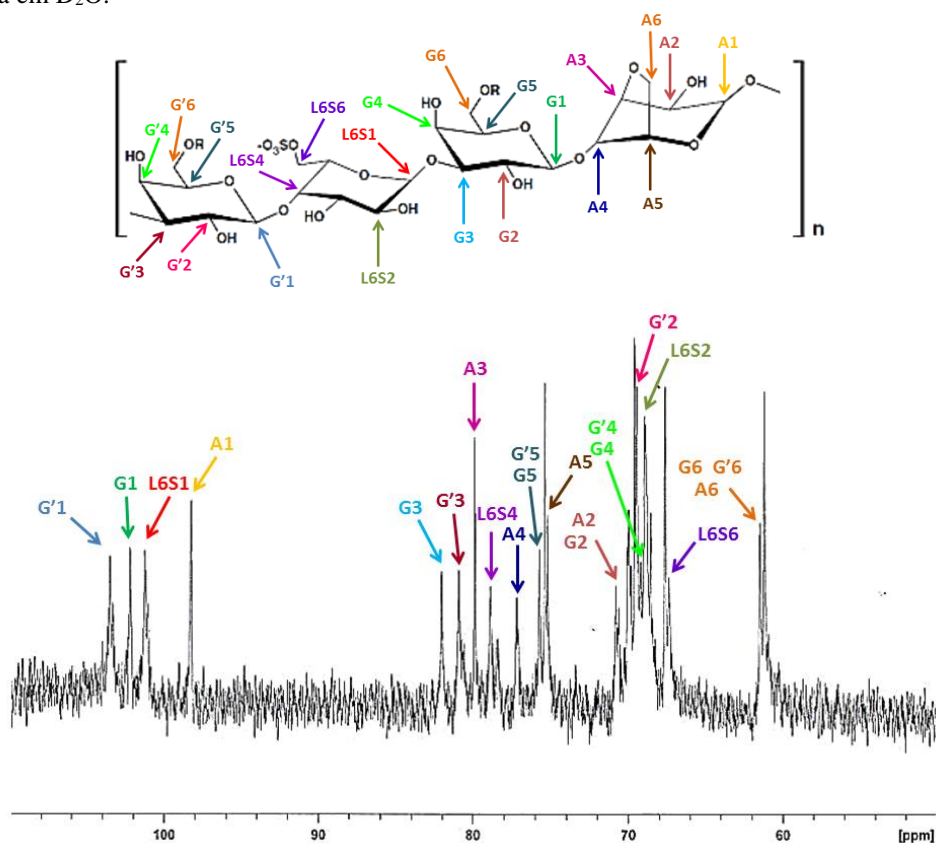


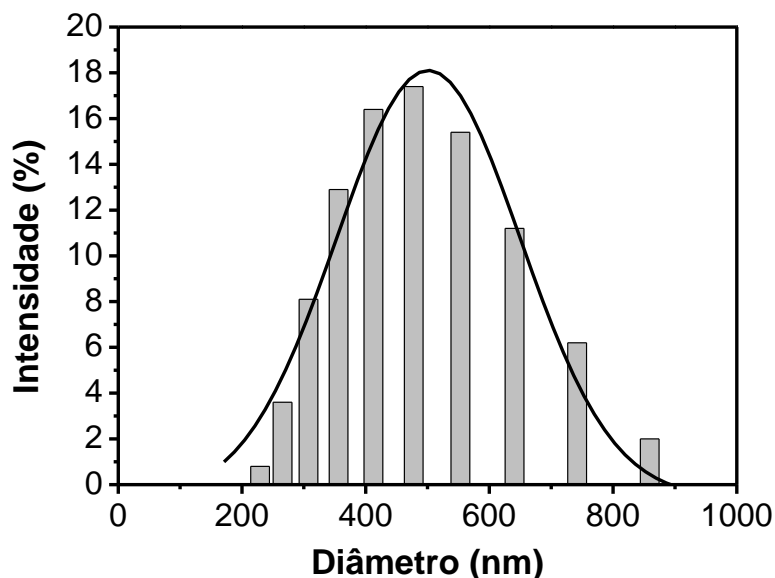
Tabela 4 – Deslocamentos químicos (δ) observados no espectro de RMN-¹³C para amostra de PFR extraída, com suas respectivas atribuições.

n° C	δ (ppm)	n° C	δ (ppm)
(G – A)			
G1	101,253	A1	102,197
G2	70,781	A2	70,781
G3	82,037	A3	79,879
G4	69,441	A4	77,188
G5	75,717	A5	75,196
G6	61,470	A6	61,470
(G' – L6S)			
G'1	103,490	L6S1	98,220
G'2	69,582	L6S2	68,919
G'3	80,908	L6S3	–
G'4	69,441	L6S4	78,872
G'5	75,717	L6S5	–
G'6	61,470	L6S6	67,364

Por meio da análise detalhada dos espectros de RMN (Figura 14 e Tabela 3) e de FTIR (Figura 15 e Tabela 4), pode-se inferir que o material estudado possui de fato a estrutura típica das porfiranas, pois apresentou vibrações e sinais característicos dos resíduos desta classe de polissacarídeos.

O perfil de distribuição de tamanho obtido por meio de análises de DLS é mostrado na Figura 16. Pode-se verificar que a PFR extraída possui uma elevada homogeneidade na distribuição de tamanho das cadeias biopoliméricas em suspensão, com 94,1% das mesmas com tamanho aproximado de 964,8 nm. O valor de potencial- ζ da suspensão resultou em -33,4 mV, como consequência da presença dos grupos OSO_3^- ligados à cadeia polissacarídica.

Figura 16 – Dispersão de tamanho de partícula de uma suspensão aquosa da PFR extraída (1 mg mL^{-1}), obtida por DLS.

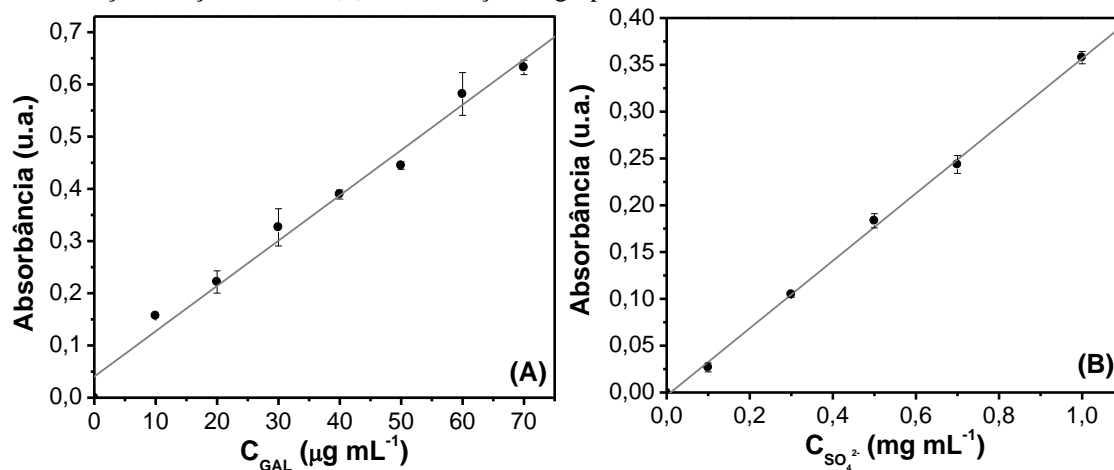


A fim de se determinar a composição química do material foram conduzidos ensaios para a determinação do teor de açúcar total e de grupos SO_4^{2-} . Dentre os métodos existentes para a quantificação de carboidratos, o mais empregado é o chamado método Fenol-Ácido Sulfúrico, proposto por Dubois e colaboradores (1956). O princípio básico deste método consiste na desidratação dos carboidratos contidos na amostra com ácido sulfúrico concentrado, produzindo derivados de furfural como produtos. A seguir, os derivados de furfural formados nesta primeira etapa reagem com fenol, formando compostos orgânicos que absorvem luz na região do visível, com um máximo de absorvância em 490 nm. (ALBALASMEH; BERHE; GHEZZEHEI, 2013).

Uma vez que o sulfato consiste no principal grupo funcional presente na estrutura das porfiranas e demais tipos de polissacarídeos sulfatados, sua determinação e quantificação consistem em um tópico relevante para a caracterização de tais biomoléculas. A determinação de sulfato nas amostras da PFR extraída foi realizada segundo método turbidimétrico proposto por Dodgson e Price (1962). Esta metodologia baseia-se inicialmente na hidrólise ácida do polissacarídeo, resultando na liberação dos íons SO_4^{2-} , que podem ser quantificados via turbidimetria como BaSO_4 .

As curvas analíticas, obtidas em triplicata, para as determinações de açúcar total e SO_4^{2-} com os padrões de galactose e Na_2SO_4 , respectivamente, são ilustradas na Figura 17.

Figura 17 – Curvas analíticas obtidas na determinação da composição química da PFR extraída: (A) determinação de açúcar total e (B) determinação de grupos SO_4^{2-} .



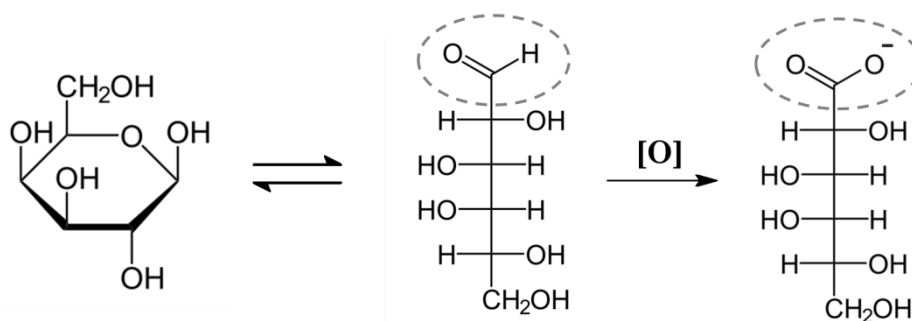
Para a determinação do teor de açúcar total, a reta fornecida pela regressão linear é descrita pela equação: $Abs = 0,04058 + 0,00867 C_{\text{GAL}}$ ($R = 0,992$); já para a determinação de SO_4^{2-} obteve-se: $Abs = -0,00339 + 0,36018 C_{\text{sulfato}}$ ($R = 0,999$). O teor de açúcar total e de grupos SO_4^{2-} encontrados a partir de tais regressões foram iguais a 82,8% e 11,9%, respectivamente. Ambos os valores mostraram-se condizentes com o esperado e aproximaram-se aos encontrados em trabalhos previamente reportados (CAVALCANTI et al., 2014; NOSEDA et al., 2000; ZHANG, Q. et al., 2005; ZHOU et al., 2012). Tais dados, juntamente com os obtidos a partir das caracterizações espectroscópicas, confirmaram a identidade química e a pureza do polissacarídeo extraído.

5.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS AuNps-PFR

O processo de redução dos íons AuCl_4^- a Au^0 (na forma de AuNps) pela PFR é possível devido ao fato de que as extremidades das cadeias do polissacarídeo possuem propriedades redutoras. De modo geral, monossacarídeos como a glicose e a galactose podem atuar como agentes redutores moderados em meio básico na presença de íons metálicos, uma vez que o carbono carbonílico de suas estruturas pode ser oxidado a um grupo carboxilato, gerando assim seus derivados oxidados conhecidos como ácidos aldônicos (ácido glucônico para a glicose e ácido galactônico para a galactose). Entretanto, isto é apenas possível quando o monossacarídeo encontra-se em sua forma linear, que existe nas soluções em equilíbrio com a forma cíclica. (NELSON; COX, 2002). Isto ocorre porque, na forma de cadeia fechada, o carbono anomérico (C1) está diretamente envolvido em uma ligação covalente intramolecular com o átomo de oxigênio da hidroxila ligada na posição C5. Desta forma, é necessário que a cadeia esteja aberta para que o grupo aldeído seja exposto e a oxidação possa ocorrer. Sabe-se que o meio básico favorece o deslocamento do equilíbrio em direção à forma de cadeia aberta, expondo o grupo aldeído e possibilitando desta forma a oxidação. (PEIXOTO et al., 2002).

A Figura 18 representa de modo simplificado o processo descrito, utilizando-se como exemplo o monossacarídeo β -D-galactopiranosose.

Figura 18 – Equação química simplificada do processo de oxidação do monossacarídeo β -D-galactopiranosose.



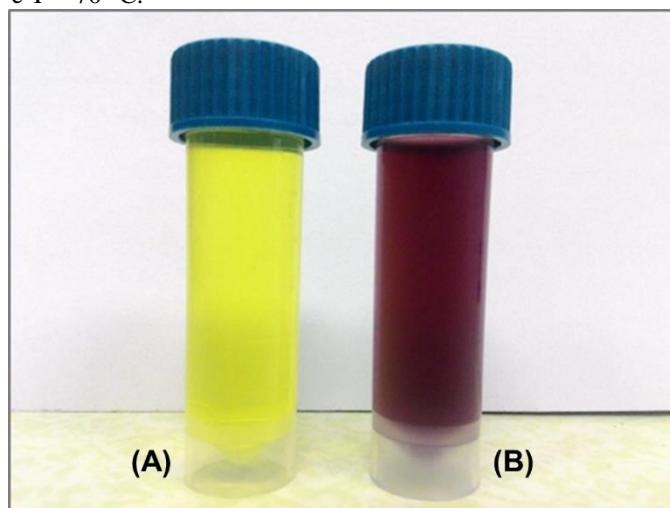
Fonte: O autor.

Quando o carbono anomérico está envolvido em uma ligação glicosídica, como ocorre nos oligossacarídeos e polissacarídeos, o resíduo correspondente torna-se não

reductor, uma vez que a forma linear da cadeia não é mais possível de ser formada. Nestes casos, apenas a extremidade da cadeia que possuir um carbono anomérico livre (isto é, não envolvido em uma ligação glicosídica), denominada extremidade redutora, será passível de sofrer oxidação. (NELSON; COX, 2002). Assim, na PFR, apenas as extremidades das cadeias é que estão envolvidas no processo de redução do complexo AuCl_4^- a Au^0 , com os resíduos restantes atuando provavelmente na estabilização das partículas formadas.

Visualmente, a formação das AuNps utilizando-se a PFR foi indicada pela mudança na coloração da solução, de amarelo (coloração característica do íon complexo AuCl_4^-) para vermelho (cor característica das AuNps em suspensão), como mostrado na Figura 19. Observou-se que a mudança na cor, e conseqüentemente a formação e estabilização das AuNps, não ocorreu de maneira instantânea. Após a adição da PFR e das gotas de NaOH, observou-se que a solução de AuCl_4^- sofreu descoloração, o que provavelmente é um indicativo do início do processo de redução dos íons AuCl_4^- a Au^0 . Após duas horas de reação, a solução apresentou coloração avermelhada, que variou de intensidade de acordo com as condições empregadas para a síntese, sugerindo a formação das AuNps estabilizadas pela PFR.

Figura 19 – (A) Solução aquosa a 5 mmol L^{-1} do complexo AuCl_4^- , empregado como precursor metálico para síntese das AuNps-PFR. (B) Suspensão de AuNps-PFR, obtida empregando-se $[\text{AuCl}_4^-] = 2,50 \text{ mmol L}^{-1}$; $[\text{PFR}] = 0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ e $T = 70 \text{ }^\circ\text{C}$.



O processo de aquecimento pode ser tomado como essencial para a formação das AuNps-PFR. Dado que o precursor metálico utilizado possui caráter ácido, pode-se sugerir que a alta temperatura possibilitou que algumas cadeias tenham sido hidrolisadas, mesmo em pequena extensão. Como resultado, tem-se a formação de cadeias menores, e,

por consequência, uma maior quantidade de extremidades redutoras passa a estar disponível para a reação. (RAVEENDRAN et al., 2015). Além disso, o meio básico favorece com que o resíduo da extremidade das cadeias esteja com o grupo aldeído disponível, assim como mencionado anteriormente. De fato, nos experimentos desenvolvidos, somente após a adição das gotas de NaOH à mistura reacional é que se observou a descoloração da solução, e início do processo de formação das AuNps.

Uma vez formadas, pode-se assumir que as AuNps são envolvidas e estabilizadas pelas cadeias de PFR. Esta estabilização pode ser resultante, principalmente, de uma combinação de efeitos estéricos e eletrostáticos exercidos pelo invólucro de polissacarídeo (estabilização eletrostérica). Os efeitos estéricos podem ser relacionados ao volume de polissacarídeo que envolve cada partícula, ao passo que os efeitos eletrostáticos relacionam-se à repulsão existente entre os grupos OSO_3^- . Assim, a combinação destes dois efeitos permitiu que a estabilização das partículas recém-formadas fosse alcançada, o que impediu que as mesmas sofressem coalescência.

Pode-se destacar ainda, a possibilidade de interação entre a PFR e os íons AuCl_4^- , antes da reação de redução propriamente dita acontecer. Sabe-se que a PFR e demais polissacarídeos aniônicos podem atuar na adsorção de íons metálicos, como uma consequência da presença de uma elevada quantidade de grupos funcionais negativamente carregados. (BHATIA et al., 2008; RAVEENDRAN et al., 2015; YE et al., 2015). É conhecido na literatura também que, mesmo em soluções aquosas, reações de troca de ligante podem ocorrer para o complexo AuCl_4^- , com a formação de espécies neutras e carregadas negativa e positivamente, como $\text{AuCl}_3(\text{H}_2\text{O})$, $\text{AuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{OH})$, $\text{AuCl}_2(\text{OH})_2^-$, $\text{AuCl}(\text{OH})_3^-$ e $\text{AuCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2^+$. (ĐUROVIĆ et al., 2014; MIRONOV; MAKOTCHENKO, 2009). Deste modo, as espécies positivamente carregadas do precursor de ouro, originadas em solução, podem ter inicialmente interagido com os grupos negativamente carregados OSO_3^- , e isto pode ter favorecido o início do processo de formação das AuNps. Além disso, considerando-se o fato de que os ligantes Cl^- são ligantes de campo fraco, é plausível afirmar que os grupos OSO_3^- presentes na estrutura do polissacarídeo podem ter, em um primeiro momento, complexado o precursor de ouro, o que também pode ter favorecido o processo de redução a Au^0 . (ALEXANDRIDIS, 2011).

Os resultados obtidos para a otimização da síntese do nanocompósito AuNps-PFR via planejamento fatorial 2^3 são mostrados na Tabela 5. Como já mencionado, as melhores condições de síntese foram estabelecidas levando-se em consideração a

obtenção de um menor tamanho de partícula, os quais foram estimados utilizando-se DLS.

Tabela 5 – Coeficientes de contraste para o planejamento fatorial 2^3 empregado para a otimização das condições de síntese das AuNps-PFR e respostas obtidas.

Ensaio	T	[AuCl ₄ ⁻]	[PFR]	Tamanho (nm)	Intensidade (%)
1	-	-	-	825,7	62,5
2	+	-	-	128,7	88,5
3	-	+	-	673,7	70,5
4	+	+	-	216,8	94,4
5	-	-	+	803,0	85,1
6	+	-	+	165,2	92,8
7	-	+	+	847,1	75,9
8	+	+	+	313,8	100,0
9	0	0	0	176,1	60,5
10	0	0	0	178,2	68,6
11	0	0	0	179,1	63,4

Nota: Valores dos níveis dos fatores: (i) T = (-) 50, (0) 60 e (+) 70 °C; (ii) [AuCl₄⁻] = (-) 2,50, (0) 3,00 e (+) 3,50 mmol L⁻¹; e (iii) [PFR] = (-) 0,25, (0) 0,50 e (+) 0,75 mg mL⁻¹.

Analisando-se os resultados obtidos, verifica-se que um menor tamanho de partícula é obtido nas condições correspondentes ao ensaio 2, de modo que as condições ótimas obtidas para a síntese das AuNps-PFR são: [AuCl₄⁻] = 2,5 mmol L⁻¹ (nível -); [PFR] = 0,25 mg mL⁻¹ (nível -); e T = 70 °C (nível +). A temperatura obtida corrobora com o valor empregado no trabalho de Venkatpurwar; Shiras e Pokharkar (2011). As concentrações de PFR e de AuCl₄⁻ otimizadas, por sua vez, diferem dos valores utilizados pelos autores (0,1 mg mL⁻¹ e 0,1 mmol L⁻¹, respectivamente). Este fato pode estar relacionado à utilização do planejamento fatorial, ferramenta que permite otimizar a resposta desejada de forma mais completa, uma vez que é possível avaliar os efeitos das interações existentes entre os fatores estudados. (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

O tratamento estatístico dado aos resultados obtidos com o planejamento fatorial (Tabela 6 e Diagrama de Pareto da Figura 20A) mostrou que as variáveis que obtiveram efeito significativo com 95% de confiança para a obtenção de um menor tamanho de partícula foram a [AuCl₄⁻], a [PFR] e a T (efeitos principais), assim como as interações

de segunda ordem $[\text{AuCl}_4^-] \times [\text{PFR}]$ e $[\text{AuCl}_4^-] \times \text{T}$, e também a interação de terceira ordem $[\text{AuCl}_4^-] \times [\text{PFR}] \times \text{T}$.

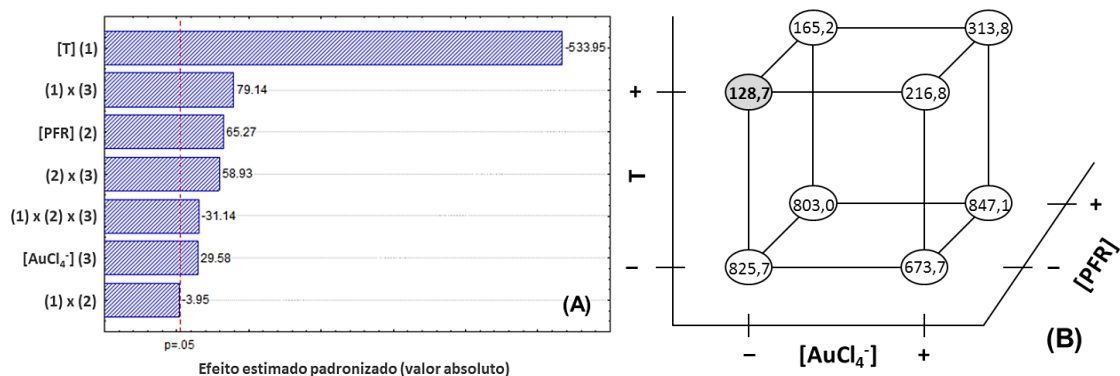
Tabela 6 – Efeitos principais e de interação calculados a partir dos resultados do planejamento fatorial 2^3 empregado para otimizar as condições de síntese das AuNps-PFR.

Estimativa do desvio	
$s = 1,54 \times t_{95\%, v=4} (4,303) = 6,62$	
Efeitos principais	Valor
$[\text{AuCl}_4^-]$	-32,20
[PFR]	71,05
T	-581,25
Interações de 2ª ordem	Valor
$[\text{AuCl}_4^-] \times [\text{PFR}]$	-64,15
$[\text{AuCl}_4^-] \times \text{T}$	86,15
[PFR] x T	4,30
Interação de 3ª ordem	Valor
$[\text{AuCl}_4^-] \times [\text{PFR}] \times \text{T}$	33,90

O fato do efeito de terceira ordem $[\text{AuCl}_4^-] \times [\text{PFR}] \times \text{T}$ ter mostrado ser significativo indica que os três fatores influenciam conjuntamente o tamanho das nanopartículas sintetizadas. Assim, para a obtenção de um menor tamanho de partícula, a interação entre as três variáveis deve ser levada em consideração, e os demais efeitos não devem ser interpretados individualmente. (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

O efeito $[\text{AuCl}_4^-] \times [\text{PFR}] \times \text{T}$ descrito pode ser avaliado na interpretação geométrica dos dados da Figura 20B, por meio da comparação entre o vértice $(+ - -)$, referente ao ensaio 2, e o vértice $(- + +)$, referente ao ensaio 7. Pode-se notar que, com a variação das três variáveis ao mesmo tempo, uma grande alteração no tamanho das AuNps-PFR é obtida (718,4 nm). Uma variação desta magnitude não é gerada em nenhuma outra comparação entre vértices opostos, o que confirma que a interação entre as três variáveis tem influência direta sobre o tamanho das partículas sintetizadas, e que as melhores condições para a síntese das AuNps-PFR são as correspondentes ao ensaio 2.

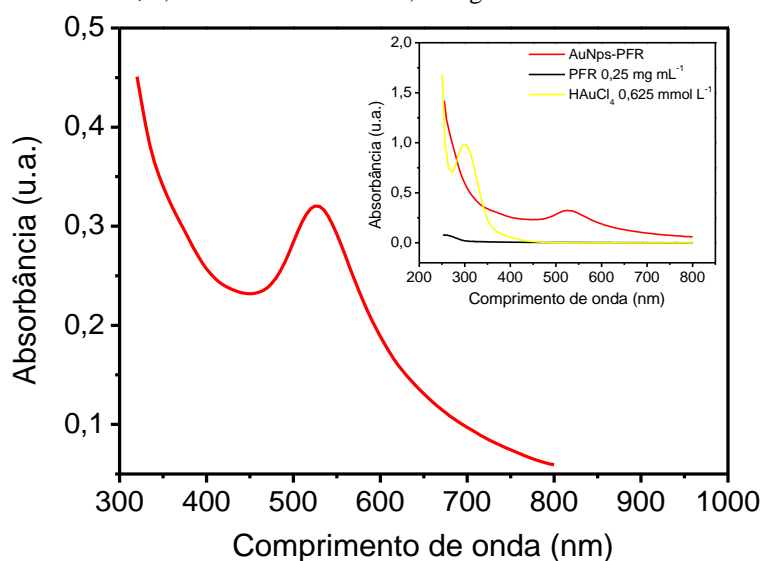
Figura 20 – (A) Diagrama de Pareto para os efeitos padronizados e (B) interpretação geométrica dos efeitos obtidos para a otimização da síntese das AuNps-PFR via planejamento fatorial 2^3 (o vértice do cubo correspondente às condições ótimas para a síntese é mostrado em destaque).



Uma vez que AuNps em suspensão apresentam o fenômeno da RPS ocorrendo na região do espectro visível, e que a frequência e a forma da banda plasmônica pode sugerir informações a respeito do tamanho e da morfologia das partículas (MUTHUVEL et al., 2014), a espectroscopia na região do UV-VIS consiste em uma ferramenta essencial para o estudo e caracterização deste tipo de nanomaterial. Além disso, é bastante útil para evidenciar a formação e estabilidade das partículas formadas.

O espectro na região do UV-VIS das AuNps-PFR sintetizadas nas condições ótimas estabelecidas pelo planejamento fatorial é mostrado na Figura 21, assim como o espectro da solução do complexo AuCl₄⁻ e da solução de PFR (gráfico inserido).

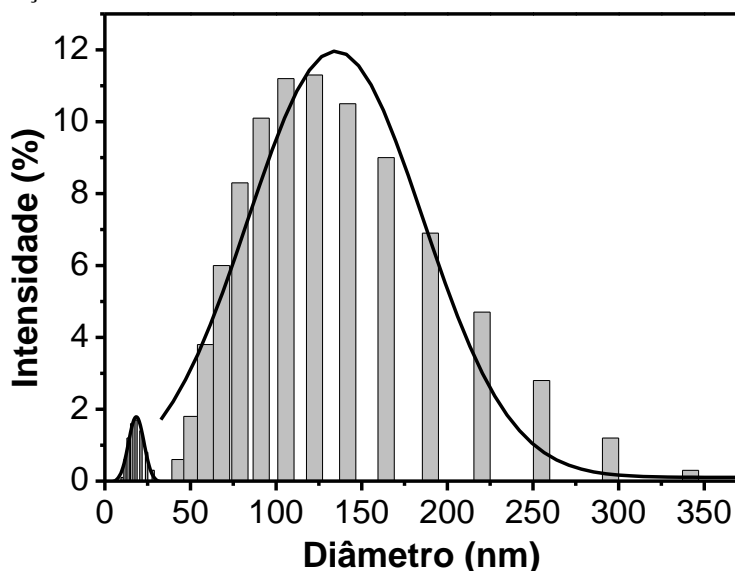
Figura 21 – Espectros de absorção na região do UV-VIS da suspensão de AuNps-PFR obtida nas condições otimizadas logo após o término da síntese. O gráfico inserido contém os espectros da suspensão de AuNps-PFR, e de soluções de HAuCl₄ 0,625 mmol L⁻¹ e PFR 0,25 mg mL⁻¹.



Verifica-se que a solução do complexo AuCl_4^- apresentou uma única banda dentro da faixa analisada, em 300 nm, a qual é referente às transições de transferência de carga ligante-metal (TCLM). (LIANG; WANG; LIU, 2010; JIANG; WANG; CHEN, 2007). A suspensão de AuNps-PFR, por sua vez, mostrou uma banda em 524 nm, a qual pode ser atribuída ao efeito de RPS das AuNps (banda *plasmon*). A presença desta banda não apenas denota a presença das AuNps, como também sugere que as partículas sintetizadas possuem, de fato, propriedades ópticas típicas deste tipo de nanomaterial. (FONG; YUNG, 2013; HUANG; EL-SAYED, 2010; NIESEN et al., 2010). Verifica-se também que a banda referente ao precursor AuCl_4^- desapareceu totalmente no espectro das AuNps-PFR, sugerindo que possivelmente todos os íons AuCl_4^- inicialmente presentes foram reduzidos a Au^0 .

O perfil de distribuição de tamanho de partícula da suspensão de AuNps-PFR sintetizada nas condições ótimas obtido por DLS é mostrado na Figura 22. Verifica-se que uma distribuição bimodal foi obtida, com intensidades iguais a 7,7 % e 88,5%, correspondentes aos diâmetros hidrodinâmicos médios de 17,88 e 128,70 nm, respectivamente. Pode-se notar pelas distribuições que os tamanhos das AuNps-PFR sintetizadas variaram no intervalo de 10,0 a 342,0 nm.

Figura 22 – Distribuição de tamanho de partículas obtida por DLS para a suspensão de AuNps-PFR sintetizada nas condições ótimas.

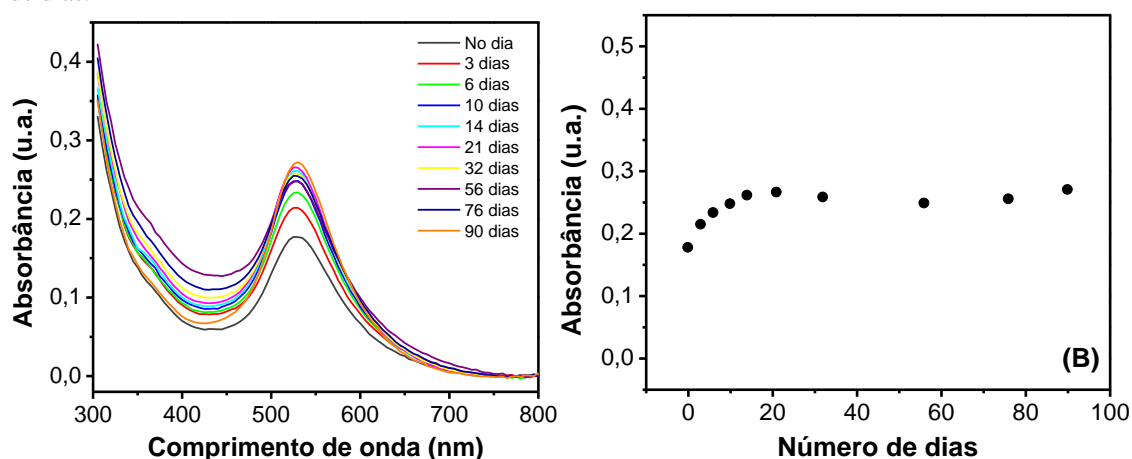


A estabilidade das suspensões de AuNps-PFR 1% sintetizadas foi avaliada por meio da determinação do valor do potencial- ζ de cada um dos ensaios realizados no planejamento fatorial. Em todos eles, o potencial- ζ resultou em um valor negativo, e

sempre menor que $-30,0$ mV. Para o ensaio realizado nas condições ótimas de síntese, obteve-se o valor de $-30,5$ mV. Isso confirma que as partículas sintetizadas possuem carga negativa, assim como já era esperado, em virtude do caráter aniônico da PFR. Uma vez que o valor encontrado excedeu o limite de potencial típico de suspensões instáveis ($-30,0$ mV a $+30,0$ mV) (MALVERN INSTRUMENTS, 2013; ŠEGOTA; HEIMER; TEŽAK, 2006), pode-se afirmar que as AuNps-PFR sintetizadas apresentam, pelo menos a princípio, uma boa estabilidade, com pequena tendência de sofrerem coalescência.

A estabilidade das AuNps-PFR a longo prazo foi acompanhada por meio de espectroscopia UV-VIS, com a realização de medidas periódicas em uma mesma suspensão. A estabilidade foi avaliada por meio de variações na banda *plasmon* das partículas sintetizadas, tendo-se analisado a alteração de seu perfil em relação à sua forma, intensidade e deslocamento. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 23.

Figura 23 – (A) Espectros de absorção na região do UV-VIS da suspensão de AuNps-PFR 1%, sintetizada nas condições otimizadas, ao longo de 3 meses. (B) Correlação entre os máximos de absorbância e o número de dias.



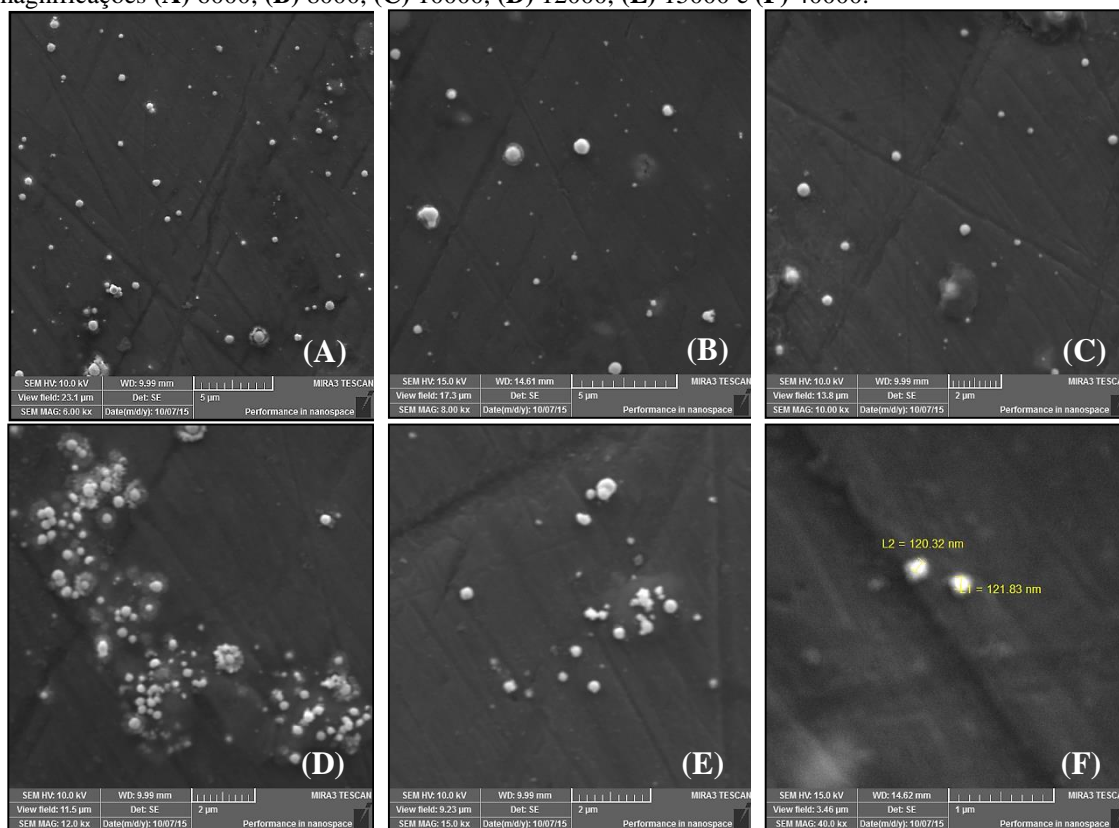
É possível verificar que não ocorreram variações significativas na forma da banda plasmônica das AuNps-PFR ao longo de três meses, uma vez que alargamentos ou deformações da mesma não foram observados neste intervalo de tempo. Além disso, pode-se notar um aumento de apenas $0,10$ nm no comprimento de onda máximo da banda plasmônica comparando-se o espectro obtido no primeiro dia com o obtido com 90 dias ($524,9$ nm para o primeiro dia e $525,0$ nm para 90 dias). Esta pequena variação pode ser uma consequência de um pequeno aumento observado por DLS para o tamanho médio das partículas sintetizadas ($128,7$ nm para $149,2$ nm, referentes ao pico de maior intensidade da distribuição). Entretanto, os resultados obtidos sugerem que as AuNps-PFR, dentro do período analisado, permaneceram relativamente estáveis em suspensão, o

que está de acordo com o resultado obtido para o potencial- ζ para a mesma (-30,5 mV). Confirma-se, deste modo, a eficiência da PFR como agente estabilizante das partículas sintetizadas.

A Figura 23 mostra ainda que um aumento de intensidade foi observado para a banda *plasmon* até cerca de três semanas, tendo permanecido praticamente estável após este intervalo de tempo. O aumento de intensidade observado pode ser um indicativo de que, até o tempo de 21 dias, a reação de formação das AuNps-PFR continuou ocorrendo lentamente, com a formação de novas partículas e reorganização daquelas já existentes.

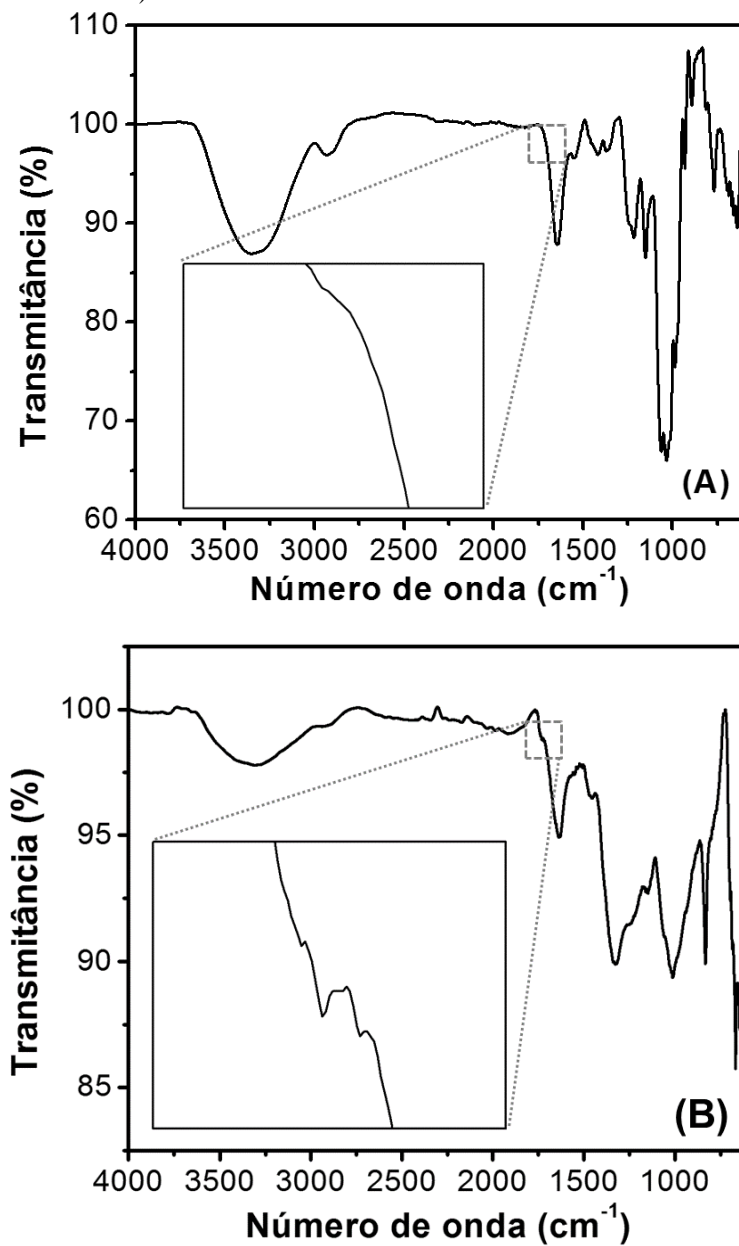
A caracterização morfológica das AuNps-PFR foi realizada por MEV-FEG, sendo que as micrografias obtidas são mostradas na Figura 24. Pode-se notar que as nanopartículas sintetizadas apresentaram-se na forma de nanoesferas, de superfície regular e sem rugosidade aparente (Figuras 23A a 23C). Verifica-se que existe certa variabilidade de tamanho entre as partículas presentes nas micrografias, o que corrobora com a dispersão obtida nos resultados de DLS. Observa-se ainda a existência de alguns agregados (*clusters*) de nanopartículas individuais, como pode ser visto principalmente nas Figuras 23D e 23E. Por fim, na Figura 23F, pode-se observar nanopartículas cujo tamanho se aproxima bastante do valor correspondente ao pico de maior intensidade encontrado por DLS (128,70 nm).

Figura 24 – Micrografias obtidas por MEV-FEG das AuNps-PFR, sintetizadas nas condições ótimas, nas ampliações (A) 6000, (B) 8000, (C) 10000, (D) 12000, (E) 15000 e (F) 40000.



A espectroscopia de FTIR foi empregada a fim de se verificar a existência de interações entre a PFR e as AuNps, comprovando assim o papel do polissacarídeo na síntese e na estabilização das referidas nanoestruturas. Os espectros de FTIR de filmes *cast* de uma solução de PFR 10 mg mL⁻¹ e do nanocompósito AuNps-PFR (condições de síntese otimizadas) obtidos sobre substratos de silício são mostrados na Figura 25, com as atribuições relativas listadas na Tabela 7.

Figura 25 – Espectros vibracionais na região do infravermelho de (A) filmes *cast* de PFR (10 mg mL⁻¹) e (B) das AuNps-PFR sobre substratos de silício (os gráficos inseridos mostram para cada caso uma ampliação da região destacada).



Na Tabela 7 são mostrados os valores de frequência das principais bandas observadas para ambos os espectros obtidos, assim como suas respectivas atribuições.

Tabela 7 – Principais bandas observadas no espectro de FTIR para filmes *cast* de PFR (10 mg mL⁻¹) e de AuNps-PFR, com as respectivas atribuições.

Frequência (cm ⁻¹)		Modos vibracionais*
PFR	AuNps-PFR	
3352	3309	v O–H
2930	2900	v C–H
–	1730; 1719	v _{ác} C=O
1647	1637	v C=O
1420	1454	δ C–O–C
1217	1250	v _{as} OSO ₃
1152	1150	v _{as} C–O–C
1063	1062	v _s C–O–C
1035	1014	v CH-OH
932	941	v _{as} anel epóxido
814	834	δ anel epóxido

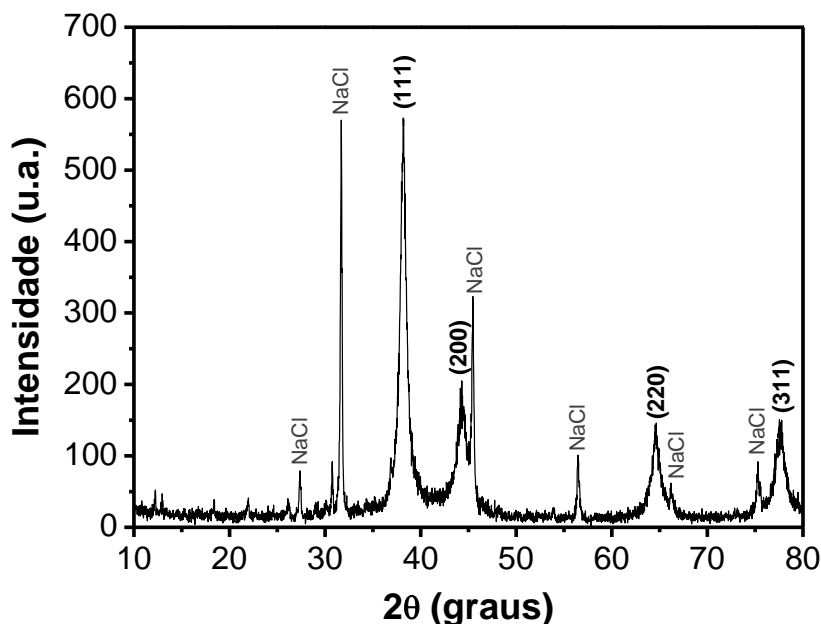
*v: deformação axial; δ: deformação angular; s: simétrica; as: assimétrica; ác: ácido carboxílico

Verifica-se que as bandas apresentadas pelas AuNps-PFR podem ser atribuídas às mesmas vibrações apresentadas pela estrutura da PFR. Entretanto, deslocamentos nos valores de frequência podem ser observados, evidenciando que existem interações entre a PFR e as AuNps. (BALAVANDY et al., 2014; MAITY; SEM; ISLAM, 2012). Verificou-se um deslocamento relativamente grande para as bandas referentes aos grupos O-H e OSO₃⁻, evidenciando que os mesmos podem estar envolvidos no processo de formação das AuNps-PFR. (VENKATPURWAR; SHIRAS; POKHARKAR; 2011).

Verifica-se no espectro obtido para as AuNps-PFR o surgimento de bandas de baixa intensidade em 1730 e 1719 cm⁻¹, que podem ser atribuídas à vibração de estiramento do grupo C=O de ácidos carboxílicos (PAVIA et al., 2009; PRETSCH; BÜHLMANN; BADERTSCHER, 2009; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005), os quais são produtos da reação de redução do complexo [AuCl₄⁻] a AuNps. Observações semelhantes foram verificadas nos trabalhos de Sem, Maly e Islam (2013) (síntese de nanopartículas de ouro empregando polissacarídeo (glucano) extraído de cogumelos comestíveis), de Ghaseminezhad, Hamedi e Shojaosadati (2012) (síntese de nanopartículas de prata empregando amido e o sobrenadante proveniente de uma cultura de fungos da espécie *Fusarium oxysporum*) e de Muthuvel e colaboradores (2014) (síntese de nanopartículas de ouro empregando extrato de folhas de erva-moura).

A natureza cristalina das AuNps-PFR sintetizadas foi confirmada pela realização de análise de DRX das mesmas, após liofilização. O difratograma resultante é apresentado na Figura 26.

Figura 26 – Difratograma de raios X das AuNps-PFR após liofilização, com atribuição dos picos observados.



Pode-se verificar a presença de picos em valores de 2θ iguais a $38,18^\circ$, $44,30^\circ$, $64,66^\circ$ e $77,54^\circ$, os quais são referentes aos planos (111), (200), (220) e (311), respectivamente, para a estrutura cúbica de face centrada apresentada pelo Au metálico. (PANDEY; GOSWAMI; NANDA, 2013; SEM; MAITY; ISLAM, 2013; MAITY; SEM; ISLAM, 2012). Nota-se que os picos descritos apresentaram-se relativamente alargados, como é típico para cristais de dimensões nanométricas. (BLOSI et al., 2012; VENKATPURWAR; SHIRAS; POKHARKAR, 2011). Além dos picos característicos para o Au, foram identificados no difratograma picos referentes à presença de NaCl na amostra de AuNps-PFR analisada. (BLOSI et al., 2012). Este comportamento pode ser justificado pela provável formação de cristais do sal mencionado durante o processo de liofilização, os quais ficaram aderidos às nanopartículas. A presença dos íons Na^+ pode ser tomada como consequência da adição de NaOH durante a síntese das AuNps-PFR para ajuste do pH da mistura reacional, ao passo que os íons Cl^- foram possivelmente originados como produtos do processo de redução do complexo AuCl_4^- a Au^0 .

O tamanho médio de cristalito das AuNps-PFR contidas na amostra analisada por DRX foi estimado utilizando-se a equação de Scherrer, que relaciona o alargamento dos picos de difração à dimensão dos cristalitos presentes por meio da razão:

$$D = \frac{K\lambda}{B \cos\theta} \quad (1)$$

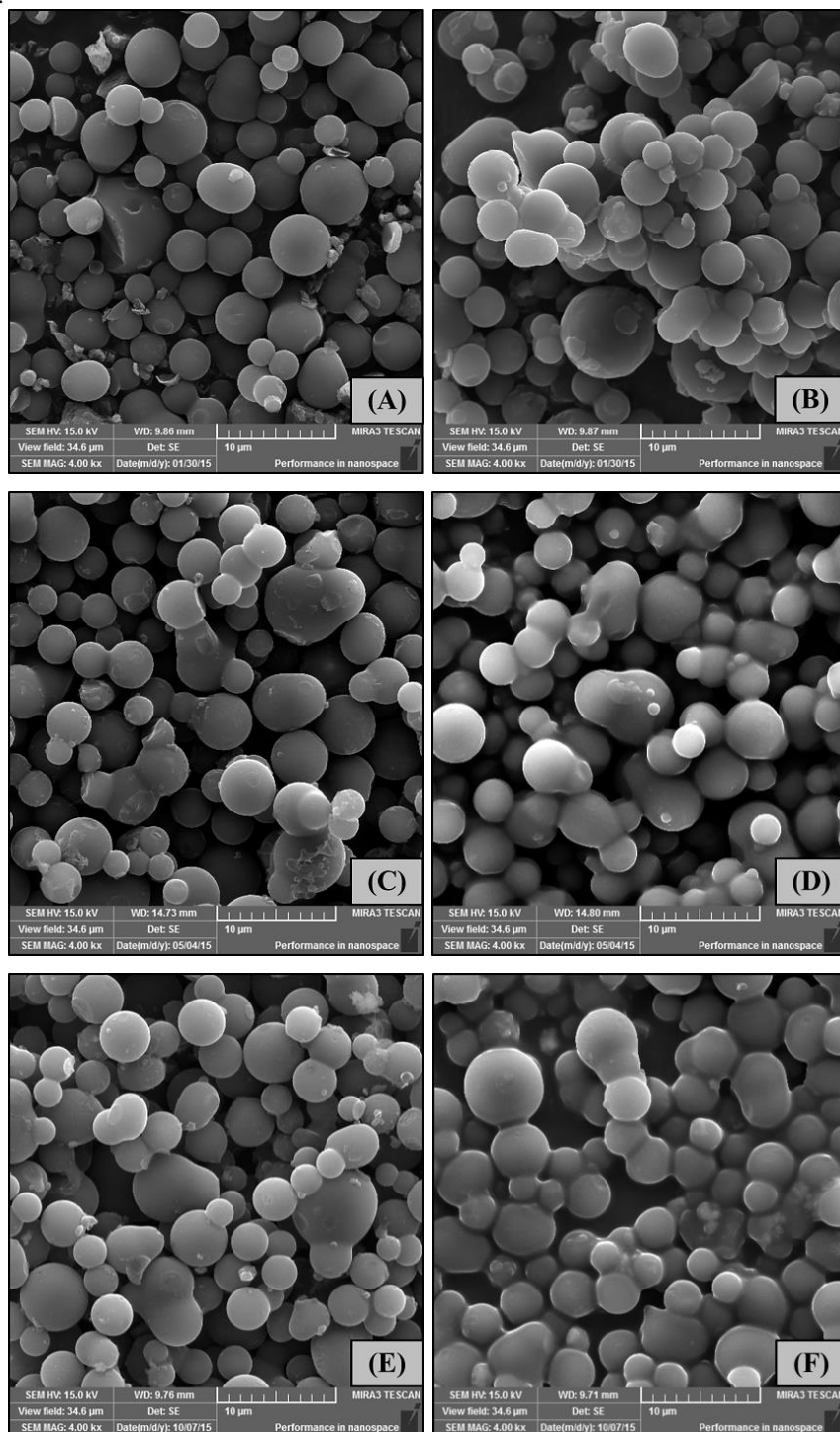
onde D é o tamanho médio dos cristalitos (em metros), K é uma constante numérica adimensional que depende da forma do cristalito (geralmente 0,93), λ é o comprimento de onda da radiação incidente (em metros), B é a largura à meia altura do pico mais intenso do difratograma subtraída da largura à meia altura do pico devido a efeitos instrumentais (em radianos) e θ é o ângulo de Bragg do referido pico (em graus). (BURTON et al., 2009; HOLZWARTH; GIBSON, 2011; PATTERSON, 1939). Empregando-se os parâmetros referentes ao pico do plano (111), o tamanho médio calculado para os cristalitos de AuNps-PFR foi igual a 28,5 nm. A discrepância observada entre este valor e o diâmetro obtido por DLS (128,7 nm) já era esperada, uma vez que uma medida de DLS fornece o tamanho hidrodinâmico das partículas em suspensão, enquanto que o resultado fornecido pela equação de Scherrer consiste em uma estimativa do tamanho dos cristalitos formadores de cada uma das partículas.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS EPCV MODIFICADOS

5.3.1 Caracterização morfológica

As micrografias obtidas por MEV-FEG de cada um dos materiais estudados são mostradas na Figura 27. Para melhor comparação, as micrografias são apresentadas nas mesmas magnificações, para todas as amostras.

Figura 27 – Micrografias obtidas por MEV-FEG, em magnificação de 4000 vezes, para: (A) CV em pó, (B) pasta de CV não modificada, (C) CV + PFR (proporção 1%), (D) pasta de carbono vítreo modificada com PFR (proporção 1%), (E) CV + AuNps-PFR (proporção 1%) e (F) pasta de carbono vítreo modificada com AuNps-PFR.

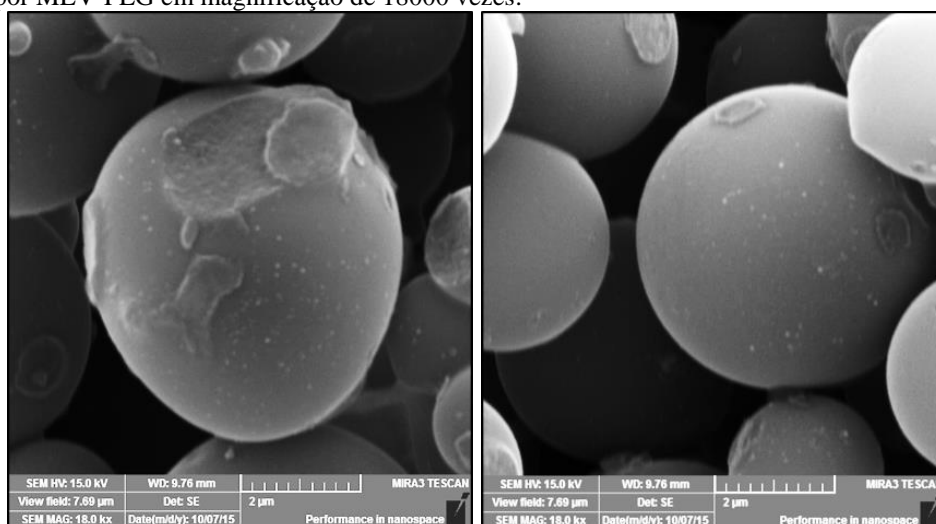


As micrografias do CV em pó (Figura 27A) mostraram que a morfologia do mesmo é caracterizada por esferas não porosas de superfície regular, de tamanhos variados da ordem de micrômetros. Tais observações puderam ser identificadas também na micrografia correspondente à pasta de CV não modificada (Figura 27B), à exceção de

que neste caso as esferas de CV mostraram um aspecto agregado, como uma consequência da presença do agente aglutinante, que une mecanicamente as partículas do material. Após a incorporação da PFR, as esferas de CV adquiriram um aspecto levemente rugoso, não mostrando a superfície regular observada para as amostras anteriores (Figura 27C). Tais variações podem ser justificadas com base na provável deposição de uma espécie de filme de PFR sobre as partículas de CV, fazendo com que a superfície das mesmas apresentasse as variações observadas. O papel aglutinante do óleo mineral pode ser novamente verificado na micrografia da pasta de carbono modificada com PFR (Figura 27D), onde as esferas de CV aparecem novamente mais agregadas. A superfície das esferas, neste caso, apresentou visualmente uma menor rugosidade do que no caso anterior, provavelmente devido à presença do óleo mineral na superfície das mesmas.

As micrografias da Figura 27E e 27F não mostraram alterações significativas na morfologia do material, podendo-se notar um aspecto semelhante ao obtido para as amostras de CV modificadas somente com a PFR (Figuras 27C e 27D). Entretanto, micrografias obtidas na magnificação de 18000 vezes revelaram a presença de pequenos pontos sobre as esferas de CV, os quais podem ser atribuídos à presença das AuNps-PFR (Figura 28). Comprova-se, desta forma, a adsorção do nanomaterial à superfície do carbono.

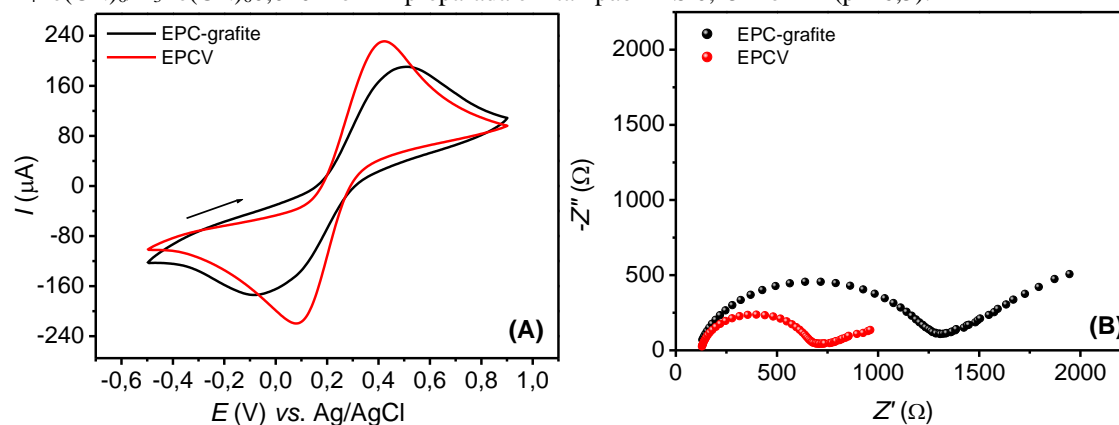
Figura 28 – Micrografias de amostra de carbono vítreo modificada com AuNps-PFR (proporção 1%), obtidas por MEV-FEG em magnificação de 18000 vezes.



5.3.2 Caracterização eletroquímica

É conhecido da literatura que o material de carbono mais convencionalmente utilizado para a confecção de eletrodos de pasta de carbono é a grafite em pó. Deste modo, a fim de se verificar as diferenças entre o comportamento eletroquímico de eletrodos de pasta de carbono à base de grafite (EPC-grafite) com o comportamento de eletrodos preparados com carbono vítreo (EPCV), um estudo comparativo foi realizado com ambos os eletrodos utilizando-se VC e EIE, na presença da sonda eletroquímica $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 29.

Figura 29 – (A) Voltamogramas cíclicos e (B) espectros de impedância eletroquímica (diagramas de Nyquist) do EPC-grafite e do EPCV, ambos sem modificação, em meio de solução equimolar de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0,010 mol L⁻¹ preparada em tampão PBS 0,15 mol L⁻¹ (pH 6,5).



A partir dos voltamogramas cíclicos da Figura 29A pode-se verificar que ambos os eletrodos apresentaram picos de corrente para o processo redox típico da sonda eletroquímica ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-} \leftrightarrow \text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$). Entretanto, o EPCV apresentou maiores valores de corrente de pico anódico (I_{pa}) e de pico catódico (I_{pc}) para ambos os processos comparando-se com os valores obtidos para o EPC-grafite, além de ter mostrado também um menor valor de separação entre os potenciais de pico (ΔE_p) em comparação ao observado para este último (Tabela 7). Pode-se afirmar, portanto, que para o EPCV a cinética de transferência eletrônica é mais efetiva, o que resultou em uma maior condutividade e também em uma maior reversibilidade para o processo (BRETT; BRETT, 1993) em comparação ao EPC-grafite. Uma possível justificativa para tal comportamento pode ser dada com base no fato de que o EPCV combina em si a elevada reatividade eletroquímica das esferas de carbono vítreo com as vantagens apresentadas

por eletrodos compósitos de pasta de carbono. (WANG, J. et al., 2001). Resultados semelhantes, em que o desempenho eletroquímico de EPCVs é superior ao de EPC-grafite, podem ser encontrados também nos trabalhos de Nemcova; Berek e Zima (2012), de Ricci e colaboradores (2003) e de Wang, J. e colaboradores (2001).

Os diagramas de Nyquist resultantes para os eletrodos mostraram duas regiões distintas (Figura 29B): primeiramente, um semicírculo a altas frequências, correspondente ao processo de transferência eletrônica (ou de carga) da molécula sonda na superfície dos eletrodos, e por fim uma região linear a frequências mais baixas, que é atribuída ao processo de difusão das espécies $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$. (HU; HU, 2004; ZHANG, Y.; ZHENG, J. B., 2007; ZHENG; ZHOU, 2007).

A literatura afirma que o diâmetro do semicírculo obtido é igual à resistência à transferência eletrônica mencionada anteriormente (R_{ct}) (BARD; FAULKNER, 2001; BRETT; BRETT, 1993). Verifica-se que o diâmetro do semicírculo obtido para o EPC-grafite foi maior do que o obtido para o EPCV, sugerindo que a resistência à transferência de carga para o carbono vítreo foi menor comparado ao observado para o grafite. Tais resultados corroboram com os obtidos anteriormente por VC, e podem ser melhor compreendidos com base nos valores de R_{ct} obtidos para cada caso, os quais são apresentados na Tabela 8. A menor resistência à transferência de carga verificada para o EPCV justifica, portanto, a utilização do carbono vítreo para a fabricação de eletrodos. Além disso, os resultados dos experimentos realizados corroboram com os valores de condutividade elétrica característicos para os dois materiais ($2,12 \times 10^3 \text{ S m}^{-1}$ para o grafite e $70,0 \times 10^3 \text{ S m}^{-1}$ para o carbono vítreo). (CARBON, 2016; MARINHO et al., 2012).

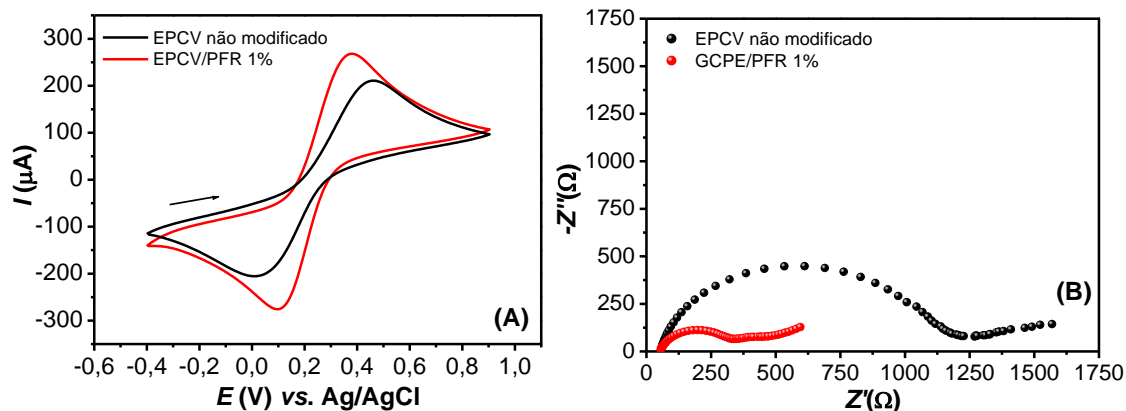
Tabela 8 – Valores de I_{pa} , I_{pc} , ΔE_p e R_{ct} obtidos em estudo comparativo para o EPC-grafite e para o EPCV.

Eletrodo	I_{pa} (μA)	$-I_{pc}$ (μA)	E_{pa} (mV)	E_{pc} (mV)	ΔE_p (mV)	R_{ct} (Ω)
EPC-grafite	142,50	118,95	505,8	-80,1	585,9	1181,08
EPCV	214,43	147,07	422,8	81,0	341,8	569,30

Uma vez comprovadas as melhores propriedades eletroquímicas do EPCV, realizou-se na sequência um estudo comparativo entre o EPCV não modificado e o EPCV/PFR (numa proporção PFR:CV igual a 1%), a fim de se avaliar a influência que o polissacarídeo possui sobre a resposta eletroquímica dos mesmos. As medidas também

foram realizadas por VC e EIE, em meio da sonda $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, e os resultados obtidos para cada eletrodo são apresentados na Figura 30.

Figura 30 – (A) Voltamogramas cíclicos e (B) espectros de impedância eletroquímica do EPCV/PFR 1% e do EPCV sem modificação, em meio de solução equimolar de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0,010 mol L⁻¹ preparada em tampão PBS 0,15 mol L⁻¹ (pH 6,5).



Na Tabela 9 encontram-se os valores obtidos neste estudo para cada eletrodo e para os parâmetros I_{pa} , I_{pc} , ΔE_p e R_{ct} . É possível observar que o EPCV/PFR 1% apresentou maiores valores de I_{pa} e I_{pc} para o processo redox da sonda eletroquímica comparando-se com os valores obtidos para o EPCV sem modificação, além de um menor valor de ΔE_p , o que sugere uma maior reversibilidade no processo. Além disso, verifica-se que o diâmetro do semicírculo obtido para o EPCV sem modificação foi maior do que o obtido para o EPCV/PFR 1%, sugerindo que os eletrodos não modificados apresentam uma maior resistência à transferência de carga do que aqueles onde a PFR está presente.

Tabela 9 – Parâmetros voltamétricos e valores de R_{ct} observados para o EPCV não modificado e para o EPCV/PFR 1%.

Eletrodo	I_{pa} (μA)	$-I_{pc}$ (μA)	E_{pa} (mV)	E_{pc} (mV)	ΔE_p (mV)	R_{ct} (Ω)
EPCV	165,61	132,95	550,0	-110,0	650,0	1098,13
EPCV/PFR 1%	284,49	263,85	420,0	50,0	370,0	292,68

As melhores respostas observadas para o EPCV/PFR 1% podem ser uma consequência da elevada quantidade de cargas presentes no polissacarídeo (CAVALCANTI et al., 2014; ZHANG et al., 2005), o que faz com que o mesmo atue de modo similar aos polieletrólitos convencionais sintéticos (CROUZIER; BOUDOU; PICART, 2010; RAVEENDRAN et al., 2013) isto é, facilitando os processos de

transferência eletrônica na interface eletrodo-solução. (ROTARIU; ISTRATE; BALA, 2014). Uma possível justificativa para este comportamento pode ser dada com base no fato de que a modificação da pasta com a PFR pode proporcionar ao material um maior caráter hidrofílico, devido à grande quantidade de hidroxilas e grupos sulfato existentes na estrutura do polissacarídeo. A presença de tais grupos pode ter modificado as propriedades interfaciais da superfície do eletrodo, de modo a favorecer a chegada da sonda eletroquímica e facilitar a transferência eletrônica. (RICE; GALUS; ADAMS, 1983). As melhores respostas de corrente obtidas para o eletrodo modificado são também um indicativo de que a presença do polissacarídeo na pasta pode ter aumentado a condutividade do material. A combinação destes dois fatores, provavelmente, foi a responsável por facilitar o processo de transferência de elétrons e melhorar o desempenho eletroquímico do EPCV/PFR.

Uma vez comprovado o fato de que as propriedades eletroquímicas do EPCV são melhoradas com a incorporação da PFR à pasta, realizou-se um estudo com eletrodos contendo diferentes proporções PFR:CV (m/m) a fim de se investigar a influência que a quantidade de PFR presente no eletrodo possui frente à resposta do mesmo. Os valores de proporção em massa PFR:CV estudados foram: 0,5%, 1,0%, 3,0%, 5,0%, 7,0% e 10,0%. Os estudos foram conduzidos novamente por VC e EIE, nas mesmas condições experimentais que as análises anteriores. Os resultados obtidos são ilustrados na Figura 31 e na Tabela 10.

Figura 31 – (A) Voltamogramas cíclicos e (B) espectros de impedância eletroquímica de EPCV's/PFR em diferentes proporções, em meio de solução equimolar de $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ 0,010 mol L⁻¹ preparada em tampão PBS 0,15 mol L⁻¹ (pH 6,5).

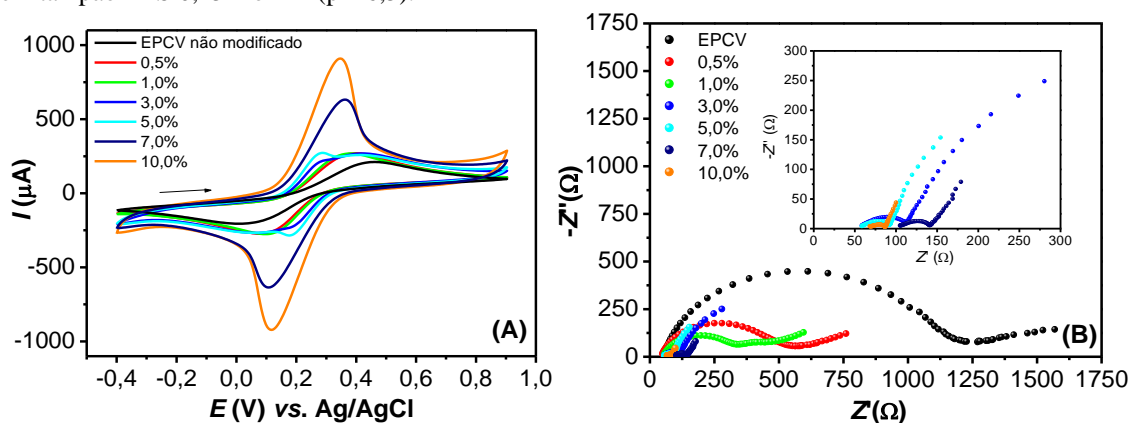


Tabela 10 – Valores de I_{pa} , I_{pc} e R_{ct} obtidos por VC e EIE para o estudo de proporção do EPCV/PFR.

Proporção (%)	I_{pa} (μA)	$-I_{pc}$ (μA)	R_{ct} (Ω)
EPCV	200,40	200,12	887,00
0,5	290,00	289,32	454,94
1,0	295,10	292,40	292,68
3,0	253,19	264,93	63,98
5,0	279,15	285,44	40,57
7,0	586,68	599,30	37,98
10,0	853,09	878,78	20,22

Os voltamogramas e espectros de impedância obtidos confirmaram que a PFR influencia significativamente a resposta dos eletrodos, uma vez que o aumento na proporção PFR:CV foi acompanhado por um incremento nas correntes de pico e um progressivo decréscimo no valor de R_{ct} , como pode ser visto na Figura 30 e na Tabela 9. Tais observações ajudam a sustentar a explicação fornecida anteriormente, que a incorporação da PFR à pasta pode facilitar a transferência eletrônica. Dessa forma, pode-se concluir que de fato a PFR influencia de modo positivo a resposta dos EPCV.

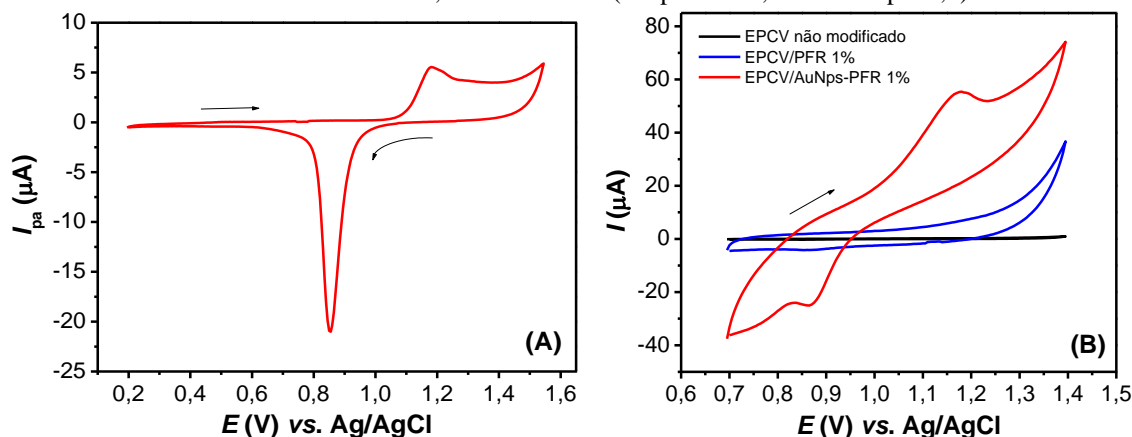
Apesar dos maiores valores de corrente e menores valores de R_{ct} obtidos para os eletrodos modificados com maiores proporções de PFR (7,0 e 10,0%), tais eletrodos não apresentaram uma resposta estável. Isto pode ter sido uma consequência da absorção de água por parte do material eletrodico, aliada à lixiviação do modificador para o eletrólito suporte, dada sua elevada solubilidade em meio aquoso. Assim, para a realização dos experimentos posteriores foi selecionado o eletrodo com proporção igual a 1%, uma vez que nesta proporção um incremento de corrente considerável foi obtido, assim como um decréscimo satisfatório no valor de R_{ct} comparando-se com o EPCV não modificado. Neste valor de proporção, o EPCV/PFR apresentou maior estabilidade de resposta comparando-se com os eletrodos modificados com maiores quantidades de PFR. Além disso, uma menor quantidade de modificador empregada tem como consequência eletrodos de preparação mais simples e também mais viáveis economicamente.

Uma vez estabelecido o valor da proporção PFR:CV, deu-se início aos estudos de caracterização eletroquímica para os eletrodos modificados com o nanocompósito AuNps-PFR. Para a preparação do EPCV/AuNps-PFR, optou-se por empregar uma quantidade de AuNps-PFR de modo a resultar no valor de proporção otimizado

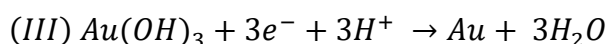
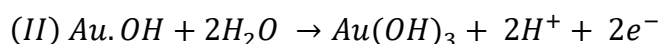
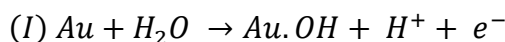
anteriormente para a PFR (1%). Avaliou-se, deste modo, o efeito da presença das AuNps-PFR sobre a resposta dos eletrodos.

Inicialmente, a presença das AuNps-PFR nos EPCV foi comprovada pela realização de medidas de VC com o eletrodo modificado em meio ácido (tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 2,0). Para fins de comparação, medidas nas mesmas condições foram realizadas para um eletrodo de ouro sólido policristalino, assim como para o EPCV não modificado e para o EPCV/PFR 1%. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 32.

Figura 32 – Voltamogramas cíclicos (A) de um eletrodo de ouro sólido e (B) do EPCV/AuNps-PFR 1%, EPCV/PFR 1% e EPCV não modificado, em meio ácido (tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 2,0).



O voltamograma cíclico obtido do eletrodo de Au sólido (Figura 32A) mostrou o comportamento eletroquímico característico para o referido metal, com picos anódicos na região de +1,18 V e um pico catódico pronunciado em +0,85 V. Tais processos são referentes à formação de óxidos de ouro durante a varredura anódica, que permanecem adsorvidos na superfície do eletrodo, e que são posteriormente reduzidos durante a varredura catódica. Esta sequência de reações pode ser expressa por meio das seguintes equações:



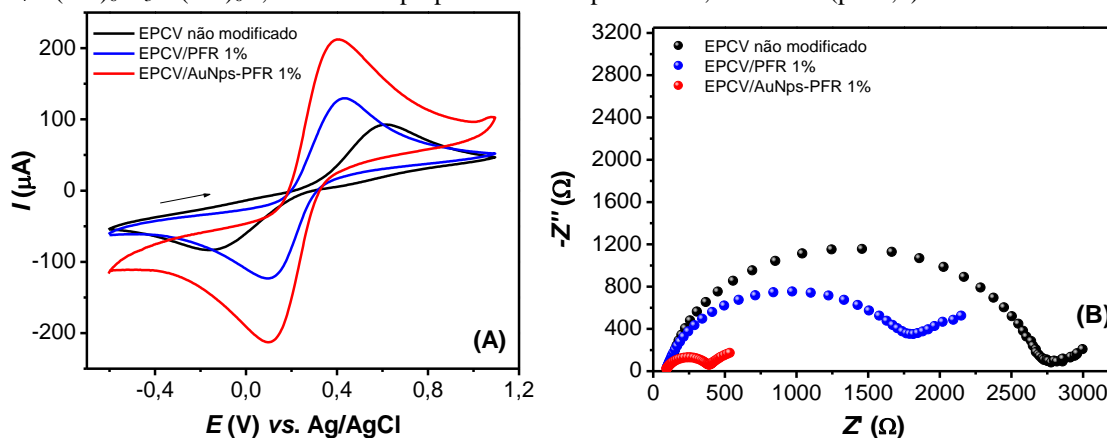
onde as etapas (I) e (II) referem-se aos processos de oxidação e a etapa (III) ao processo de redução. O produto formado na etapa (II), $Au(OH)_3$, pode também ser representado na forma $Au_2O_3 \cdot 3H_2O$, correspondendo ao óxido de ouro hidratado. (BURKE; NUGENT, 1997). É importante ressaltar que todo o processo é restrito à superfície eletródica, de

modo que as moléculas de água que participam das reações estão adsorvidas à superfície do metal. (BURKE; NUGENT, 1997; WANG, Y.et al., 2013).

Verifica-se pela Figura 32B que os voltamogramas obtidos para o EPCV não modificado e para o EPCV/PFR 1% não revelaram picos anódicos ou catódicos, apresentando apenas corrente capacitiva. Entretanto, o voltamograma obtido em meio ácido para o EPCV/AuNps-PFR 1% mostrou um processo anódico em +1,18 V e um processo catódico em +0,86 V, sendo que estes podem ser atribuídos ao processo redox típico para o Au. Deste modo, é possível afirmar que as AuNps-PFR foram devidamente incorporadas e mostraram eletroatividade no EPCV/AuNps-PFR 1%. Ainda, a aplicação de ciclos voltamétricos sucessivos não provocou decréscimo de corrente significativo para os processos identificados, o que demonstra que as nanopartículas permaneceram estáveis no eletrodo, não ocorrendo sua lixiviação para o eletrólito de suporte. Um comportamento semelhante ao obtido para o EPCV/AuNps-PFR 1% foi observado também no trabalho de Plowman e colaboradores (2015), para eletrodos de carbono vítreo modificados com AuNps estabilizadas em citrato e em brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), e também no trabalho de Wang, Y. e colaboradores (2013), para AuNps eletrodepositadas em eletrodos de carbono vítreo.

A influência das AuNps-PFR na resposta dos eletrodos foi investigada na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Os eletrodos foram construídos na proporção de 1% em relação à PFR, de modo que as diferenças observadas nas respostas pudessem ser atribuídas exclusivamente ao efeito das AuNps incorporadas à pasta. Os voltamogramas cíclicos e espectros de impedância obtidos são apresentados na Figura 33, juntamente com os resultados referentes ao EPCV não modificado e ao EPCV/PFR 1%,

Figura 33 – (A) Voltamogramas cíclicos e (B) espectros de impedância eletroquímica do EPCV/AuNps-PFR 1%, EPCV/PFR 1% e EPCV não modificado, em meio de solução equimolar de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ preparada em tampão PBS $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,5).



Os valores dos parâmetros retirados dos voltamogramas e dos espectros de impedância são mostrados na Tabela 11. É possível observar que um incremento significativo na resposta de corrente é obtido ao se modificar os eletrodos com as AuNps-PFR, além de uma substancial diminuição no valor da R_{ct} pode ser percebida no espectro de impedância, em comparação ao comportamento observado para o EPCV não modificado e para o EPCV/PFR 1%. Observa-se também uma progressiva redução no valor de ΔE_p na ordem EPCV/AuNps-PFR 1% < EPCV/PFR 1% < EPCV sem modificação, demonstrando que a modificação dos eletrodos com as AuNps proporcionou maior reversibilidade ao processo redox da sonda eletroquímica.

Verificou-se uma redução de 190,0 mV no valor de E_{pa} comparando-se o EPCV não modificado com o EPCV/PFR 1%, sugerindo um provável efeito eletrocatalítico causado pela modificação do eletrodo com a PFR. Confirma-se deste modo que os grupos polares da estrutura da PFR de fato facilitam a aproximação e oxidação da sonda eletroquímica na superfície eletródica. Uma diminuição ainda maior no valor de E_{pa} foi observada para o EPCV/AuNps-PFR 1%, fato que evidencia que as AuNps potencializaram o possível efeito eletrocatalítico já observado para a PFR.

As melhores respostas apresentadas pelo EPCV/AuNps-PFR (maiores valores de corrente, menor valor de ΔE_p e menor R_{ct}) podem ser atribuídas às propriedades características das AuNps, como elevada condutividade e alta área superficial, demonstrando que a modificação dos eletrodos com o nanocompósito sintetizado é um procedimento vantajoso para a aplicação dos mesmos como sensores eletroquímicos.

Tabela 11 – Valores de I_{pa} , I_{pc} , ΔE_p e R_{ct} obtidos para o EPCV, para o EPCV/PFR 1% e para o EPCV/AuNps-PFR 1%.

Eletrodo	I_{pa} (μA)	$-I_{pc}$ (μA)	E_{pa} (mV)	E_{pc} (mV)	ΔE_p (mV)	R_{ct} (Ω)
EPCV	73,20	54,26	620,0	160,0	780,0	2640,4
EPCV/PFR 1%	125,37	117,33	430,0	95,0	335,0	1879,2
EPCV/AuNps- PFR 1%	204,95	196,15	400,0	100,0	300,0	401,2

O valor da área eletroativa de cada um dos eletrodos estudados foi estimado utilizando-se a equação de Randles-Sevcik, que é apresentada a seguir:

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

onde n é o número de elétrons transferidos na reação; A é a área do eletrodo (em cm^2); D é o coeficiente de difusão ($7,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ para o íon $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ a uma concentração de 5 mmol L^{-1} em meio de $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$); C é a concentração da espécie eletroativa em solução (em mol cm^{-3}) e v é a velocidade de varredura de potencial (em V s^{-1}). (BAGOTSKY, 2006; BARD; FAULKNER, 2001; BRETT; BRETT, 1993). Analisando-se a equação, pode-se afirmar que, para uma mesma concentração de espécie eletroativa, e a uma mesma velocidade de varredura, a corrente de pico dependerá diretamente da área dos diferentes eletrodos estudados.

Os resultados obtidos para a determinação da área eletroativa do EPCV não modificado, do EPCV/PFR 1% e do EPCV/AuNps-PFR 1% são apresentados na Figura 34 e na Tabela 12. Neste caso, optou-se por analisar o valor de I_{pc} de cada eletrodo, a qual é originada pelo processo de redução $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} + e^- \rightarrow [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$. As áreas eletroativas estimadas são apresentadas em cada caso como uma média obtida a partir de três replicatas.

Figura 34 – Voltamogramas cíclicos do EPCV não modificado, EPCV/PFR 1% e EPCV/AuNps-PFR 1% em meio de solução de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 5 mmol L^{-1} preparada em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$).

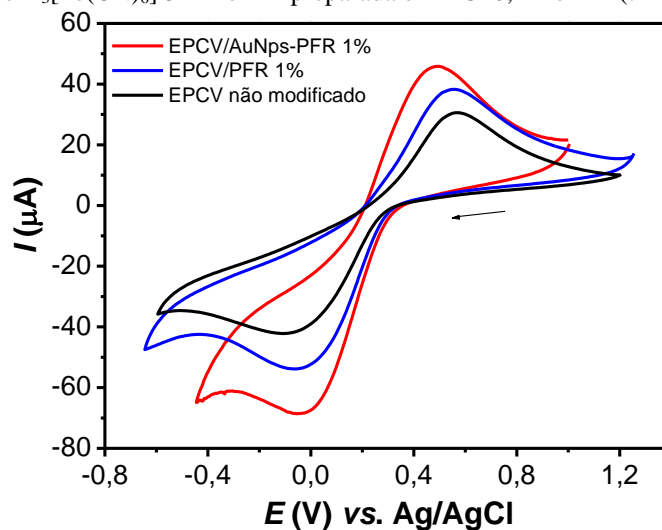


Tabela 12 – Valores médios da área eletroativa estimados do EPCV não modificado, EPCV/PFR 1% e EPCV/AuNps-PFR 1% ($n = 3$ para cada um dos eletrodos).

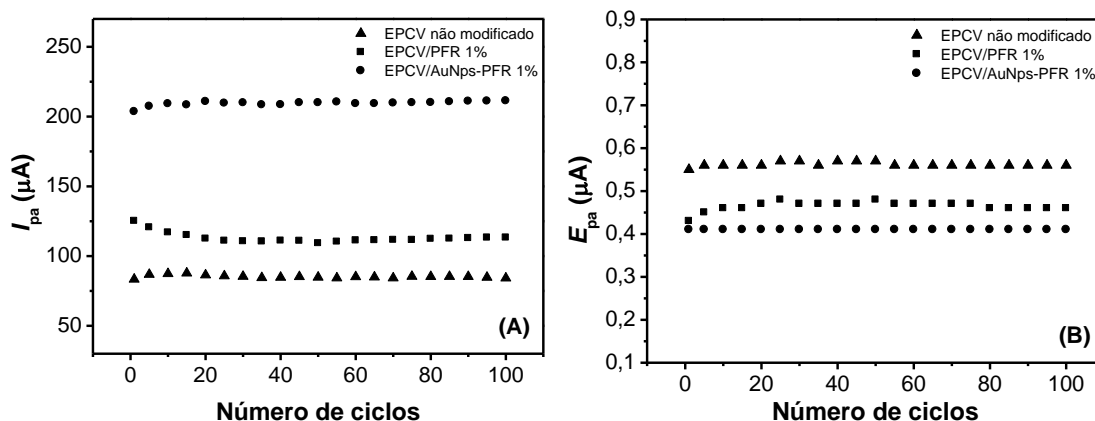
Eletrodo	$-I_{\text{pc}}$ (μA)	Área eletroativa estimada (cm^2)
EPCV não modificado	39,98	0,048
EPCV/PFR 1%	51,85	0,062
EPCV/AuNps-PFR 1%	62,57	0,075

É possível observar que o valor da I_{pc} , e conseqüentemente o da área eletroativa, aumentou na ordem $EPCV < EPCV/PFR\ 1\% < EPCV/AuNps-PFR\ 1\%$. A maior área obtida para o EPCV/PFR 1% em comparação ao EPCV pode ser uma consequência da superfície mais hidrofílica do eletrodo modificado, o que pode ter proporcionado um aumento na quantidade de sítios eletroativos em relação ao EPCV, cuja superfície é apolar. No caso do EPCV/AuNps-PFR, uma maior área foi observada comparando-se aos dois outros eletrodos, sendo este provavelmente um efeito da presença das AuNps na superfície eletródica. No entanto, pode ser verificado a partir dos dados da Tabela 12 que o aumento observado para a área eletroativa deste eletrodo em relação aos demais não foi tão pronunciado. Este fato pode estar relacionado à presença das cadeias de PFR envolvendo as AuNps, de modo que uma parte da superfície das mesmas pode ter sido passivada pelo invólucro de polissacarídeo, e, portanto, impedido que o aumento na área eletroativa fosse maior.

Entretanto, pode-se afirmar que, além de proporcionar um aumento na condutividade do material, a elevada área superficial das AuNps contribuiu para aumentar a área eletroativa do eletrodo, o que explica as melhores respostas apresentadas pelo mesmo em comparação aos outros eletrodos estudados. Resultados semelhantes podem ser encontrados na literatura em trabalhos que relatam a modificação de eletrodos de pasta de carbono com AuNps. Como exemplo, podem ser citados os estudos realizados por Afkhami; Soltani-Felehgari; e Madrakian (2013) (determinação de cefixima com eletrodo de pasta de carbono modificado com AuNps e nanotubos de carbono de paredes múltiplas), Afzali e colaboradores (2014) (aplicação de eletrodos de pasta de carbono modificados com AuNps para a detecção de eugenol) e Arvand e Dehsaraei (2013) (modificação de eletrodos de pasta de carbono com AuNps para quantificação de ácido fólico em matrizes biológicas).

Para se verificar a estabilidade de resposta voltamétrica do EPCV/AuNps-PFR 1%, bem como do EPCV não modificado e do EPCV/PFR 1%, foram aplicados sobre os mesmos uma série de 100 ciclos voltamétricos consecutivos. Tais medidas foram realizadas na presença da sonda eletroquímica e com $v = 50\text{ mV s}^{-1}$. A estabilidade de resposta foi avaliada por meio da variação nos valores de I_{pa} e E_{pa} , resultantes dos voltamogramas obtidos. A Figura 35 mostra os resultados obtidos.

Figura 35 – Estabilidade de resposta do EPCV/AuNps-PFR 1%, do EPCV/PFR 1% e do EPCV não modificado analisada em termos da variação da (A) I_{pa} e do (B) E_{pa} em função do número de ciclos voltamétricos.



As porcentagens de variação calculadas para cada eletrodo são apresentadas na Tabela 13. Apesar da menor variação no valor de I_{pa} ter sido observada para o EPCV não modificado, verificou-se que mesmo após a varredura de 100 ciclos sucessivos uma variação de apenas 3,80% foi obtida para o EPCV/AuNps-PFR 1%. Em relação ao E_{pa} , o EPCV/AuNps-PFR 1% apresentou um comportamento superior aos demais eletrodos estudados, já que nenhuma variação foi observada para este parâmetro durante a aplicação dos 100 ciclos voltamétricos. Assim, pode-se sugerir que mesmo após a incorporação das AuNps-PFR, o EPCV/AuNps-PFR 1% mostrou uma resposta estável.

Tabela 13 – Porcentagens de variação nos valores de I_{pa} e de E_{pa} calculadas para o EPCV não modificado, EPCV/PFR 1% e EPCV/AuNps-PFR 1% após varredura de 100 ciclos voltamétricos sucessivos na presença da sonda eletroquímica $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$.

Eletrodo	Variação (%)	
	I_{pa}	E_{pa}
EPCV não modificado	0,95	1,82
EPCV/PFR 1%	9,49	6,98
EPCV/AuNps-PFR 1%	3,80	0,00

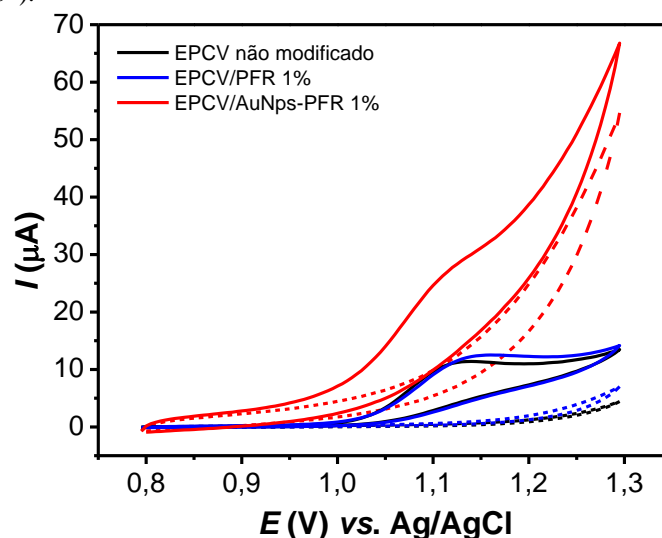
Neste sentido, pode-se afirmar que a boa estabilidade de resposta voltamétrica alcançada para o EPCV/Au-Nps-PFR 1% consiste, juntamente com os demais resultados de caracterização apresentados anteriormente, um fator preponderante para a aplicação deste como sensor eletroquímico, além de confirmar o fato de que a modificação dos eletrodos com as AuNps-PFR realmente melhora as suas propriedades.

5.4 DETERMINAÇÃO DO AGENTE ANTITUMORAL 5-FLUOROURACIL (5-FU)

5.4.1 Comportamento voltamétrico

Para se verificar a eletroatividade do analito 5-FU sobre os eletrodos desenvolvidos, estudos foram conduzidos por voltametria cíclica, empregando uma concentração fixa de 5-FU igual a $9,09 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 8,0. Os voltamogramas obtidos na faixa de 0,8 a 1,3 V (vs. Ag/AgCl) são mostrados na Figura 36.

Figura 36 – Voltamogramas cíclicos do EPCV não modificado, do EPCV/PFR 1% e do EPCV/AuNps-PFR 1% na presença de $9,09 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de 5-FU, em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 8,0. As linhas pontilhadas representam os voltamogramas dos mesmos eletrodos na ausência dos analitos ($\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$).



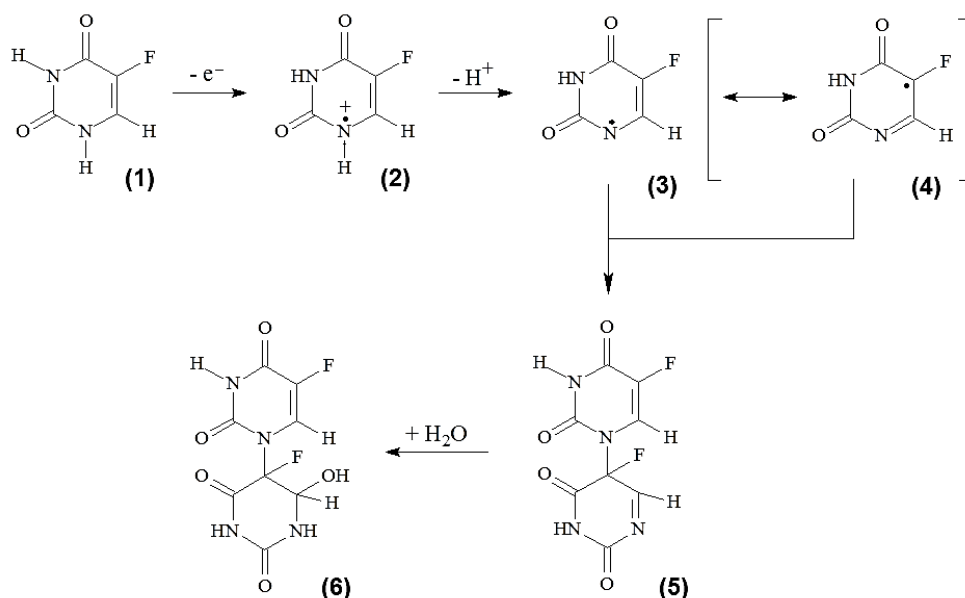
Verifica-se pelos voltamogramas apresentados acima que, na ausência do analito, não foram observados picos de corrente para nenhum dos eletrodos estudados. Isto evidencia que os mesmos não apresentam resposta eletroquímica na faixa de potencial estudada, possuindo, dessa forma, apenas corrente capacitiva.

Na presença de 5-FU um pico anódico foi observado para todos os eletrodos, correspondendo ao processo de oxidação do fármaco na superfície dos mesmos. -Nenhum processo catódico foi observado nas varreduras voltamétricas reversas, indicando que a oxidação do 5-FU como um processo irreversível. Tais resultados se assemelham a outros

trabalhos que reportam a determinação eletroanalítica de 5-FU sobre eletrodos confeccionados à base de materiais de carbono (GOYAL; SINGH; ABDULLAH, 2002; HUA, et al., 2013; SATARADDI; NANDIBEWOR, 2011; SATYANARAYANA et al., 2015; SHAH et al., 2012).

Segundo Zhan e colaboradores (2011), o mecanismo para a oxidação eletroquímica do 5-FU envolve 1 próton e 1 elétron, e pode ser explicado por meio da sequência de reações mostradas na Figura 37. A reação inicial ocorre com a remoção de 1 elétron do átomo de N na posição 1 da molécula de 5-FU (**1**), resultando em um cátion-radical (**2**), que prontamente sofre desprotonação e fornece a correspondente espécie radicalar estabilizada por ressonância (**3**). Na sequência, duas espécies radicalares (**3 e 4**) combinam-se e formam uma isopirimidina dimérica (**5**). Na última etapa da reação, a espécie (**5**) sofre hidratação e fornece a espécie (**6**) como produto final. Pode-se assumir o mecanismo descrito como sendo de natureza eletroquímica-química, uma vez que existem etapas químicas (desprotonação, dimerização e hidratação) acopladas à transferência eletrônica.

Figura 37 – Provável mecanismo do processo de oxidação eletroquímica do 5-FU sobre os eletrodos estudados.



Fonte: Adaptado de ZHAN et al., 2011.

Verifica-se a partir da Figura 36 que o voltamograma para o EPCV/AuNps-PFR 1% na presença do analito apresentou maiores valores de I_{pa} (15,74 μA) comparando-se com o EPCV/PFR 1% (11,37 μA) e com o EPCV sem modificação (10,75 μA). Além

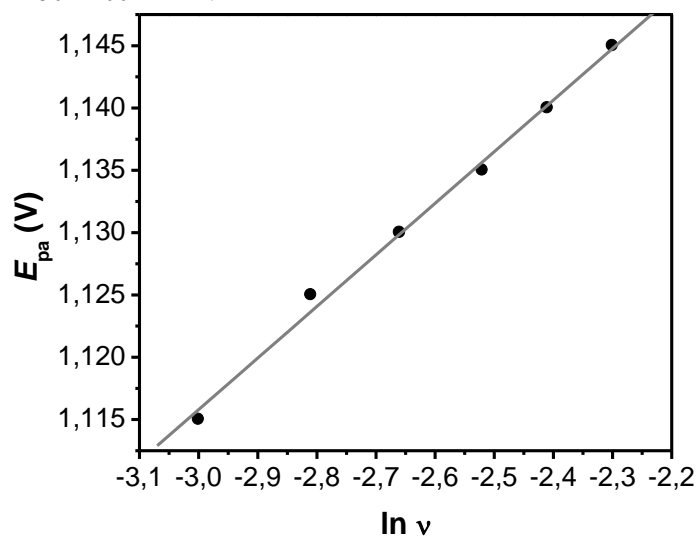
disso, uma redução de 50 e 30 mV no valor de E_{pa} foi obtida para o EPCV/AuNps-PFR 1% ($E_{pa} = 1,11$ V) comparando-se com o EPCV/PFR 1% ($E_{pa} = 1,16$ V) e com o EPCV não modificado ($E_{pa} = 1,14$ V), respectivamente. Como a concentração de 5-FU empregada neste estudo foi a mesma para todos os eletrodos, pode-se atribuir que o aumento nos valores de corrente e a diminuição no potencial de oxidação são evidências do efeito eletrocatalítico causado pelas AuNps-PFR, que possibilitaram uma transferência eletrônica mais rápida entre o 5-FU e a superfície do eletrodo, em comparação aos demais. Este comportamento pode ser atribuído à elevada condutividade das AuNps, aliada ao aumento na área ativa proporcionado pela incorporação de tais nanoestruturas aos eletrodos.

O mecanismo apresentado na Figura 37 foi confirmado por meio da determinação do número de elétrons envolvidos na reação de oxidação do 5-FU sobre o EPCV/AuNps-PFR. Para tanto, um estudo por VC com o eletrodo em questão foi realizado na presença de $9,09 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ do fármaco, variando-se a velocidade de varredura de potencial entre 50 a 100 mV s⁻¹, sendo que o número de elétrons envolvidos na oxidação do mesmo foi determinado aplicando-se aos dados obtidos a equação de Laviron (LAVIRON, 1979):

$$E_{pa} = E^0 + \frac{RT}{(1 - \alpha)nF} \ln v \quad (3)$$

onde E^0 é o potencial formal (dado em V), R é a constante universal dos gases ideais ($8,314$ J K⁻¹ mol⁻¹), T é a temperatura ($294,5$ K neste experimento), α é o coeficiente de transferência eletrônica, n é o número de elétrons envolvidos na reação estudada, F é a constante de Faraday ($96485,332$ C mol⁻¹) e v é a velocidade de varredura de potencial (dada em V s⁻¹). Assim, o valor de n pode ser determinado pelo coeficiente angular obtido por meio da regressão linear do gráfico entre o E_{pa} e o logaritmo neperiano da velocidade de varredura, assim como mostrado na Figura 38.

Figura 38 – Gráfico de E_{pa} contra $\ln v$ do EPCV/AuNps-PFR 1% na presença de $9,09 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de 5-FU, com v variando de 50 a 100 mV s^{-1} .

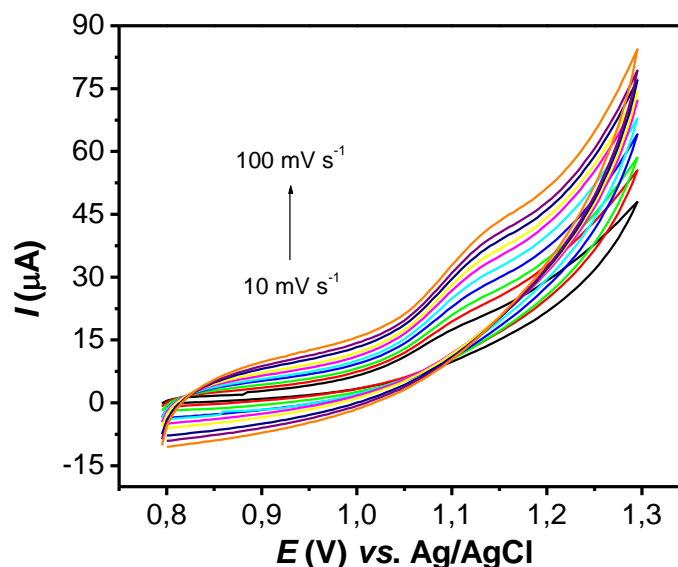


A reta gerada pela regressão linear obtida para o gráfico representado acima é descrita pela equação: $E_{pa} = 1,24001 + 0,0414 \ln v$, com $R = 0,997$. Sabendo-se que, para um processo irreversível, o valor de α pode ser considerado igual a 0,5 (SATYANARAYANA et al., 2015), o valor de n resultante da aplicação da equação foi igual a 1,22, o qual é muito próximo do número de elétrons envolvidos no mecanismo da Figura 36. Além disso, o resultado obtido se assemelha ao encontrado no trabalho de Satyanarayana e colaboradores (2015), que determinaram n como sendo igual a 1,12 para estudos com um ECV modificado com nanotubos de carbono e AuNps para detecção de 5-FU.

5.4.2 Influência da velocidade de varredura de potencial (v)

Com a finalidade de se determinar a natureza do transporte de massa envolvido na reação de oxidação do 5-FU sobre o EPCV/AuNps-PFR 1%, foi realizado um estudo de variação da velocidade de varredura, por meio de VC. As medidas foram realizadas variando-se a v no intervalo de 10 mV s^{-1} a 100 mV s^{-1} . Empregou-se uma concentração fixa de 5-FU igual a $4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, e como eletrólito de suporte o tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 8,0. Os voltamogramas obtidos são apresentados na Figura 39.

Figura 39 – Voltamogramas cíclicos obtidos para $4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de 5-FU, em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 8,0, com v variando de 10 a 100 mV s^{-1} .



Verifica-se que o aumento na velocidade de varredura foi acompanhado por um aumento de corrente no processo de oxidação do 5-FU, com um pequeno deslocamento do potencial de pico para valores mais positivos. Segundo a literatura (BRETT; BRETT, 1993; WANG, J., 2001), processos irreversíveis controlados por difusão são descritos pela seguinte equação:

$$I_{pa} = (2,99 \times 10^5) n(\alpha n_a)^{1/2} A D^{1/2} C v^{1/2} \quad (4)$$

onde n_a é o número de elétrons envolvidos na etapa de transferência de carga (etapa determinante da velocidade da reação) e α é o coeficiente de transferência eletrônica. Assim como no caso de processos reversíveis, como descrito pela equação de Randles-Sevcik (equação 1), o valor da corrente de pico (I_p) está relacionado de maneira linear com a raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$).

Se, ao contrário, o processo redox ocorrer na superfície eletródica segundo um mecanismo adsorptivo, o valor de I_p dependerá de modo linear do valor de v . Isto é previsto pela seguinte equação:

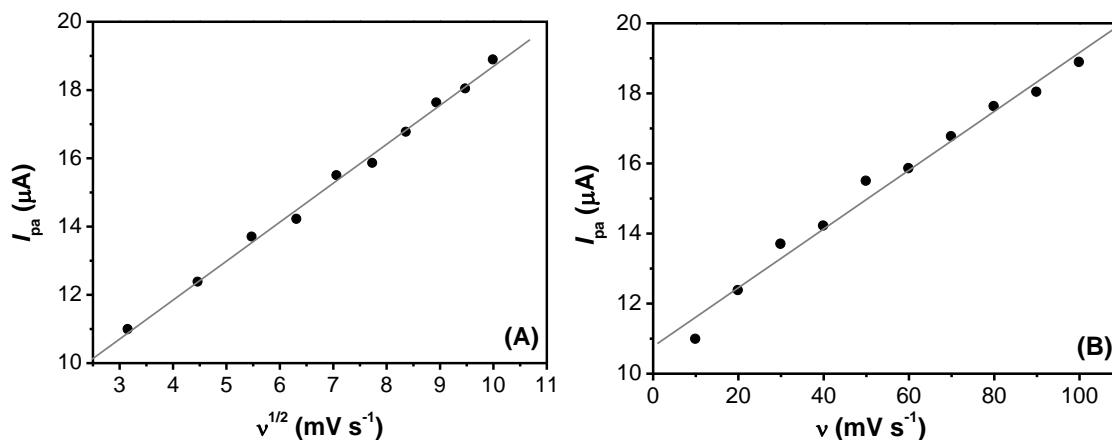
$$I_p = \frac{n^2 F^2}{4RT} A \Gamma v \quad (5)$$

onde: n é o número de elétrons transferidos na reação; F é a constante de Faraday ($96485,3365 \text{ C mol}^{-1}$); R é a constante universal dos gases ideais ($0,082 \text{ atm L mol}^{-1} \text{K}^{-1}$); A

é a área do eletrodo (em cm^2); Γ é a concentração da espécie eletroativa adsorvida na superfície do eletrodo (mol cm^{-2}) e ν é a velocidade de varredura de potencial (em V s^{-1}). (BARD; FAULKNER, 2001; BRETT; BRETT, 1993).

Para se determinar se o processo de oxidação do 5-FU na superfície do EPCV/AuNps-PFR 1% é controlado por difusão ou adsorção, gráficos dos valores de I_{pa} foram plotados em função dos valores de $\nu^{1/2}$ e ν , sendo os mesmos representados na Figura 40.

Figura 40 – Correlações de (A) I_{pa} vs. $\nu^{1/2}$ e (B) I_{pa} vs. ν do EPCV/AuNps-PFR 1% na presença de $4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de 5-FU.



Verifica-se que correlações lineares foram obtidas tanto para o gráfico de I_{pa} vs. $\nu^{1/2}$ ($I_{pa} (\mu\text{A}) = 7,282 + 1,141\nu^{1/2} (\text{mV s}^{-1})$; $R = 0,997$) quanto para o de I_{pa} vs. ν ($I_{pa} (\mu\text{A}) = 10,775 + 0,083\nu (\text{mV s}^{-1})$; $R = 0,991$). A princípio, pode-se tomar o processo de oxidação do 5-FU sobre o EPCV/AuNps-PFR 1% como sendo controlado por difusão, uma vez que os pontos ajustaram-se melhor à reta obtida pela regressão no gráfico de I_{pa} vs. $\nu^{1/2}$ em comparação ao ajuste dos pontos no gráfico de I_{pa} vs. ν . Entretanto, dada a boa linearidade obtida nos dois casos, não foi possível definir com exatidão por este método a natureza do transporte de massa envolvida na oxidação do 5-FU.

Uma maneira se de confirmar a natureza de qualquer processo redox sobre uma superfície eletródica consiste na utilização da relação de duplo logaritmo entre a I_{pa} e a ν , assim como realizado no trabalho de Shih e colaboradores (2004). Esta metodologia é baseada nas seguintes deduções:

- (i) Assim como descrito anteriormente, processos irreversíveis controlados por difusão são descritos pela equação:

$$I_{pa} = (2,99 \times 10^5) n(\alpha n_a)^{1/2} A D^{1/2} C \nu^{1/2} \quad (6)$$

Aplicando-se o logaritmo (base 10) na equação (3) obtém-se:

$$\log(I_{pa}) = \log[(2,99 \times 10^5) n(\alpha n_a)^{1/2} A D^{1/2} C] + \log(v^{1/2}) \quad (7)$$

Esta equação pode ser reduzida a:

$$\log(I_{pa}) = \text{constante} + \frac{1}{2} \log(v) \quad (8)$$

Aplicando-se derivadas parciais e rearranjando, obtém-se:

$$\text{inclinação} = 0,5 = \frac{\partial \log(I_{pa})}{\partial \log v} \quad (9)$$

- (ii) Para processos controlados por adsorção ($I_{pa} \propto v$), o mesmo tratamento mostrado acima para a equação (5) pode ser dado à equação (4):

$$\log(I_p) = \log\left(\frac{n^2 F^2}{4RT} A \Gamma\right) + \log v \quad (10)$$

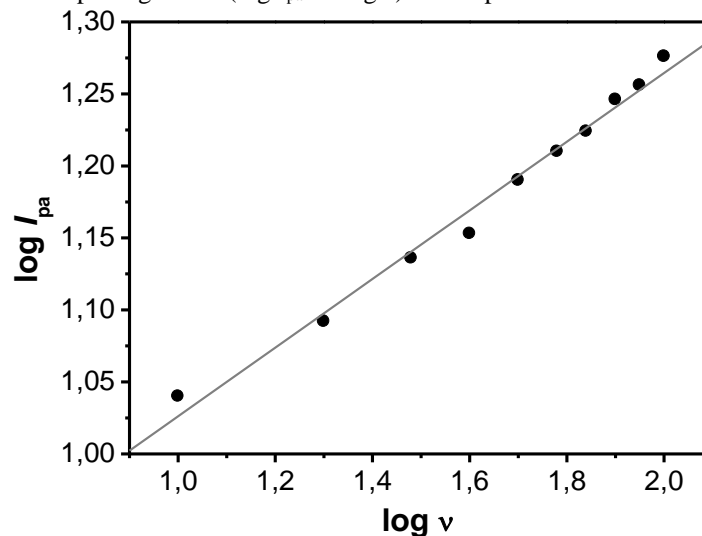
$$\log(I_{pa}) = \text{constante} + \log(v) \quad (11)$$

$$\text{inclinação} = 1,0 = \frac{\partial \log(I_{pa})}{\partial \log v} \quad (12)$$

Assim, segundo a equação 5, uma inclinação do gráfico de $\log I_{pa}$ vs. $\log v$ igual a 0,5 é obtida no caso de processos puramente difusionais, enquanto que quando o processo é inteiramente adsorptivo, uma inclinação de 1,0 é obtida para o mesmo gráfico, de acordo com a equação (8). Portanto, inclinações no intervalo entre 0,5 e 1,0 são um indicativo de mecanismos mistos, controlados simultaneamente por difusão e adsorção. (SHIH, Y. et al., 2004).

A relação do duplo logaritmo descrita anteriormente foi aplicada ao sistema em estudo, a fim de se confirmar a possível natureza difusional do processo de oxidação do 5-FU sobre o EPCV/AuNps-PFR. O gráfico resultante é mostrado na Figura 41.

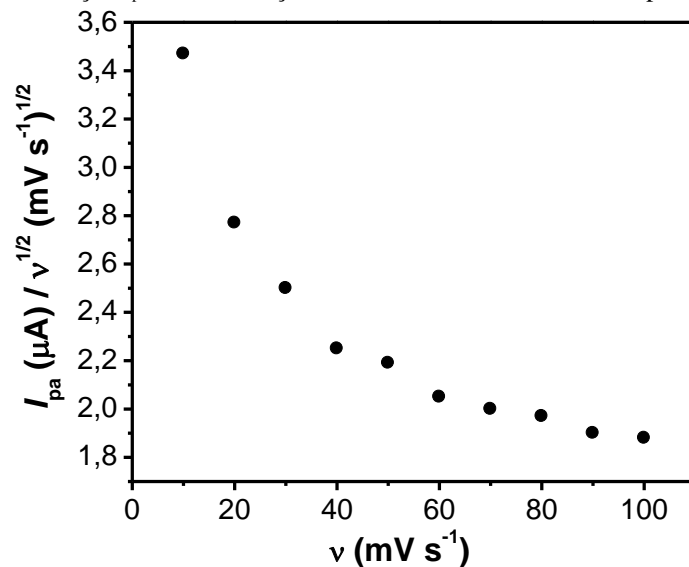
Figura 41 – Relação do duplo logaritmo ($\log I_{pa}$ vs. $\log v$) obtida para o 5-FU.



A correlação do duplo logaritmo obtida é descrita pela equação: $\log(I_{pa}) = 0,787 + 0,238 \log(v)$, com $R = 0,993$. Assim pode-se confirmar a natureza difusional do processo de oxidação do 5-FU sobre o EPCV/AuNps-PFR 1%, uma vez que a inclinação da reta obtida pela regressão linear aproxima-se mais de 0,5 (valor característico para mecanismos difusionais) do que de 1,0 (inclinação para mecanismos adsortivos), sendo este um fato favorável para este eletrodo em aplicações quantitativas. O valor do coeficiente angular encontrado é semelhante também ao obtido no trabalho de Pattar e Nandibewoor (2015) (0,36) para determinação de 5-FU com ECV modificado com óxido de grafeno reduzido e quitosana.

O efeito eletrocatalítico causado pelas AuNps-PFR para o processo de oxidação do 5-FU na superfície dos eletrodos modificados foi confirmado segundo a teoria polarográfica do eletrodo estacionário, proposta por Nicholson e Shain (1964). Gráficos foram construídos plotando-se o valor da razão $I_{pa}/v^{1/2}$ contra v , tendo-se observado um perfil típico para reações catalíticas com processo irreversível de transferência eletrônica (Figura 42). (NICHOLSON; SHAIN, 1964). Isto corrobora com a natureza irreversível do mecanismo apresentado na Figura 37 e com valores menos positivos de E_{pa} encontrados para a oxidação do 5-FU sobre o EPCV/AuNps-PFR 1%.

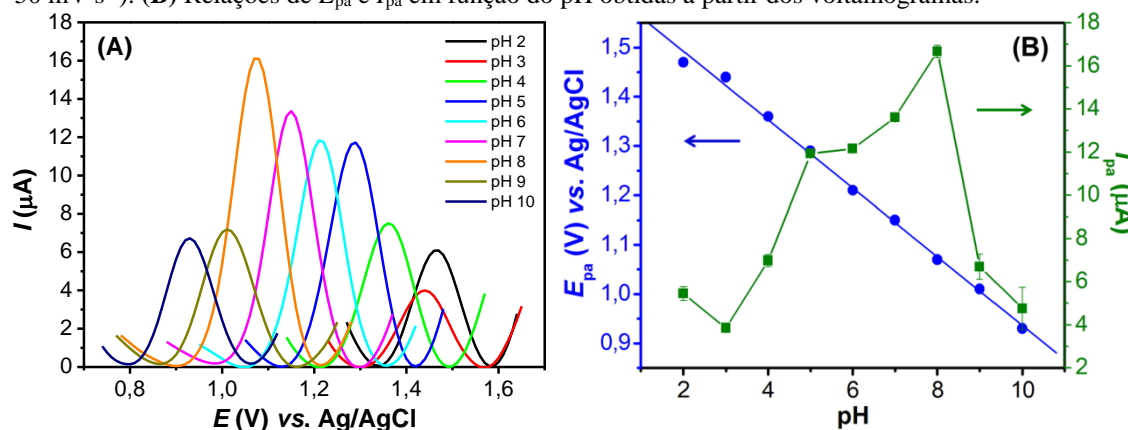
Figura 42 – Gráfico da relação $I_{pa} v^{-1/2}$ em função da velocidade de varredura de potencial.



5.4.3 Influência do pH na resposta voltamétrica do 5-FU

O pH do eletrólito de suporte é considerado um dos parâmetros de maior importância para o desempenho analítico de um sensor, influenciando muitas vezes de maneira direta a resposta eletroquímica do mesmo durante a detecção do analito. (HONG; ZHU; ZHANG, 2012). Dado o envolvimento de prótons no mecanismo de oxidação eletroquímica do 5-FU, é possível inferir que o pH do meio terá influência direta sobre a resposta do EPCV/AuNps-PFR na presença do analito. A fim de que esta influência fosse avaliada, e para que se encontrasse um valor de pH ótimo para as análises subsequentes, estudos por meio de VPD com o EPCV/AuNps-PFR 1% foram realizados na presença de $4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de 5-FU utilizando-se o tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito de suporte, variando o valor de pH na faixa de 2,0 a 10,0. Os voltamogramas obtidos, assim como as relações de E_{pa} e I_{pa} em função do valor de pH são mostrados na Figura 43. A técnica de VPD foi escolhida pelo fato de que fornece picos de corrente mais definidos e com uma sensibilidade superior aos obtidos com a VC. (BRETT; BRETT, 1993; WANG, J., 2001). Devido a isso, esta foi o método empregado também para todos os estudos posteriores.

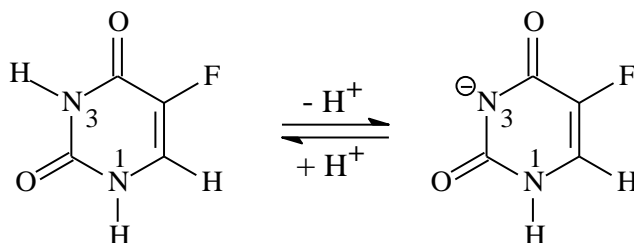
Figura 43 – (A) Voltamogramas de pulso diferencial do EPCV/AuNps-PFR 1% na presença de $4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de 5-FU, em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, com valores de pH variando na faixa de 2,0 a 10,0 (parâmetros utilizados: amplitude de pulso = 75 mV; tempo de pulso = 75 ms; $E_{\text{step}} = 10 \text{ mV}$; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$). (B) Relações de E_{pa} e I_{pa} em função do pH obtidas a partir dos voltamogramas.



Pode-se observar na Figura 43A que o 5-FU apresentou resposta voltamétrica sobre o EPCV/AuNps-PFR para toda a faixa de pH estudada, sendo que um máximo de corrente foi obtido em pH 8,0. Assim, todas as análises posteriores foram realizadas neste pH, devido à melhor resposta de corrente obtida.

Pode-se observar que a corrente gerada pela oxidação do 5-FU sobre o EPCV/AuNps-PFR 1% seguiu uma tendência de aumento até pH 8,0, onde atinge um patamar máximo, e em seguida apresenta uma queda brusca nos pHs 9,0 e 10,0. Este comportamento pode ser justificado sabendo-se que o valor de pK_a para o analito é igual a 8,1 (HONG et al., 2010), sendo este correspondente à desprotonação do átomo de nitrogênio designado como N_3 no equilíbrio apresentado na Figura 44. A desprotonação em N_1 também pode ocorrer, sendo observada em valores de pH acima de 13,0. (PENDEKAL; TEGGINAMAT, 2012).

Figura 44 – Desprotonação do 5-FU.



Fonte: Adaptado de JANG et al., 2001.

Sabe-se que se $\text{pH} > pK_a$, a base conjugada predomina em solução e a maior parte das moléculas do analito estarão negativamente carregadas. (ANDRADE et al.,

2009). Além disso, é importante destacar que o EPCV/AuNps-PFR 1% possui também cargas negativas em sua superfície, como uma consequência da presença das AuNps-PFR. Assim, para as medidas realizadas em $\text{pH} > 8,0$, seria esperado que ocorresse uma repulsão eletrostática entre o 5-FU e o EPCV/AuNps-PFR 1%, o que dificultaria a aproximação do analito ao eletrodo, minimizando a corrente gerada pela sua oxidação. De fato, para valores de pH superiores ao $\text{p}K_a$ do 5-FU, os valores de I_{pa} foram menores, o que está em concordância com o esperado.

Observa-se na Figura 43B que houve um deslocamento no valor de E_{pa} para valores menos positivos com o aumento do pH do eletrólito suporte. Este deslocamento pode ser justificado com base no fato de que prótons estão envolvidos na reação de oxidação do 5-FU. Segundo o mecanismo apresentado na Figura 37, a segunda etapa da oxidação ocorre com a remoção de 1 próton do intermediário designado como (2). Neste sentido, pode-se afirmar que em pH s mais básicos tal desprotonação ocorre mais facilmente, como consequência deste fato, o analito será oxidado em um potencial mais baixo. O contrário é observado em pH s ácidos, pois um potencial mais alto foi necessário para que os prótons pudessem ser removidos da molécula, culminando com sua oxidação.

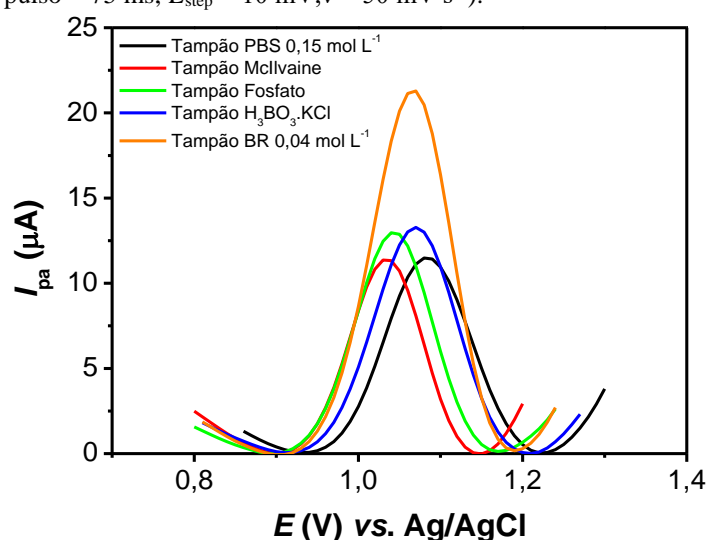
Uma relação linear foi observada entre o E_{pa} e o pH do eletrólito suporte, com uma inclinação igual a $-69,0 \text{ mV pH}^{-1}$ ($E_{pa} \text{ (vs. Ag/AgCl)} = 1,63 - 0,069 \text{ pH}$; $R = 0,998$). Este valor aproxima-se da inclinação nernstiana teórica de $-59,0 \text{ mV pH}^{-1}$ para mecanismos em que o número de prótons e elétrons transferidos no processo é o mesmo. (CALAÇA et al., 2016; CALIXTO; SANTOS; CAVALHEIRO, 2014; KISSINGER; HEINEMAN, 1996). Além disso, o valor aproximou-se do encontrado nos trabalhos de Satyanarayana e colaboradores (2015) (-62 mV pH^{-1} , para determinação de 5-FU com ECV modificado com AuNps e nanotubos de carbono de paredes múltiplas) e de Pattar e Nandibewoor (2015) (-65 mV pH^{-1} , para determinação de 5-FU com ECV modificado com óxido de grafeno reduzido e quitosana).

5.4.4 Influência do eletrólito de suporte

O tipo de eletrólito suporte a ser utilizado nas medidas eletroquímicas é outro parâmetro importante a ser estabelecido. Este pode modificar a termodinâmica e a cinética do processo eletródico, assim como o transporte de massa no interior da célula

eletroquímica tendo, portanto, influência direta sobre a resposta eletroquímica do eletrodo de trabalho. (AGOSTINHO et al., 2004; JOSEPH; KUMAR, 2010). Como a reação de oxidação do 5-FU apresentou dependência em relação ao pH, foram escolhidos cinco meios tamponantes para serem testados para o fármaco, todos com pH ajustado para 8,0, os quais foram: tampão PBS 0,15 mol L⁻¹, tampão McIlvaine, tampão BR 0,04 mol L⁻¹, tampão H₃BO₃.KCl – NaOH e tampão fosfato. Os voltamogramas cíclicos obtidos com o EPCV/AuNps-PFR 1% para 4,76 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ de 5-FU são mostrados na Figura 45.

Figura 45 – Voltamogramas de pulso diferencial do EPCV/AuNps-PFR 1% na presença de 4,76 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ de 5-FU, em diferentes tipos de solução tampão, em pH 8,0 (parâmetros utilizados: amplitude de pulso = 75 mV; tempo de pulso = 75 ms; $E_{step} = 10$ mV; $v = 50$ mV s⁻¹).



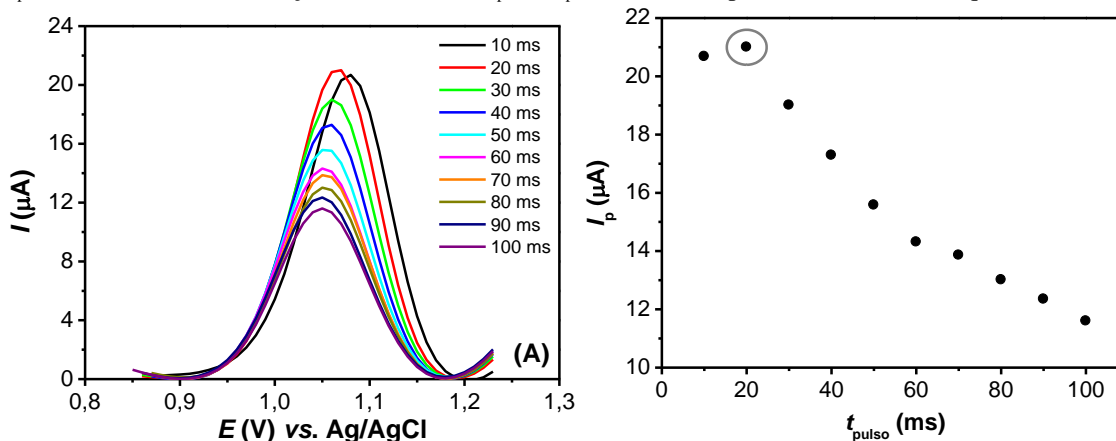
Verifica-se que a natureza do eletrólito influenciou a resposta do EPCV/AuNps-PFR para o 5-FU, uma vez que pequenos deslocamentos de potencial e diferenças na magnitude da I_{pa} foram observados comparando-se os diferentes eletrólitos testados. Para os tampões McIlvaine e PBS observou-se um deslocamento do potencial de pico para valores menos positivos em relação ao comportamento observado para os outros eletrólitos. Apesar do valor de potencial de pico para o tampão BR ter sido um pouco mais positivo do que os observados para os dois tampões anteriores, observa-se que um considerável incremento de corrente foi obtido para este eletrólito frente às demais soluções (tampão McIlvaine = 11,73 µA; tampão fosfato = 12,93 µA; tampão H₃BO₃.KCl = 13,28 µA; tampão PBS = 11,48 µA; tampão BR = 21,28). Assim, selecionou-se o tampão BR (em pH 8,0) para todas as análises subsequentes.

5.4.5 Otimização dos parâmetros instrumentais da VPD

A fim de que uma maior intensidade de corrente fosse alcançada para a determinação de 5-FU com o EPCV/AuNps-PFR, os parâmetros instrumentais da VPD tempo de duração do pulso de potencial (t_{pulso}), velocidade de varredura de potencial (ν) e amplitude do pulso de potencial (a_{pulso}) foram otimizados por meio de um estudo univariado. Empregou-se para a otimização uma concentração fixa e igual a $4,76 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de 5-FU, com todas as medidas realizadas em solução tampão BR 0,04 mol L⁻¹ em pH 8,0. As faixas estudadas para cada parâmetro foram: (i) $t_{\text{pulso}} = 10$ ms – 100 ms, com $t_{\text{padrão}} = 75$ ms; (ii) $\nu = 10$ mV s⁻¹ – 100 mV s⁻¹, com $\nu_{\text{padrão}} = 30$ mV s⁻¹; e (iii) $a_{\text{pulso}} = 10$ mV – 150 mV, com $a_{\text{padrão}} = 75$ mV. Assim como já sugerido, cada parâmetro foi avaliado individualmente, sendo os outros dois fixados em seus valores padrões (definidos com base nos trabalhos de Satyanarayana e colaboradores (2015) e de Zhan e colaboradores (2011)) ou então no valor já otimizado.

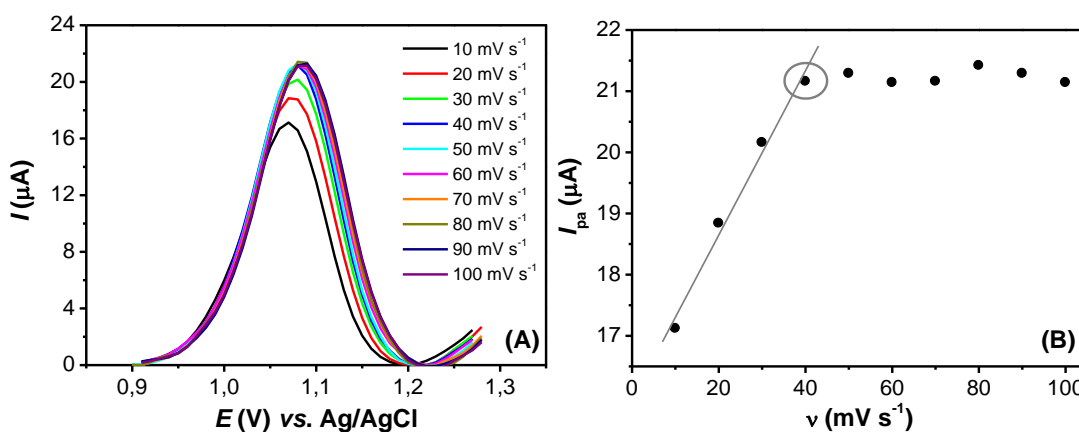
Inicialmente, otimizou-se o t_{pulso} , que foi variado na faixa mencionada anteriormente, com a ν e a a_{pulso} fixadas em 30 mV s⁻¹ e 75 mV, respectivamente. Os voltamogramas obtidos são apresentados na Figura 46. Pode-se observar um leve deslocamento no E_{pa} para valores menos positivos com o aumento no valor de t_{pulso} . Além disso, verifica-se que intensidade de corrente aumentou até 20 ms, com um decréscimo substancial ocorrendo a partir deste valor. Portanto, estabeleceu-se um $t_{\text{pulso}} = 20$ ms para as análises posteriores.

Figura 46 – (A) Voltamogramas de pulso diferencial do EPCV/AuNps-PFR na presença de $4,76 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de 5-FU em tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 8,0, variando-se o t_{pulso} de 10 a 100 ms, com $\nu = 30$ mV s⁻¹ e $a_{\text{pulso}} = 75$ mV. (B) Correlação obtida entre a I_p e o t_{pulso} , com o tempo escolhido em destaque.



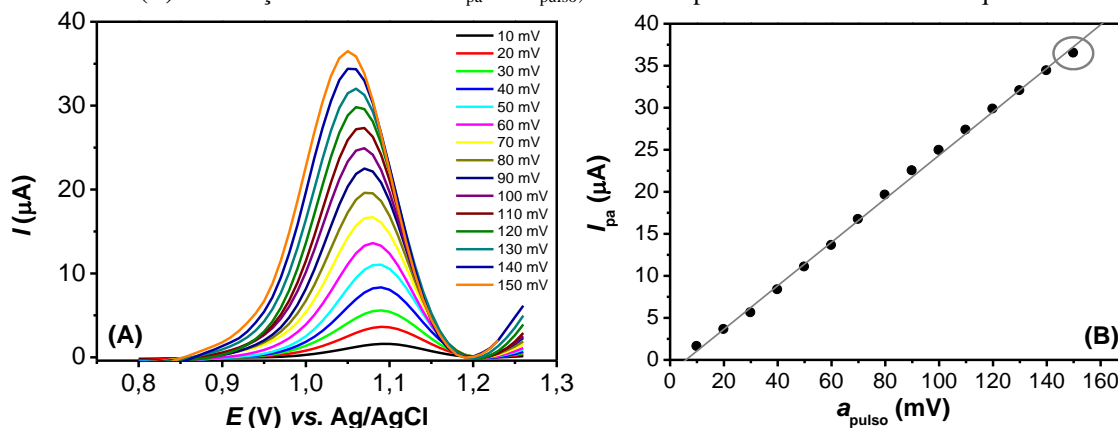
A seguir, foi estudado o efeito da variação da ν na resposta do eletrodo modificado para o 5-FU. Para isso, o t_{pulso} foi fixado no valor já otimizado de 20 ms, e a a_{pulso} foi mantida em 75 mV. Pode-se perceber pelos resultados mostrados na Figura 47 que um pequeno deslocamento de potencial para valores mais positivos ocorre ao se aumentar o valor de ν . Nota-se ainda que houve um crescimento linear no valor de I_{pa} até 40 mV s^{-1} , e que, a partir desta velocidade, a intensidade de corrente permaneceu praticamente constante. Assim, estabeleceu-se 40 mV s^{-1} como o valor ótimo de ν para a determinação do analito em estudo.

Figura 47 – (A) Voltamogramas de pulso diferencial do EPCV/AuNps-PFR na presença de $4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de 5-FU em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 8,0, variando-se a ν de 10 a 100 mV s^{-1} , com $t_{\text{pulso}} = 20 \text{ ms}$ e $a_{\text{pulso}} = 75 \text{ mV}$. (B) Correlação obtida entre a I_{pa} e a ν , com a velocidade escolhida em destaque.



Por fim, foi realizada a otimização do valor da a_{pulso} , fixando-se nos valores otimizados o t_{pulso} e a ν (20 ms e 40 mV s^{-1} , respectivamente). Pelos voltamogramas da Figura 48, verifica-se que um deslocamento no valor de E_{pa} para valores menos positivos foi obtido ao se aumentar a a_{pulso} . Adicionalmente, pode-se notar que houve um crescimento linear na intensidade de I_{pa} até a máxima a_{pulso} testada. Apesar de um pequeno alargamento do pico ter sido observado com o aumento da a_{pulso} , estabeleceu-se como valor ótimo 150 mV, devido à maior intensidade de corrente alcançada.

Figura 48 – (A) Voltamogramas de pulso diferencial do EPCV/AuNps-PFR na presença de $4,76 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de 5-FU em tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 8,0, variando-se a a_{pulso} de 10 a 150 mV, com $t_{\text{pulso}} = 20$ ms e $v = 40 \text{ mV s}^{-1}$. (B) Correlação obtida entre a I_{pa} e a a_{pulso} , com a amplitude escolhida em destaque.



A Tabela 14 mostra os valores otimizados dos parâmetros instrumentais da VPD para a determinação de 5-FU utilizando-se o EPCV/AuNps-PFR. Com os parâmetros estabelecidos, curvas analíticas para o analito foram obtidas, como será mostrado a seguir.

Tabela 14 – Parâmetros instrumentais da VPD otimizados para a determinação de 5-FU com o EPCV/AuNps-PFR.

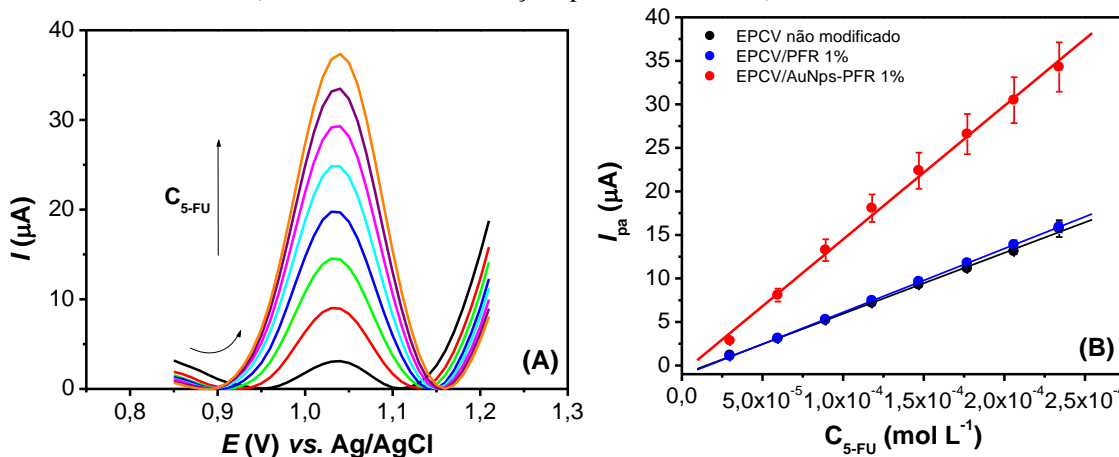
Parâmetro	Faixa estudada ¹	Valor otimizado
Tempo de pulso (t_{pulso})	10 ms – 100 ms	20 ms
Velocidade de varredura (v)	10 mV s ⁻¹ – 100 mV s ⁻¹	40 mV s ⁻¹
Amplitude de pulso (a_{pulso})	10 mV – 150 Mv	150 mV

¹Valores baseados nos trabalhos de Zhan e colaboradores (2011) e de Satyanarayana e colaboradores (2015).

5.4.6 Obtenção de curvas analíticas

Após a otimização das variáveis experimentais (pH, tipo de eletrólito de suporte e parâmetros voltamétricos), curvas analíticas foram obtidas para o 5-FU empregando-se o EPCV/AuNps-PFR 1% por meio de VPD, na faixa de concentração $2,99 \times 10^{-5}$ a $2,34 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Foi utilizada uma solução estoque do analito de concentração $1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, com adições de alíquotas de 30 μL à célula eletroquímica. Para fins de comparação, curvas analíticas nas mesmas condições descritas foram construídas para o EPCV não modificado e para o EPCV/PFR 1%. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 49.

Figura 49 – (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com o EPCV/AuNps-PFR 1% na faixa de $2,99 \times 10^{-5}$ a $2,34 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de 5-FU, em tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 8,0, com $t = 20$ ms, $v = 40$ mV s⁻¹; $a = 150$ mV e $E_{\text{step}} = 10$ mV. (B) Curvas analíticas obtidas para o EPCV/AuNps-PFR 1%, EPCV/PFR 1% e EPCV não modificado (média de três determinações para cada eletrodo).



Como pode ser observado, as curvas analíticas indicaram um aumento linear do valor de I_{pa} com o aumento da concentração de 5-FU dentro da faixa estudada para cada um dos eletrodos. Entretanto, observa-se que a inclinação obtida para a curva analítica do EPCV/AuNps-PFR 1% foi superior às observadas para os demais eletrodos, evidenciando assim sua maior sensibilidade ao fármaco em estudo. Pode-se atribuir que o melhor desempenho analítico do EPCV/AuNps-PFR 1% é uma consequência das propriedades do nanocompósito sintetizado, já citadas anteriormente. A maior sensibilidade alcançada sugere, portanto, um aumento na potencialidade de aplicação do sensor desenvolvido para a determinação de 5-FU.

As equações das retas obtidas pela regressão linear das três curvas analíticas são mostradas na Tabela 15, juntamente com o valor da sensibilidade para cada eletrodo (estimada pelo coeficiente angular de cada curva) e os respectivos coeficientes de correlação.

Tabela 15 – Parâmetros analíticos obtidos a partir da regressão linear das curvas para a determinação de 5-FU com o EPCV não modificado, EPCV/PFR 1% e EPCV/AuNps-PFR 1%.

Parâmetro	Eletrodo		
	<i>EPCV não modificado</i>	<i>EPCV/PFR 1%</i>	<i>EPCV/AuNps-PFR 1%</i>
Faixa linear estudada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	29,9 – 234,0	29,9 – 234,0	29,9 – 234,0
Equação da reta	$I_{pa} = -1,051 + 69996,180 (C_{5-FU})$	$I_{pa} = -1,193 + 73129,246 (C_{5-FU})$	$I_{pa} = -0,853 + 153467,874 (C_{5-FU})$
Coefficiente de correlação (R)	0,999	0,999	0,998
Sensibilidade ($\mu\text{A mol}^{-1} \text{L}$)	69,996	73,129	153,874

O aumento linear da I_{pa} com o aumento na concentração de 5-FU possibilitou o cálculo dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para cada eletrodo estudado. O LD pode ser definido como a mais baixa concentração de analito que pode ser detectada, porém não quantificada, pelo método empregado com um nível de certeza razoável, de modo que o sinal analítico produzido seja distinguível do ruído do equipamento. (ARMBRUSTER; PRY, 2008; ANALYTICAL METHODS COMMITTEE, 1987). O LQ, por sua vez, é definido como a menor quantidade de analito que pode ser detectada e quantificada pelo método com um elevado nível de certeza, consistindo em um valor maior que o LD. (ARMBRUSTER; TILLMAN; HUBBS, 1994; CURRIE, 2004).

O LD e o LQ para a determinação de 5-FU para os diferentes eletrodos foram calculados da maneira recomendada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2003), por meio das seguintes equações:

$$LD = \frac{3 \times DP}{b} \quad LQ = \frac{10 \times DP}{b} \quad (13)$$

onde DP é o desvio padrão do intercepto com o eixo Y de três curvas analíticas e b é a inclinação ou coeficiente angular da curva estatística (construída a partir de três curvas analíticas). Os valores de LD e LQ obtidos para cada um dos eletrodos são mostrados na Tabela 16.

Tabela 16 – Valores de LD e LQ obtidos para a determinação de 5-FU com o EPCV não modificado, EPCV/PFR 1% e EPCV/AuNps-PFR 1%.

Eletrodo	LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
EPCV não modificado	7,29	24,30
EPCV/PFR 1%	5,35	17,84
EPCV/AuNps-PFR 1%	0,66	2,22

A partir dos valores de LD e LQ obtidos para cada eletrodo, pode-se verificar novamente a maior sensibilidade e desempenho analítico superior do EPCV/AuNps-PFR 1%, pois valores inferiores para os dois parâmetros foram encontrados para este eletrodo em comparação aos demais. O LD e o LQ alcançados para o EPCV/AuNps-PFR 1% podem ser considerados como satisfatórios para a determinação de 5-FU em amostras de medicamentos e de fluidos biológicos. Além disso, os valores encontrados são comparáveis aos obtidos em outros trabalhos reportados na literatura que utilizam métodos eletroanalíticos, cromatográficos, espectrofotométricos e eletroforéticos, como pode ser visto na Tabela 17.

Tabela 17 – Valores de LD e de LQ obtidos para a determinação de 5-FU por diferentes trabalhos reportados na literatura.

Método	Eletrodo	LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Referência
VPD	ECV/AuNps-NTC ¹	0,020	–	SATYANARAYANA et al., 2015
VPD	EPC/LI ²	0,013	–	ZHAN et al., 2011
VC	ECV/AB/NTC ³	0,270	–	HUA et al., 2013
VPD	ECV na presença de CETAB ⁴	0,020	7,100	SATARADDI; NANDIBEWOOR, 2011
VPD	ECV/PPBC/DNA ⁵	2,383	–	ZEYBEK et al., 2015
VOQ	SPE/AuNps ⁶	0,769	–	WANG, S.; FU; DING, 2012
EC ⁷	–	1,922	6,380	HURTADO-SÁNCHEZ et al., 2015
EC	–	13,223	–	PROCHÁZKOVÁ et al., 2001
HPLC ⁸	–	–	0,768	ZHU et al., 2012
LC-MS ⁹	–	–	0,769	ŠVOBAITĚ et al., 2010
LC ¹⁰	–	1,538	1,922	ALCÁNTARA et al., 2010
HPLC	–	–	7,688	SANSON et al., 2011
SERS ¹¹	–	15,38	–	FARQUHARSON et al., 2005
UV-VIS	–	3,08	–	BADEA et al., 2002
QL ¹²	–	0,231	–	SUN, H.; LI; CHEN, 2007
VPD	EPCV/AuNps-PFR 1%	0,66	2,22	Este trabalho

¹ECV/AuNps-NTC: eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de ouro e nanotubos de carbono de paredes múltiplas; ²EPC/LI: eletrodo de pasta de carbono modificado com líquido iônico (hexafluorofosfato de 1-butilpiridínio); ³ECV/AB/NTC: eletrodo de carbono vítreo modificado com azul de bromotimol e nanotubos de carbono de paredes múltiplas; ⁴CETAB: brometo de cetiltrimetilamônio; ⁵ECV/PPBC/DNA: eletrodo de carbono vítreo modificado com poli(púrpura de bromocresol) e DNA; ⁶SPE/AuNps: eletrodo impresso modificado com nanopartículas de ouro; ⁷EC: eletroforese capilar; ⁸HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência; ⁹LC-MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas; ¹⁰LC: cromatografia líquida; ¹¹SERS: espectroscopia Raman amplificada por superfície; ¹²QL: quimioluminescência.

A precisão do EPCV/AuNps-PFR 1% para a determinação de 5-FU foi avaliada por meio da determinação dos níveis de repetibilidade (precisão intra-corrída) e precisão intermediária (precisão inter-corrída) da resposta voltamétrica gerada pelo sensor na presença do analito, assim como a partir do nível de reprodutibilidade de preparação do

eletrodo modificado. Para a determinação da repetibilidade de medida foi realizada uma série de dez medidas ($n = 10$) de VPD sucessivas, nas condições experimentais otimizadas e no mesmo dia, com o EPCV/AuNps-PFR 1% na presença de $5,96 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de 5-FU. A precisão intermediária, por sua vez, foi avaliada por meio da realização de cinco medidas ($n = 5$) com um mesmo EPCV/AuNps-PFR 1%, em dias e em soluções diferentes, igualmente na presença de $5,96 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ do analito. Para a determinação da reprodutibilidade de preparação dos eletrodos, foram preparados cinco EPCV/AuNps-PFR 1%, e cada um deles testado na mesma concentração empregada nos estudos anteriores.

Os resultados de repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade de preparação do eletrodo foram expressos em termos de porcentagem de desvio padrão relativo à média (%DPR) entre as I_{pa} obtidas, sendo este calculado por meio da seguinte relação:

$$\%DPR = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\% \quad (14)$$

onde s é a estimativa do desvio padrão das I_{pa} obtidas em cada caso e \bar{x} é a média aritmética simples das mesmas. Os resultados para os estudos de precisão são mostrados na Tabela 18.

Tabela 18 – Resultados para repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade de preparação do eletrodo para a determinação de 5-FU com o EPCV/AuNps-PFR 1%.

Parâmetro	%DPR
Repetibilidade	3,12
Precisão intermediária	4,00
Reprodutibilidade	3,42

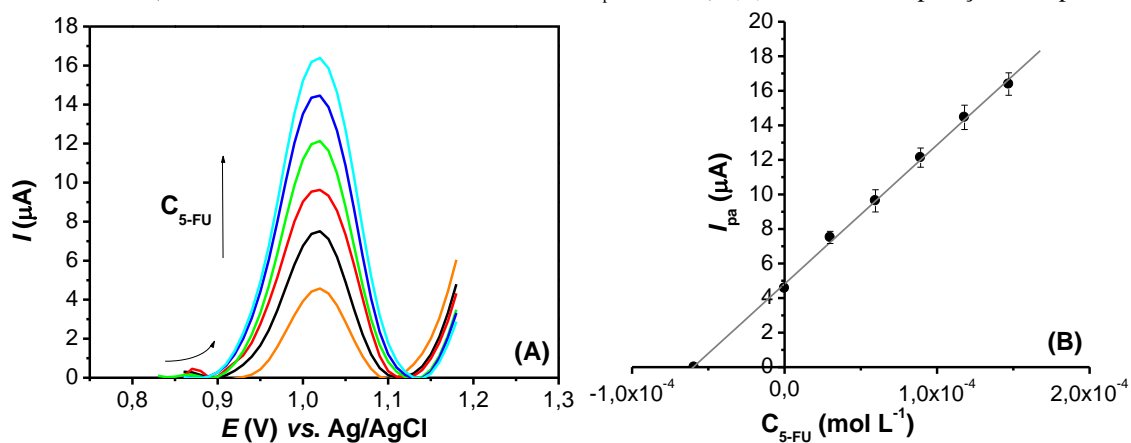
Segundo a ANVISA, considera-se um %DPR igual a 5% como o máximo aceitável em estudos de precisão para metodologias analíticas. (BRASIL, 2003). Verifica-se, portanto, que bons níveis de precisão foram encontrados para a determinação de 5-FU com o EPCV/AuNps-PFR, tanto no que diz respeito à resposta gerada pelos eletrodos, quanto à sua preparação. Neste sentido, tais resultados sugerem uma boa potencialidade analítica para o sensor desenvolvido.

5.4.7 Ensaios de recuperação

A seguir, ensaios de recuperação de 5-FU em eletrólito suporte puro (tampão BR 0,04 mol L⁻¹ em pH 8,0) foram realizados utilizando-se VPD a fim de se verificar quanto da amostra de 5-FU adicionada pode ser realmente quantificada pelo EPCV/AuNps-PFR 1%. Tais estudos foram realizados utilizando-se o método da adição padrão, e seus resultados podem ser tomados como uma medida da viabilidade de utilização do sensor desenvolvido para a determinação do fármaco em amostras reais, como de medicamentos e fluidos biológicos.

Assim, adicionou-se inicialmente ao eletrólito uma alíquota de 60 μL da solução padrão de 5-FU 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹, de modo a se obter uma concentração de 5,96 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ na célula eletroquímica, registrando-se na sequência o voltamograma resultante. Seguiu-se então a adição de alíquotas da mesma solução padrão, na faixa de 2,99 x 10⁻⁵ a 1,47 x 10⁻⁴ mol L⁻¹, registrando-se o voltamograma a cada adição. Tais experimentos foram realizados em triplicata, e os resultados são mostrados na Figura 50.

Figura 50 – (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em estudo de recuperação em eletrólito puro (tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 8,0) para 5-FU, com as concentrações do analito variando de 2,99 x 10⁻⁵ a 1,47 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ ($t = 20$ ms, $v = 40$ mV s⁻¹; $a = 150$ mV e $E_{\text{step}} = 10$ mV). (B) Curva de recuperação extrapolada.



Na Tabela 19 a seguir são apresentados os valores de recuperação para cada replicata realizada, assim como as médias obtidas nos três ensaios. Verifica-se que os mesmos estão dentro dos padrões aceitáveis, uma vez que todos aproximaram-se do valor ideal de 100,0%, o que evidencia a potencialidade de aplicação do EPCV/AuNps-PFR 1% na determinação de 5-FU em amostras reais.

Tabela 19 – Resultados para estudo de recuperação em eletrólito puro 5-FU empregando-se o EPCV/AuNps-PFR 1%.

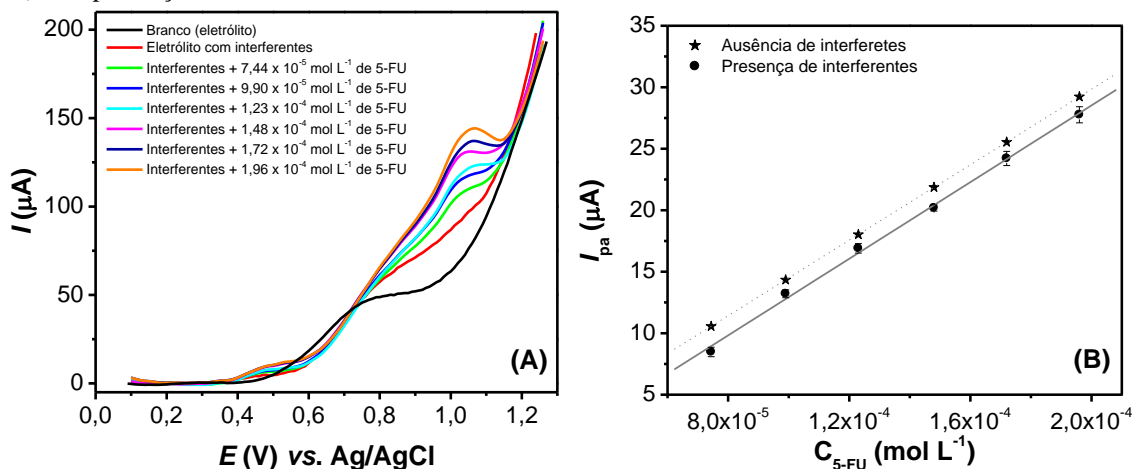
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média	Desvio padrão	DPR (%)
$C_{\text{adicionada}}$ (10^{-5} mol L ⁻¹)	5,96	5,96	5,96	5,96	–	–
$C_{\text{recuperada}}$ (10^{-5} mol L ⁻¹)	6,05	5,81	5,92	5,93	$1,20 \times 10^{-6}$	2,027
Recuperação (%)	101,61	97,47	99,38	99,49	2,072	2,083

5.4.8 Estudo de interferentes

Para uma possível aplicação do EPCV/AuNps-PFR 1% na determinação de 5-FU em amostras biológicas, o efeito de alguns interferentes na resposta do eletrodo modificado para o fármaco foi a seguir avaliado. Os interferentes escolhidos para serem estudados são compostos comumente presentes em amostras de soro sanguíneo, tendo-se selecionado substâncias moleculares (glicose, ácido ascórbico e ureia) e iônicas (Na⁺ e K⁺). Avaliou-se também o efeito da proteína albumina, a qual, dentre as proteínas séricas, é a que existe em maior concentração no soro (3,5 a 5,5 g/dL). (LUCIANO et al., 2010).

As concentrações empregadas para os interferentes no estudo foram estabelecidas com base nos níveis normais apresentados para cada um *in vivo* (glicose: 850,0 mg L⁻¹; ácido ascórbico: 10,0 mg L⁻¹; ureia: 250,0 mg l⁻¹; Na⁺: 140,0 mmol L⁻¹; K⁺: 4,5 mmol L⁻¹; albumina: 3,0 g L⁻¹). (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2000; BARBOSA; ANDRADE, 2008; JOHNSON; DUICK, 2002; LUCIANO et al., 2010; ROCHA, 2011; SOCIETY OF CRITICAL CARE MEDICINE, 1999). A concentração de 5-FU, por sua vez, foi variada na faixa de $7,44 \times 10^{-5}$ a $1,96 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Os voltamogramas de pulso diferencial obtidos são mostrados na Figura 51, juntamente com a curva analítica resultante.

Figura 51 – (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em diferentes concentrações de 5-FU na presença de glicose (850,0 mg L⁻¹), ácido ascórbico (10,0 mg L⁻¹), ureia (250,0 mg L⁻¹), Na⁺ (140,0 mmol L⁻¹), K⁺ (4,5 mmol L⁻¹) e albumina (3,0 g L⁻¹). (B) Curvas analíticas obtidas para o 5-FU na ausência (valores de corrente calculados a partir da equação da reta para o EPCV/AuNps-PFR apresentada na Tabela 13) e na presença dos interferentes estudados.



Pode-se verificar que, dentro da faixa de potenciais estudada, nenhum pico de corrente definido foi apresentado para os interferentes. Entretanto, o pico característico para o 5-FU pode ser claramente observado (Figura 51A), e sua intensidade de corrente aumentou de modo linear e reprodutível com o aumento na concentração do fármaco (Figura 51B; equação da reta: $I_{pa} (\mu\text{A}) = -2,53 + 154929,17 C_{5-FU} (\text{mol L}^{-1})$, com $R = 0,997$). Verifica-se ainda que a curva analítica obtida na presença dos interferentes apresentou uma inclinação similar à obtida em eletrólito suporte puro. Isto sugere que o EPCV/AuNps-PFR 1% apresentou seletividade para o 5-FU e não sofreu interferência significativa dos interferentes estudados, evidenciando a sua potencialidade de aplicação na determinação futura do analito em amostras biológicas para procedimentos clínicos.

A influência direta de cada interferente sobre a magnitude da corrente gerada pela oxidação do 5-FU foi também investigada. Para isto, cada interferente foi testado individualmente na presença de $8,26 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de 5-FU, e a I_{pa} resultante foi comparada à I_{pa} obtida pela oxidação de uma mesma concentração do fármaco na ausência dos interferentes. A Tabela 20 mostra os resultados alcançados, sendo as variações de I_{pa} expressas em porcentagem.

Tabela 20 – Influência de potenciais interferentes biológicos na resposta do EPCV/AuNps-PFR 1% para $8,26 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de 5-FU.

Interferente	Concentração	Varição I_{pa} (%)
Glicose	850 mg L ⁻¹	-1,68
Ácido ascórbico	10 mg L ⁻¹	-0,14
Ureia	250 mg L ⁻¹	+0,80
Na ⁺	140 mmol L ⁻¹	-0,23
K ⁺	4,5 mol L ⁻¹	-0,80
Albumina	3 g L ⁻¹	+4,23

Verifica-se que todas as variações de I_{pa} observadas estiveram abaixo de $\pm 5,00\%$, valor considerado por Pattar e Nandibewoor (2015) como o limite de tolerância para a interferência de espécies químicas na determinação eletroanalítica de 5-FU. Assim, pode-se afirmar que nenhuma das espécies analisadas influenciou de modo significativo a resposta do EPCV/AuNps-PFR 1% para a detecção do fármaco em estudo. Tais resultados confirmam que o sensor desenvolvido pode ser uma alternativa viável para a determinação e monitoramento de 5-FU em amostras de fluidos biológicos, como soro sanguíneo e também urina, mesmo na presença de interferentes.

5.4.9 Ensaio de recuperação em formulação farmacêutica comercial

A possibilidade de aplicação do EPCV/AuNps-PFR 1% para a determinação de 5-FU em amostra de formulação farmacêutica comercial foi avaliada por meio da realização de ensaios de recuperação por VPD empregando amostras do medicamento FAULDFLUOR[®] (5-fluorouracil 50 mg mL⁻¹), na forma de solução injetável. Novamente, foi empregado o método da adição de padrão. Após a adição de uma concentração conhecida da solução estoque preparada a partir da diluição medicamento, seguiram-se adições de alíquotas da solução padrão de 5-FU na faixa de $2,99 \times 10^{-5}$ a $1,47 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, obtendo-se o voltamograma correspondente a cada adição. Tais experimentos foram realizados em quintuplicata, e os resultados são mostrados na Figura 52 e na Tabela 21.

Figura 52 – (A) Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em estudo de recuperação de 5-FU em amostra de formulação farmacêutica injetável (tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 8,0), com as concentrações do analito variando de 2,99 x 10⁻⁵ a 1,47 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ ($t = 20$ ms, $v = 40$ mV s⁻¹; $a = 150$ mV e $E_{\text{step}} = 10$ mV). (B) Curva de recuperação extrapolada.

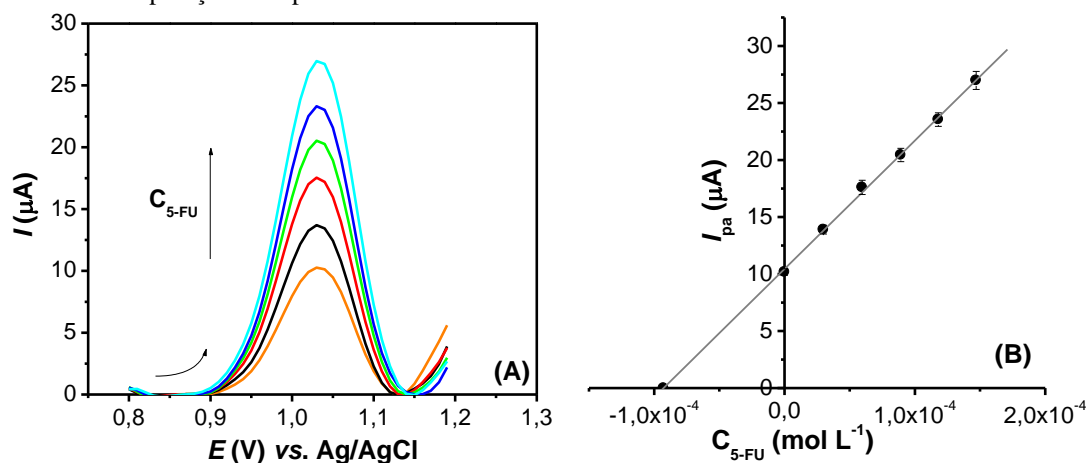


Tabela 21 – Resultados obtidos por VPD para o estudo de recuperação em amostra de formulação farmacêutica injetável empregando-se o EPCV/AuNps-PFR 1%.

C_{rot}^1 (mg mL ⁻¹)	C_{det}^2 (mg mL ⁻¹)	C_{ad}^3 (μg mL ⁻¹)	C_{det}^4 (μg mL ⁻¹)	Recuperação (%)
50,0	53,3	11,6	12,4	106,6
50,0	53,0	11,6	12,3	106,0
50,0	50,9	11,6	11,8	101,9
50,0	52,1	11,6	12,1	104,2
50,0	50,7	11,6	11,8	101,4
Média	52,0	–	12,1	104,0
Desvio padrão	1,18	–	0,28	2,34
%DPR	2,28	–	2,29	2,25

¹ C_{rot} : composição rotulada e declarada pelo fabricante; ² C_{det} : composição determinada com o EPCV/AuNps-PFR 1%; ³ C_{ad} : concentração de 5-FU adicionada à célula eletroquímica; ⁴ C_{det} : concentração determinada na célula eletroquímica com o EPCV/AuNps-PFR 1%.

Verifica-se que uma recuperação média igual a 104,0%, com uma %DPR igual a 2,25%, foi obtida para a determinação de 5-FU na amostra analisada com o EPCV/AuNps-PFR 1%. Os valores de composição determinados para o medicamento com o método voltamétrico desenvolvido aproximaram-se do valor rotulado, e estão dentro dos limites estabelecidos pela Farmacopeia Americana (45 a 55 mg mL⁻¹, equivalentes a recuperações no intervalo entre 90,0 a 110,0%) (USP, 2007) para a determinação de 5-FU em medicamentos na forma injetável.

Os resultados obtidos para a análise da formulação farmacêutica confirmaram a exatidão da metodologia voltamétrica desenvolvida com o EPCV/AuNps-PFR 1% para a determinação de 5-FU. Além da exatidão apresentada, é importante mencionar o seu bom nível de precisão, uma vez que os desvios padrões relativos resultaram em valores abaixo de 5%. É conveniente destacar ainda a praticidade do método desenvolvido, uma vez que não foram necessárias etapas prévias de extração do princípio ativo a partir da amostra para a obtenção de resultados satisfatórios, indicando que a método voltamétrico apresentado pode conduzir a análises mais rápidas. Neste sentido, pode-se afirmar que o EPCV/AuNps-PFR 1%, aliado à técnica de VPD, constitui em uma alternativa viável para a determinação do agente antitumoral estudado em amostras reais de medicamentos, e com alto potencial de aplicação para a quantificação do mesmo também em amostras de fluidos biológicos, como soro sanguíneo e urina.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho, um novo sensor eletroquímico para o agente antitumoral 5-fluorouracil foi desenvolvido, baseado na modificação de eletrodos de pasta de carbono vítreo com um nanocompósito constituído por nanopartículas de ouro estabilizadas no polissacarídeo sulfatado PFR, obtido a partir de algas vermelhas.

A caracterização espectroscópica do polissacarídeo extraído, realizada por meio de FTIR e RMN-¹³C, confirmou a estrutura do mesmo, típica para as porfiranas. Além disso, a determinação da sua composição química evidenciou um teor de açúcar total e de grupos sulfato iguais a 82,8% e 11,9%, respectivamente, os quais foram condizentes com o esperado e concordaram com trabalhos anteriores.

A PFR obtida mostrou ser um eficiente agente redutor e estabilizante para a formação de nanopartículas de ouro. Após a otimização das condições experimentais de síntese via planejamento fatorial 2³ com triplicata no ponto central, verificou-se que a uma temperatura de 70 °C, com concentrações de [AuCl₄⁻] e de PFR iguais a 2,5 mmol L⁻¹ e 0,25 mg mL⁻¹, respectivamente, um menor tamanho de partícula (128,7 nm) foi obtido. Além disso, constatou-se que a interação de terceira ordem entre as variáveis estudadas foi significativa para a resposta a um nível de confiança de 95%, demonstrando que os efeitos de cada fator devem ser interpretados conjuntamente. A suspensão de AuNps-PFR sintetizada nas condições ótimas mostrou ser relativamente estável, com um valor de potencial-ζ igual a -30,5 mV, não demonstrando variações significativas da banda plasmônica durante três meses. Este comportamento pode ser tomado como consequência da pequena variação de tamanho do tamanho das partículas após o intervalo de tempo mencionado (128,7 nm para 149,2 nm), o que confirma a estabilidade das partículas sintetizadas.

A modificação dos EPCV com o nanocompósito AuNps-PFR ocasionou uma considerável melhora em suas propriedades eletroquímicas, gerando maiores valores de corrente e uma menor resistência à transferência de carga para o processo redox da sonda [Fe(CN)₆]^{3-/4-}, em comparação aos eletrodos sem modificação e aos modificados apenas com o polissacarídeo. Este comportamento é uma consequência das propriedades apresentadas pelas AuNps, como alta condutividade elétrica e elevada área superficial.

Melhores respostas de corrente também foram apresentadas pelo EPCV/AuNps-PFR na presença do agente antitumoral 5-FU, que foi oxidado na superfície do eletrodo

segundo um mecanismo difusional e dependente do pH do meio, apresentando um processo anódico e irreversível por volta de +1,1 V em tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 8,0. Utilizando-se VPD, verificou-se que o eletrodo modificado apresentou resposta de corrente linear para o 5-FU na faixa de $2,99 \times 10^{-5}$ a $2,34 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, mostrando ainda uma maior sensibilidade ao analito quando comparado ao EPCV/PFR e ao EPCV não modificado. Os valores calculados para o LD (0,66 μmol L⁻¹) e o LQ (2,22 μmol L⁻¹) foram satisfatoriamente baixos e comparáveis aos de outros métodos existentes na literatura para a determinação do fármaco estudado. Bons níveis de repetibilidade e reprodutibilidade de resposta foram obtidos para o sensor desenvolvido, que mostrou ainda não sofrer interferência significativa de compostos (glicose, ácido ascórbico, ureia e albumina) e íons (Na⁺ e K⁺) frequentemente presentes em amostras biológicas, o que sugere que o mesmo possui potenciais aplicações para a detecção do analito em procedimentos clínicos.

Estudos de recuperação de 5-FU em formulação farmacêutica comercial confirmaram o desempenho analítico promissor do EPCV/AuNps-PFR para a quantificação do fármaco. A porcentagem de recuperação média obtida foi de 104,0%, com um DPR aceitável e igual a 2,25%, evidenciando a exatidão e precisão apresentadas pelo eletrodo modificado para a determinação do analito em amostras reais.

Por fim, os resultados obtidos permitiram concluir que a modificação dos EPCVs com o nanocompósito AuNps-PFR ocasionou um incremento significativo em seu desempenho eletroquímico, como consequência da pronunciada condutividade elétrica e da elevada área superficial apresentadas pelo nanomaterial. A metodologia voltamétrica desenvolvida com o eletrodo modificado para a determinação de 5-FU mostrou características positivas, de modo que a mesma pode ser considerada uma alternativa simples, rápida e eficiente a ser aplicada no controle de qualidade de medicamentos quimioterápicos que possuam o fármaco estudado em sua formulação.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

O desenvolvimento deste trabalho possibilitou reconhecer aspectos que podem ser empregados como temas em trabalhos futuros. Neste sentido, como perspectivas para a continuação dos estudos realizados, pode-se destacar:

- Verificar a influência da utilização de outros agentes redutores considerados verdes (como glicose e ácido ascórbico) para a síntese das AuNps-PFR;
- Caracterização das AuNps-PFR por microscopia eletrônica de transmissão (MET);
- Obtenção de nanocompósitos a partir da incorporação das AuNps em nanomateriais à base de carbono (como grafeno ou nanotubos), para posterior aplicação na modificação de eletrodos de pasta de carbono;
- Realização de ensaios analíticos para a completa validação da metodologia desenvolvida (como robustez e especificidade);
- Aplicação do EPCV/AuNps-PFR 1% para a determinação de 5-FU na forma farmacêutica creme, assim como em matrizes biológicas, como sangue e urina;
- Aplicação do EPCV/AuNps-PFR 1% para determinação de outros agentes antitumorais, como cisplatina, carboplatina, clorambucil, capecitabina e doxorrubicina, entre outros.
- Utilizar o EPCV/AuNps-PFR como plataforma para imobilização de anticorpos a fim de se desenvolver imunossensores eletroquímicos para a detecção de biomarcadores de câncer e de doenças infecciosas e neurológicas.

REFERÊNCIAS

ADAMS, F. C.; BARBANTE, C. Nanoscience, nanotechnology and spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 86, p. 3-13, 2013.

AFKHAMY, A. KHOSHSAFAR, H.; BAGHERI, H.; MADRAKIAN, T. Construction of a carbon ionic liquid paste electrode based on multi-walled carbon nanotubes-synthesized Schiff base composite for trace electrochemical detection of cadmium. **Materials Science and Engineering C**, v. 35, p. 8-14, 2014.

AFKHAMY, A.; MADRAKIAN, T.; SABOUNCHEI, S. J.; REZAEI, M.; SAMIEE, S.; POURSHAHBAZ, M. Construction of a modified carbon paste electrode for the highly selective simultaneous electrochemical determination of trace amounts of mercury(II) and cadmium(II). **Sensors and Actuators B**, v. 161, p. 542-548, 2012.

AFKHAMI, A.; SOLTANI-FELEHGARI, F.; MADRAKIAN, T. Gold nanoparticles modified carbon paste electrode as an efficient electrochemical sensor for rapid and sensitive determination of cefixime in urine and pharmaceutical samples. **Electrochimica Acta**, v. 103, p. 125-133, 2013.

AFZALI, D.; ZAREI, S.; FATHIRAD, F.; MOSTAFAVI, A. Gold nanoparticles modified carbon paste electrode for differential pulse voltammetric determination of eugenol. **Materials Science and Engineering C**, v. 43, p. 97-101, 2014.

AGOSTINHO, S. M. L.; VILLAMIL, R. F. V.; AGOSTINHO NETO, A.; ARANHA, H. O eletrólito suporte e suas múltiplas funções em processos de eletrodo. **Química Nova**, v. 27, n. 05, p. 813-817, 2004.

ALCÂNTARA, A. M. P. P.; VITOR, R. V.; VIEIRA, E. P.; MARTINS, I. Simultaneous detection of three antineoplastic drugs on gloves by liquid chromatography with diode array detector. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 4, p. 731-740, 2010.

ALKIRE, R. C.; KOLB, D. M.; LIPKOWSKI, J.; ROSS P. N. (Eds.) **Chemically modified electrodes**. Advances in Electrochemical Science and Engineering, v. 11. Weinheim: Wiley-VCH, 2010.

ALEXANDRIDIS, P. Gold nanoparticle Synthesis, morphology control, and stabilization facilitated by functional polymers. **Chemical Engineering and Technology**, v. 34, n. 1, p. 15-28, 2011.

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPES, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Screening for type 2 diabetes. **Clinical Diabetes**, v. 18, n. 2, 2000. Disponível em: <<http://journal.diabetes.org/clinicaldiabetes/v18n22000/pg69.htm>>. Acesso em: 23 dez. 2015.

AN, B.; ZHAO, D. Immobilization of As(III) in soil and groundwater using a new class of polysaccharide stabilized Fe–Mn oxide nanoparticles. **Journal of Hazardous Materials**, v. 211-212, p. 332-341, 2012.

ANALYTICAL METHODS COMMITTEE. Recommendations for the definition, estimation and use of the detection limit. **Analyst**, v. 112, p. 199-204, 1987.

ANDRADE, L. S. Simultaneous differential pulse voltammetric determination of sulfamethoxazole and trimethoprim on a boron-doped diamond electrode. **Electroanalysis**, v. 21, n° 13, p. 1475-1480, 2009.

ARMBRUSTER, D. A.; PRY, T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. **The Biochemical Reviews**, v. 29, p. S49-S50, 2008.

ARMBRUSTER, D. A.; TILLMAN, M. D.; HUBBS, L. M. Limit of detection (LOD)/limit of quantitation (LOQ): comparison of the empirical and the statistical methods exemplified with GC-MS assays of abused drugs. **Clinical Chemistry**, v. 40, n. 7, p. 1233-1238, 2004.

ARVAND, M.; DEHSARAEI, M. A simple and efficient electrochemical sensor for folic acid determination in human blood plasma based on gold nanoparticles–modified carbon paste electrode. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, p. 3474-3480, 2013.

BADEA, I.; MOJA, D.; TUDOSE, A.; STOICESCU, D. Determination of the 5-fluorouracil and N1(2'-furanidyl)uracil in the presence of tegafur by zero-crossing first derivative spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 30, p. 1371-1378, 2002.

BAIK, H. J.; HONG, S.; PARK, S. Surface plasmon modes of gold nanospheres, nanorods, and nanoplates in an organic solvent: phase-transfer from aqueous to organic media. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 358, p. 317-322, 2011.

BALAVANDY, S. K.; SHAMELI, K.; BIAK, D. R. B. A.; ABIDIN, Z. Z. Stirring time effect of silver nanoparticles prepared in glutathione mediated by green method. **Chemistry Central Journal**, v. 8, p. 11-20, 2014.

BARBOSA, A. C.; ANDRADE, T. C. Interferência do ácido ascórbico na dosagem glicêmica. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 6, n. 2, p. 121-130, 2008.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. 2nd edition. New York: John Wiley & Sons, 2001.

BELLIDO-MILLA, D.; CUBILLANA-AGUILERA, L. M.; KAOUTIT, M. E.; HERNANDÉZ-ARTIGA, M. P.; CISNEROS, J. L. H.; NARANJO-RODRIGUÉZ, I.; PALACIOS-SANTANDER, J. M. Recent advances in graphite powder-based electrodes. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 3525-3539, 2013.

BENDIVI, A.; KAKOOLAKI, P.; GORJI, A. R.; MAZLOUM-ARKADANI, M.; ZARE, H. R.; VAFAZADEH, R. Application of Co(II) complex multi-wall carbon nanotube modified carbon paste electrodes for electrocatalytic determination of hydroxylamine. **Analytical Methods**, v. 5, p. 6649-6655, 2013.

BEYTH, N.; HOURI-HADDAD, Y.; DOMB, A.; KHAN, W.; HAZAN, R. Alternative antimicrobial approach: nano-antimicrobial materials. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, article ID 246012, p. 1-16, 2015.

BHATIA, S.; SHARMA, A.; SHARMA, K.; KAVALE, M.; CHAUGULE, B. B.; DHALWAL, K.; NAMDEO, A. G.; MAHADIK, K. R. Novel algal polysaccharides from marine source: porphyran. **Pharmacognosy Reviews**, v. 2, n. 4, p. 271-276, 2008.

BLOSI, M.; ALBONETTI, S.; GATTI, G.; BALDI, G.; DONDI. Au-Ag nanoparticles as red pigment in ceramic inks for digital decoration. **Dyes and Pigments**, v. 94, p. 355-362, 2012.

BRASIL. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003**. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos"; fica revogada a Resolução RE nº 475, de 19 de março de 2002. Disponível em http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em 20 dez.2003.

BREDA, M.; BARATTÈ, S. A review of analytical methods for the determination of 5-fluorouracil in biological matrices. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, p. 1191-1201, 2010.

BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O. **Electrochemistry: principles, methods, and applications**. New York: Oxford University Press, 1993.

BRONDANI, D.; PIOVESAN, J. V.; WESTPHAL, E.; GALLARDO, H.; DUTRA, R. A. F.; SPINELLI, A.; VIEIRA, I. C. A label-free electrochemical immunosensor based on an ionic organic molecule and chitosan-stabilized gold nanoparticles for the detection of cardiac troponin T. **Analyst**, v. 139, p. 5200-5208, 2014.

BURKE, L. D.; NUGENT, P. F. The electrochemistry of gold: I The redox behavior of the metal in aqueous media. **Gold Bulletin**, v. 30 n. 2, p. 43-53, 1997.

BURTON, A. W.; ONG, K.; REA, T.; CHAN, I. Y. On the estimation of average crystallite size of zeolites from the Scherrer equation: a critical evaluation of its application to zeolites with one-dimensional pore systems. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 117, p. 75-90, 2009.

BUZEA, C.; PACHECO, I. I.; ROBBIE, K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. **Biointerphases**, v. 2, n. 4, p. 17-96, 2007.

CALAÇA, G. N.; MACHADO, S.; WOHNATH, K.; PESSOA, C. A.; NAGATA, N. Simultaneous electroanalytical determination of depigmenting agents in skin-whitening products. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 162, n. 12, H847-H851, 2015.

CALIXTO, C. M. F.; SANTOS, S. X.; CAVALHEIRO, E. T. G. Eletrodo compósito à base de grafite-araldite®: aplicações didáticas – parte II. **Química Nova**, v. 37, n. 2, p. 367-372, 2014.

CARBON. Disponível em: <
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/484164?lang=pt®ion=BR>>.
Acesso em 20 jan. 2016.

CASELLA, I. G.; CONTURSI, M. Electrocatalytic oxidation and flow detection analysis of semicarbazide at based IrO_x chemically modified electrodes. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 209, p. 25-31, 2015.

CASTRO, E. G. **Nanopartículas de platina e seus nanocompósitos com nanotubos e outras formas de carbono: preparação, caracterização e propriedades**. 2009, 162 f. Tese (Doutorado em Química Inorgânica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

CATALDI, T. R. I.; GUERRIERI, A.; PALMISANO, F.; ZAMBONIN, P. G. Determination of the anticancer drug 5-fluorouracil added to blood serum by liquid chromatography with anodic amperometric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 207, p. 183-194, 1988.

CAVALCANTI, H. E.; LIMA, D.; PESSÔA, C. A.; VIANA, A. G. Voltammetric behavior of carbono paste electrodes with native and chemical modified porphyrans. **ECS Transactions**, v. 61, n. 19, p. 37-48, 2014.

CHEN, J.; HUANG, H.; ZENG, Y.; TANG, H.; LI, L. A novel composite of molecularly imprinted polymer-coated PdNPs for electrochemical sensing norepinephrine. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 65, p. 366-374, 2015.

CHEN, Q.; SWAIN, G. M. Structural characterization, electrochemical reactivity, and response stability of hydrogenated glassy carbon electrodes. **Lagmuir**, v. 14, p. 7017-7026, 1998.

ÇIFTÇI, H.; TAMER, U.; METIN, A. Ü.; ALVER, E.; KIZIR, N. Electrochemical copper (II) sensor based on chitosan covered gold nanoparticles. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 44, p. 563-571, 2014.

COSTA, L. S.; FIDELIS, G. P.; CORDEIRO, S. L.; OLIVEIRA, R. M.; SABRY, D. A.; CÂMARA, R. B. G.; NOBRE, L. T. D. B.; COSTA, M. S. S. P.; ALMEIDA-LIMA, J.; FARIAS, E. H. C.; LEITE, E. L.; ROCHA, R. A. O. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 64, p. 21-28, 2010.

CROUZIER, T.; BOUDOU, T.; PICART, C. Polysaccharide-based polyelectrolyte multilayers. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 15, n. 6, p. 417-426, 2010.

CURRIE, L. A. Detection and quantification limits: basic concepts, international harmonization, and outstanding (“low-level”) issues. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 6, p. 145-149, 2004.

DEHDASHTIAN, S.; GHOLIVAND, M. B.; SHAMSIPUR, M.; KARIMINIA, S. Construction of a sensitive and selective sensor for morphine using chitosan coated Fe₃O₄ magnetic nanoparticle as a modifier. **Materials Science and Engineering C**, v. 58, p. 53-59, 2016.

DEKANSKI, A.; STEVANOVIĆ, J.; STEVANOVIĆ, R.; NIKOLIĆ, B. Ž.; JOVANOVIĆ, V. M. Glassy carbon electrodes I. Characterization and electrochemical activation. **Carbon**, v. 39, p. 1195-1205, 2001.

DENG, P.; XU, Z.; FENG, Y. Acetylene black paste electrode modified with graphene as the voltammetric sensor for selective determination of tryptophan in the presence of high concentrations of tyrosine. **Materials Science and Engineering C**, v. 35, p. 54-60, 2014.

DEVI, R. V.; DOBLE, M.; VERMA, R. S. Nanomaterials for early detection of cancer biomarker with special emphasis on gold nanoparticles in immunoassays/sensors. **Biosensor and Bioelectronics**, v. 68, p. 688-698 2015.

DOGSON, K. S.; PRICE, R. G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. **Biochemical Journal**, v. 84, p. 106-110, 1962.

DUAN, H.; WANG, D.; LI, Y. Green chemistry for nanoparticle synthesis. **Chemical Society Reviews**, v. 44, p. 5778-5792, 2015.

DUBOIS, M. G.; GILLES, K.; HAMILTON, J.; REBERS, P.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

DUMUR, F.; GUERLIN, A.; DUMAS, E.; BERTIN, D.; GIGMES, D.; MAYER, C. R. Controlled spontaneous generation of gold nanoparticles assisted by dual reducing and capping agents. **Gold Bulletin**, v. 44, p. 119-137, 2011.

ĐUROVIĆ, M. D.; PUČTA, R.; BUGARČIĆ, Ž. D.; ELDIK, R. Studies on the reactions of $[\text{AuCl}_4]^-$ with different nucleophiles in aqueous solution. **Dalton Transactions**, v. 43, p. 8620-8632, 2014.

DYKMAN, L.; KHLEBTSOV, N. Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives. **Chemical Society Reviews**, v. 41, p. 2256-2282, 2012.

ENGELBREKT, C.; SØRENSEN, K. H.; ZHANG, J.; WELINDER, A. C.; JENSEN, P. S.; ULSTRUP, J. Green synthesis of gold nanoparticles with starch–glucose and application in bioelectrochemistry. **Journal of Materials Chemistry**, v. 19, p. 7839-7847, 2009.

ERDEM, A.; CONGUR, G.; MESE, F. Electrochemical detection of activated protein C using an aptasensor based on PAMAM dendrimer modified pencil graphite electrodes. **Electroanalysis**, v. 26, p. 2580-2590, 2014.

FAGAN-MURPHY, A.; ALLEN, M. C.; PATEL, B. A. Chemically modified multiwall carbon nanotube composite electrodes: an assessment of fabrication strategies. **Electrochimica Acta**, v. 152, p. 249-254, 2015.

FARQUHARSON, S.; GIFT, A. D.; SHENDE, C.; MAKSYMIUK, P.; INSCORE, F. E.; MURRAN, J. Detection of 5-fluorouracil in saliva using surface-enhanced Raman spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 38, p. 79-84, 2005.

FILIPPONI, L.; SUTHERLAND, D. **Nanotechnologies: principles, applications, implications and hands-on activities – a compendium for educators**. Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2012.

FONG, K. E.; YUNG, L. L. Localized surface plasmon resonance: a unique property of plasmonic nanoparticles for nucleic acid detection. **Nanoscale**, v. 5, p. 12043-12071, 2013.

GAN, P.; FOORD, J. S.; COMPTON, R. G. Ionic liquid-carbon nanotube modified screen-printed electrodes and their potential for adsorptive stripping voltammetry. **Electroanalysis**, 26, p. 1886-1892, 2014.

GHASEMINEZHAD, S. M.; HAMED, S.; SHOJAOSADATI, S. A. Green synthesis of silver nanoparticles by a novel method: comparative study of their properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p. 467-472, 2012.

GHOLIVAND, M. B.; MOHAMMADI-BEHZAD, L. Differential pulse voltammetric determination of metformin using copper-loaded activated charcoal modified electrode. **Analytical Biochemistry**, v. 438, n. 1, p. 53-60, 2013.

GHOLIVAND, M. B.; TORKASHVAND, M.; YAVARI, E. Electrooxidation behavior of warfarin in Fe₃O₄ nanoparticles modified carbon paste electrode and its determination in real samples. **Materials Science and Engineering C**, p. 235-242, 2015.

GLASSY CARBON. Disponível em <<http://www.als-japan.com/1408.html>>. Acesso em: 23 jan. 2015.

HAN, M.; LIU, S.; BAO, J.; DAI, Z. Pd nanoparticle assemblies—As the substitute of HRP, in their biosensing applications for H₂O₂ and glucose. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 31, p. 151-156, 2012.

HARRIS, P. J. F. Fullerene-related structure of commercial glassy carbons. **Philosophical Magazine**, v. 84, n. 29, p. 3159-3167, 2004.

_____. Structure of non-graphitising carbons. **International Materials Reviews**, v. 42, n. 5, p. 206-218, 1997.

HE, Q. Investigation of stabilization mechanisms for colloidal suspension using nanoparticles. **Electronic Theses and Dissertations**, paper 593, University of Louisville, 2014. Disponível em: <http://muri.lci.kent.edu/References/NIM_Papers/stabilization_of_NP_suspensions/2002_Shi_steric_stabilization.pdf>. Acesso em: 6 jan. 2016.

HEIDELBERGER, C.; ANSFELD, F. J. Experimental and clinical use of fluorinated pyrimidines in cancer chemotherapy. **Cancer Research**, v. 23, p. 1226-1246, 1963.

HOLZWARTH, U.; GIBSON, N. The Scherrer equation versus the ‘Debye-Scherrer equation’. **Nature Nanotechnology**, v. 6, p. 534, 2011.

HONG, W. K.; BAST, R. C.; HAIT, W. N.; KUFEL, D. W.; POLLOCK, R. E.; WEICHSELBAUM, R. R.; HOLLAND, J. F.; FREI III, E. **Cancer Medicine**. 8th edition. Shelton: People’s Medical Publishing House-USA, 2010.

HONG, X.; ZHU, Y.; ZHANG, Y. Electrocatalytic response of poly(cobalto tetraaminophthalocyanine)/multi-walled carbon nanotubes-Nafion modified electrode toward sulfadiazine in urine. **Journal of Zhejiang University – Science B (Biomedicine & Biotechnology)**, v. 13, n. 6, p. 503-510, 2012.

HUA, X.; HOU, X.; GONG, X.; SHEN, G. Electrochemical behavior of 5-fluorouracil on a glassy carbon electrode modified with bromothymol blue and multi-walled carbon nanotubes. **Analytical Methods**, v. 5, p. 2470-2476, 2013.

HUANG, X.; EL-SAYED, M. A. Gold nanoparticles: optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. **Journal of Advanced Research**, v. 1, p. 13-28, 2010.

HURTADO-SÁNCHEZ, M. C.; VALENZUELA, M. I. A.; DURÁN-MERÁS, I.; CÁCERES, M. I. R. Determination of chemotherapeutic drugs in human urine by capillary electrophoresis with UV and fluorimetric detection using solid-supported liquid-liquid extraction for sample clean-up. **Journal of Separation Science**, v. 38, p. 1990-1997, 2015.

HUSSEIN, A. K. Applications of nanotechnology in renewable energies – A comprehensive overview and understanding. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 460-476, 2015.

IBRAHIM, M.; TEMERK, Y. Novel sensor for sensitive electrochemical determination of luteolin based on In₂O₃ nanoparticles modified glassy carbon paste electrode. **Sensors and Actuators B**, v. 206, p. 744-752, 2015.

IBRAHIM, M.; TEMERK, Y.; IBRAHIM, H.; KOTB, M. Indium oxide nanoparticles modified carbon paste electrode for sensitive voltammetric determination of aromatase inhibitor formestane. **Sensors and Actuator B: Chemical**, v. 209, p. 630-638, 2015.

INCA – Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Câncer: o que é**. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>>. Acesso em: 05 fev. 2015.

IZADKHAH, V.; FARMANY, A.; MORTAZAVI, S. S. Voltammetric determination of copper in water samples using a Schiff base/carbon nanotube-modified carbon paste electrode. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 21, p. 994-996, 2015.

JANG, Y. H.; SOWERS, L. C.; ÇAGIN, T.; GODDARD III, W. A. First principles calculation of pK_a values for 5-substituted uracils. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 105, n. 1, p. 274-280, 2001.

JEREZ, L. M. B.; GARCÍA-PÉREZ, U. M.; ZAMBRANO-ROBLEDO, P.; HERNÁNDEZ-MOREIRA, J. Carbon paste electrode modified with BiVO₄ to sense metformin. **International Journal of Electrochemistry Science**, v. 9, p. 4643-4652, 2014.

JESUS, C. G.; LIMA, D.; SANTOS, V.; WOHRNATH, K.; PESSOA, C. A. Glucose biosensor based on the highly efficient immobilization of glucose oxidase on layer-by-layer films of silsesquioxane polyelectrolyte. **Sensors and Actuators B**, v. 186, p. 44-51, 2013.

JIA, X.; LIU, Q.; ZOU, S.; XU, X.; ZHANG, L. Construction of selenium nanoparticles/ β -glucan composites for enhancement of the antitumor activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 434-442, 2015.

JIANG, Z.; HAMA, Y.; YAMAGUCHI, K.; ODA, T. Inhibitory effect of sulphated polysaccharide porphyran on nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages. **The Journal of Biochemistry**, v. 151, n. 1, p. 65-74, 2012.

JIAO, G.; YU, G.; ZHANG, J.; EWART, H. S. Chemical Structures and Bioactivities of Sulfated Polysaccharides from Marine Algae. **Marine Drugs**, v. 9, p. 196-223, fev. 2011.

JOHNSON, J. L.; DUICK, D. S. Diabetes and thyroid disease: a likely combination. **Diabetes Spectrum**, v. 15, n. 3, p. 140-142, 2002.

JOSEPH, R.; KUMAR, K. Electrochemical reduction and voltammetric determination of metronidazole benzoate at modified carbon paste electrode. **Analytical Letters**, v. 42, p. 2309-2321, jun. 2009.

JOSEPH, R.; KUMAR, K. Differential pulse voltammetric determination and catalytic oxidation of sulfamethoxazole using [5,10,15,20- tetrakis (3-methoxy-4-hydroxy phenyl) porphyrinato] Cu (II) modified carbon paste sensor. **Drug Testing and Analysis**, v. 2, p. 278-283, 2010.

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

KADAM, S. U.; TIWARI, B. K.; O'DONNELL, C. P. Extraction, structure and biofunctional activities of laminarin from brown algae. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 50, p. 24-31, 2015.

KATZ, L. M.; DEWAN, K.; BROUNAUGH, R. L. Nanotechnology in cosmetics. **Food and Chemical Toxicology**, v. 85, p. 125-137, 2015.

KALCHER, K. Chemically modified carbon paste electrodes in voltammetric analysis. **Electroanalysis**, v. 2, p. 419-433, nov. 1990.

KHAN, M. S.; VISHAKANTE, G. D.; SIDDARAMAIAH, H. Gold nanoparticles: a paradigm shift in biomedical applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 199-200, p. 44-58, 2013.

KHARISSOVA, O. V.; DIAS, H. V. R.; KHARISOV, B. I.; PÉREZ, B. O.; PÉREZ, V. M. J. The greener synthesis of nanoparticles. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 4, p. 240-248, 2013.

KHLEBTSOV, N. G.; DYKMAN, L. A. Optical properties and biomedical applications of plasmonic nanoparticles. **Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer**, v. 111, p. 1-35, 2010.

KISSINGER, T.; HEINEMAN, W. R. **Laboratory techniques in electroanalytical chemistry**. New York: Marcel Dekker, 1996.

KLEIJN, S. E. F.; LAI, S. C. S.; KOPER, M. T. M.; UNWIN, P. R. Electrochemistry of nanoparticles. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 53, p. 3558-3586, 2014.

KHOT, M. S.; BATTHAR, S. L.; KOLEKAR, G. B.; PATIL, S. R. Spectrofluorimetric determination of 5-fluorouracil by fluorescence quenching of 9-anthracenecarboxylic acid. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 77, p. 82-86, 2010.

KRAYNOV, A.; MÜLLER, T. E. Concepts for the stabilization of metal nanoparticles in ionic liquids. **Applications of ionic liquids in science and technology**, InTech, p. 235-260, 2011. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/applications-of-ionic-liquids-in-science-and-technology/concepts-for-the-stabilization-of-metal-nanoparticles-in-ionic-liquids>>. Acesso em: 06 jan. 2016.

KUMAR, S.; AHLAWAT, W.; KUMAR, R.; DILBAGHI, N. Graphene, carbon nanotubes, zinc oxide and gold as elite nanomaterials for fabrication of biosensors for healthcare. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 70, p. 498-503, 2015.

KUMAR, S.; LATHER, V.; PANDITA, D. Green synthesis of therapeutic nanoparticles: an expanding horizon. **Nanomedicine**, v. 10, n. 15, 2451-2471, 2015.

LANGILLE, M. R.; PERSONICK, M. L.; ZHANG, J.; MIRKIN, C. A. Defining rules for the shape evolution of gold nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, p. 14542-14554, 2012.

LAVIRON, E. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 101, p. 19-28, 1979.

LIANG, X.; WANG, Z.; LIU, C. Size-controlled synthesis of colloidal gold nanoparticles at room temperature under the influence of glow discharge. **Nanoscale Research Letters**, v. 5, p. 124-129, 2010.

LI, B. L.; LUO, J. H.; LUO, H. Q.; LI, N. B. A novel conduction poly(p-aminobenzene sulphonic acid)-based electrochemical sensor for sensitive determination of Sudan I and its application for detection in food stuffs. **Food Chemistry**, v. 173, p. 594-599, 2015.

LIU, K.; ZHONG, D.; ZOU, H.; CHEN, X. Determination of tegafur, 5-fluorouracil, gimeracil and oxonic acid in human plasma using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, n. 4, p. 550-556, 2010.

LONGLEY, D. B.; HARKIN, D. P.; JOHNSTON, P. G. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. **Nature Reviews: Cancer**, v. 3, p. 330-338, 2003.

LUCIANO, R. P.; LEITE, M. S.; MARTINS, D. E.; WAJCHENBERG, M.; PUERTAS, E. B. Influência do trauma cirúrgico no comportamento dos níveis séricos de albumina após cirurgia da coluna vertebral. **Coluna/Columna**, v. 9, n. 4, p. 407-412, 2010.

MAITY, S.; SEN, I. K.; ISLAM, S. S. Green synthesis of gold nanoparticles using gum polysaccharide of *Cochlospermum religiosum* (katira gum) and study of catalytic activity. **Physica E**, v. 45, p. 130-134, 2012.

MALIK, P.; SRIVASTAVA, M.; VERMA, R.; KUMAR, M.; KUMAR, D.; SINGH, J. Nanostructured SnO₂ encapsulated guar-gum hybrid nanocomposites for electrocatalytic determination of hydrazine. **Materials Science and Engineering C**, v. 58, p. 432-441, 2016.

MALVERN INSTRUMENTS. **Zetasizer Nano User Manual**, NANO485, n. 1.1, abr. 2013. Disponível em: <<http://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Malvern%20Zetasizer%20ZS%20DLS%20User%20manual.pdf>>. Acesso em: 27 dez. 2015.

- MAHNIK, S. N.; RIZOVSKI, B.; FUERHACKER, M.; MADER, R. M. Determination of 5-fluorouracil in hospital effluents. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 380, n. 1, p. 31-35, 2004.
- MANIVASAGAN, P.; OH, J. Marine polysaccharide-based nanomaterials as a novel source of nanobiotechnological applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 315-327, 2016.
- MARINHO, B.; GHISLANDI, M.; TKALYA, E.; KONING, C. E.; WITH, G. Electrical conductivity of compacts of graphene, multi-wall carbon nanotubes, carbon black, and graphite powder. **Powder Technology**, v. 221, p. 351-358, 2012.
- MATERON, E. M.; HUANG, P. J.; WONG, A.; FERREIRA, A. A. P.; SOTOMAYOR, M. P. T.; LIU, J. Glutathione-s-transferase modified electrodes for detecting anticancer drugs. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 58, p. 232-236, 2014.
- MENG, X.; XU, M.; ZHU, J.; YIN, H.; AI, S. Fabrication of DNA electrochemical biosensor based on gold nanoparticles, locked nucleic acid modified hairpin DNA and enzymatic signal amplification. **Electrochimica Acta**, v. 71, p. 233-238, 2012.
- MIRONOV, I. V.; MAKOTCHENKO, E. V. The hydrolysis of AuCl_4^- and the stability of aquachlorocomplexes of gold(III) in aqueous solution. **Journal of Solution Chemistry**, v. 38, n. 6, p. 725-737, 2009.
- MITTAL, A. K.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 346-356, 2013.
- MODY, V. V.; SIWALE, R.; SINGH, A.; MODY, H. R. Introduction to metallic nanoparticles. **Journal of Pharmacy & BioAllied Sciences**, v. 2, n. 4, p. 282-289, 2010.
- MUDGIL, D.; BARAK, S.; KHATAR, B. S. Guar gum: processing, properties and food applications – a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 3, p. 409-418, 2014.
- MUENA, J. P.; VILLAGRÁN, M.; AGUIRRE, M. J. Electrocatalytic oxidation and reduction of S(IV) species by 5,10,15,20-tetrakis-tetraferrocenylporphyrin-modified electrodes. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 8, p. 621-633, 2013.
- MULTIFUNCTIONAL BIOPOLYMERS. Disponível em: <<http://wichlab.com/research/>>. Acesso em: 06 jan. 2016.
- MUTHUVEL, A.; ADAVALLAN, K.; BALAMURUGAN, K.; KRISHNAKUMAR, N. Biosynthesis of gold nanoparticles using *Solanum nigrum* leaf extract and screening their free radical scavenging and antibacterial properties. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 4, p. 325-332, 2014.
- NAGAMUTHU, S.; VIJAYAKUMAR, S.; MURALIDHARAN, G. Synthesis of Mn_3O_4 /amorphous carbon nanoparticles as electrode material for high performance supercapacitor applications. **Energy Fuel**, v. 27, n. 6, p. 3508-3515, 2013.
- NASROLLAHZADEH, M.; BABAEI, F.; SAJADI, S. M.; EHSANI, A. Green synthesis, optical properties and catalytic activity of silver nanoparticles in the synthesis of *N*-monosubstituted ureas in water. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 132, p. 423-429, 2014.

- NELSON, D. L.; COX, M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3ª edição. São Paulo: Sarvier, 2002.
- NEMCOVA, L.; BAREK, J.; ZIMA, J. A voltammetric comparison of the properties of carbon paste electrodes containing glassy carbon microparticles of various sizes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 675, p. 18-24, 2012.
- NICHOLSON, R. S.; SHAIN, I. Theory of stationary electrode polarography. **Analytical Chemistry**, v. 36, n. 4, p. 706-723, 1964.
- NIESEN, B.; RAND, B. P.; DORPE, P. V.; SHEN, H.; MAES, B.; GENOE, J.; HEREMANS, P. Excitation of multiple dipole surface plasmon resonances in spherical silver nanoparticles. **Optics Express**, v. 18, n. 18, p. 19032-19038, 2010.
- NIU, Z.; LI, Y. Removal and utilization of capping agents in nanocatalysis. **Chemistry of Materials**, v. 26, p. 72-83, 2014.
- NORUZI, M. Biosynthesis of gold nanoparticles using plant extracts. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, p. 1-14, 2015.
- NOSEDA, M. D.; VIANA, A. G.; DUARTE, M. E. R.; CEREZO, A. S. Alkali modification of carrageenans. Part IV. Porphyrans as model compounds. **Carbohydrates Polymers**, v. 42, p. 301-305, 2000.
- OLIVEIRA, F. C. M.; SERRANO, S. H. P. Electrochemically active L-cysteine gold modified electrodes. **Electrochimica Acta**, v. 125, p. 566-572, 2014.
- OLIVEIRA, K. M.; SANTOS, T. C. C.; DINELLI, L. R.; MARINHO, J. Z.; LIMA, R. C.; BOGADO, A. L. Aggregates of gold nanoparticles with complexes containing ruthenium as modifiers in carbon paste electrodes. **Polyhedron**, v. 50, p. 410-417, 2013.
- OLIVEIRA, R. D. **Preparação, caracterização e aplicação de filmes LbL com nanopartículas de prata estabilizadas em amido**. 2014, 94 f. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada – Área de Concentração: Química). Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2014.
- OPALLO, M.; LESNIEWSKI, A. A review on electrodes modified with ionic liquids. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 656, n. 1-2, p. 2-16, 2011.
- PANDEY, S.; GOSWAMI, G. K.; NANDA, K. K. Green synthesis of polysaccharide/gold nanoparticle nanocomposite: an efficient ammonia sensor. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, p. 229-234, 2013.
- PATIL, S. S.; SHEDBALKAR, U. U.; TRUSKEWYCZ, A.; CHOPADE, B. A.; BALL, A. S. Nanoparticles for environmental clean-up: a review of potential risks and emerging solutions. **Environmental Technology and Innovation**, v. 5, p. 10-21, 2016.
- PATRA, S.; MUKHERJEE, S.; BARUI, A. K.; GANGULY, A.; SREEDHAR, B.; PATRA, C. R. Green synthesis, characterization of gold and silver nanoparticles and their potential application for cancer therapeutics. **Materials Science and Engineering C**, v. 53, p. 298-309, 2015.

PATTAR, V. P.; NANDIBEWOOR, S. T. Electroanalytical method for the determination of 5-fluorouracil using a reduced graphene oxide/chitosan modified sensor. **RSC Advances**, v. 5, p. 34292-34301, 2015.

PATTERSON, A. L. The Scherrer formula for X-ray particle size determination. **Physical Review**, v. 56, p. 978-982, 1939.

PAUL, B.; BHUYAN, B.; PURKAYASTHA, D. D.; DHAR, S. S. Photocatalytic and antibacterial activities of gold and silver nanoparticles synthesized using biomass of *Parkia roxburghii* leaf. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 154, p. 1-7, 2016.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introduction to Spectroscopy**. 4th edition. Belmont: Books/Cole, 2009.

PEIXOTO, A. M.; SOUZA, J. S. I.; TOLEDO, F. F.; REICHARDT, K.; FILHO, J. M. **Enciclopédia Agrícola Brasileira**, v. 4 1-M. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2002.

PENDEKAL, M. S.; TEGGINAMAT, P. K. Development and characterization of chitosan-polycarbophil inter polyelectrolyte complex-based 5-fluorouracil formulations for buccal, vaginal and rectal application. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 20, p. 67-77, 2012.

PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. S.; KUBOTA, L. T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 1012-1021, 2002.

PERREAULT, F.; FARIA, A. F.; ELIMELECH, M. Environmental applications of graphene-based nanomaterials. **Chemical Society Reviews**, v. 44, p. 5861-5896, 2015.

PERREAULT, F.; FARIA, A. F.; NEJATI, S.; ELIMELECH, M. Antimicrobial properties of graphene oxide nanosheets: why size matters. **ACS Nano**, v. 9, n. 7, p. 7226-7236, 2015.

PLOWMAN, B. J.; TSCHULIK, K.; YOUNG, N. P.; COMPTON, R. G. Capping agent promoted oxidation of gold nanoparticles: cetyl trimethylammonium bromide. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 17, p. 26054-26058, 2015.

POCARD, N. L.; ALSMEYER, D. C.; McCREERY, R. L.; NEENAN, T. X.; CALLSTROM, M. R. Doped glassy carbon: a new material for electrocatalysis. **Journal of Materials Chemistry**, v. 2, n. 8, p. 771-784, 1992.

POGACEAN, F.; BIRIS, A. R.; COROS, M.; WATANABE, F.; BIRIS, A. S.; CLICHICI, S.; FILIP, A.; PRUNEARU, S. Electrochemical oxidation of adenine using platinum electrodes modified with carbon nanotubes. **Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures**, v. 59, p. 181-185, 2014.

PRASAD, B. B.; KUMAR, D.; MADHURI, R.; TIWARI, M. P. Nonhydrolytic sol-gel derived imprinted polymer-multiwalled carbon nanotubes composite fiber sensors for electrochemical sensing of uracil and 5-fluorouracil. **Electrochimica Acta**, v. 71, p. 106-115, 2012.

PRETSCH, E.; BÜHLMANN, P.; BADERTSCHER, M. **Structure determination of organic compounds: tables of spectral data**. 4th edition. Berlin: Springer, 2009.

PROCHÁZKOVÁ, A.; LIU, S.; FRIESS, H.; AEBI, S.; THORMANN, W. Determination of 5-fluorouracil and 5-fluoro-2'-deoxyuridine-5'-monophosphate in pancreatic cancer cell line and other biological materials using capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 916, p. 215-224, 2001.

QIU, H.; MU, Y.; ZHANG, H.; WANG, Y. Designed synthesis of cobalt-oxide-based nanomaterials for superior electrochemical energy storage devices. **Nano Research**, v. 8, n. 2, p. 321-339, 2015.

RADI, A. Applications of stripping voltammetry at carbon paste and chemically modified carbon paste electrodes to pharmaceutical analysis. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 2, p. 1-8, 2006.

RADI, A. Recent updates of chemically modified electrodes in pharmaceutical analysis. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 13, p. 728-752, jan. 2010.

RASTOGI, P. K.; GANESAN, V.; KRISHNAMOORTHY, S. Palladium nanoparticles decorated gaur gum based hybrid material for electrocatalytic hydrazine determination. **Electrochimica Acta**, v. 125, p. 593-600, 2014.

RAUWEL, P.; KÜÜNAL, S.; FERDOV, S.; RAUWEL, E. A Review on the green synthesis of silver nanoparticles and their morphologies studied via TEM. **Advances in Materials Science and Engineering**, v. 2015, article ID 682749, p. 1-9, 2015.

RAVEENDRAN, S.; CHAUHAN, N.; PALANINATHAN, V.; NAGAOKA, Y.; YOSHIDA, Y.; MAEKAWA, T.; KUMAR, D. S. Extremophilic polysaccharide for biosynthesis and passivation of gold nanoparticles and photothermal ablation of cancer cells. **Particle & Particle Systems Characterization**, v. 32, p. 54-64, 2015.

RAVEENDRAN, S.; YOSHIDA, Y.; MAEKAWA, T.; KUMAR, D. S. Pharmaceutically versatile sulfated polysaccharide based bionano platforms. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 9, p. 605-626, 2013.

RAVEENDRAN, S.; YOSHIDA, Y.; MAEKAWA, T.; KUMAR, D. S. Pharmaceutically versatile sulfated polysaccharide based bionano platforms. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 9, n. 5, p. 605-626, 2013.

RICCI, F.; GONÇALVES, C.; AMINE, A.; GORTON, L.; PALLESCHI, G.; MOSCONE, D. Electroanalytical study of Prussian blue modified glassy carbon paste electrodes. **Electroanalysis**, v. 15, n. 14, p.1204-1211, 2003.

RICE, M. E.; GALUS, Z.; ADAMS, R. N. Graphite paste electrodes: effects of paste composition and surface states on electron-transfer rates. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 143, p. 89-102, 1983.

RINAUDO, M. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. **Polymer International**, v. 57, p. 397-430, 2008.

ROCHA, P. N. Hiponatremia: conceitos básicos e abordagem prática. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 22, n. 2, p. 248-260, 2011.

ROTARIU, L.; ISTRATE, O.; BALA, C. Poly(allylamine hydrochloride) modified screen-printed carbon electrode for sensitive and selective detection of NADH. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 191, p. 491-497, 2014.

ROUIS, A.; ECHABAANE, M.; SAKLY, N.; DUMAZET-BONNAMOUR, I.; OUADA, H. B. Electrochemical analysis of a PPV derivative thin film doped with β -ketoimine calix[4]arene in the dark and under illumination for the detection of Hg²⁺ ions. **Synthetic Metals**, v. 164, p. 78-87, 2013.

RUBINO, F. M.; VERDUCI, C.; BURATTI, M.; FUSTINONI, S.; CAMPO, L.; OMODEO-SALÈ, E.; GIGLIO, M.; IAVICOLI, S.; BRAMBILLA, G.; COLOMBI, A. Assay of urinary α -fluoro- β -alanine by gas chromatography–mass spectrometry for the biological monitoring of occupational exposure to 5-fluorouracil in oncology nurses and pharmacy technicians. **Biomedical Chromatography**, v. 20, n. 3, p. 257-266, 2006.

SAHA, K.; AGASTI, S. S.; KIM, C.; LI, X.; ROTELLO, V. M. Gold nanoparticles in chemical and biological sensing. **Chemical Reviews**, v. 112, p. 2739-2779, 2012.

SANDRINO, B.; CLEMENTE, C. S.; OLIVEIRA, T. M. B. F.; RIBEIRO, F. W. P.; PAVINATTO, F. J.; MAZZETTO, S. E.; LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N.; PESSOA, C. A.; WOHNATH, K. Amphiphilic porphyrin-cardanol derivatives in Langmuir and Langmuir–Blodgett films applied for sensing. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 425, p. 68-75, 2013.

SANGHAVI, B. J.; WOLFBEIS, O. S.; HIRSCH, T.; SWAMI, N. S. Nanomaterial-based electrochemical sensing of neurological drugs and neurotransmitters. **Microchimica Acta**, v. 182, p. 1-41, 2015.

SANSON, A. L.; SILVA, S. C. R.; MARTINS, M. C. G.; GIUSTI-PAIVA, A.; MAIA, P. P.; MARTINS, I. Liquid-liquid extraction combined with high performance liquid chromatography-diode array-ultra-violet for simultaneous determination of antineoplastic drugs in plasma. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 2, p.363-371, 2011.

SANTOS, C. S.; FERREIRA, R. T.; CALIXTO, C. M. F.; RUFINO, J. L.; GARCIA, J. R.; FUJIWARA, S. T.; WOHNATH, K.; PESSOA, C. A. The influence of organization of LbL films containing a silsesquioxane polymer on the electrochemical response of dopamine. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 44, p. 1047-1058, 2014.

SASIDHARAN, A.; MONTEIRO-RIVIERE, N. A. Biomedical applications of gold nanomaterials: opportunities and challenges. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 7, n. 6, p. 779-796, 2015.

SATARADDI, S. R.; NANDIBEWOOR, S. T. Voltammetric-oxidation and determination of 5-Fluorouracil and its analysis in pharmaceuticals and biological fluids at glassy carbon electrode mediated by surfactant cetyltrimethyl ammonium bromide. **Der Pharma Chemica**, v. 3, n. 4, p. 253-265, 2011.

SATHISHKUMAR, G.; PRADEEP, K. J.; VIGNESH, V.; RAJKUBERAN, C.; JEYARAJ M.; SELVAKUMAR M.; RAKHI, J.; SIVARAMAKRISHNAN, S. Cannonball fruit (*Couroupita guianensis*, Aubl.) extract mediated synthesis of gold nanoparticles and evaluation of its antioxidant activity. **Journal of Molecular Liquids**, v. 215, p. 229-236, 2016.

SATYANARAYANA, M.; GOUD, K. Y.; REDDY, K. K.; GOBI, K. V. Biopolymer stabilized nanogold particles on carbon nanotube support as sensing platform for electrochemical detection of 5-Fluorouracil *in vitro*. **Electrochimica Acta**, v. 178, p. 608-616, 2015.

SATYANARAYANA, M.; REDDY, K. K.; GOBI, V. Nanobiocomposite based electrochemical sensor for sensitive determination of serotonin in presence of dopamine, ascorbic acid and uric acid *in vitro*. **Electroanalysis**, v. 26, p. 2365-2372, 2014.

SCHRÖFEL, A.; KRATOŠOVÁ, G.; ŠAFARĚÍK, I.; ŠAFARĚÍKOVÁ, M.; RAŠKA, I.; SHOR, L. M. Applications of biosynthesized metallic nanoparticles – a review. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 10. p. 4023-4042, 2014.

ŠEGOTA; S.; HEIMER, S.; TEŽAK, Đ. New cationic mixtures of dodecyltrimethylammonium bromide/sodium dodecylbenzenesulphonate/water I. Surface properties of dispersed particles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 274, p. 91-99, 2006.

SEN, I. K.; MAITY, K.; ISLAM, S. S. Green synthesis of gold nanoparticles using a glucan of an edible mushroom and study of catalytic activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, p. 518-528, 2013.

SENDHE, S.; INGLE, A. P.; GADE, A.; RAI, M. Green synthesis of copper nanoparticles by *Citrus medica* Linn. (Idilimbu) juice and its antimicrobial activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 6, p. 865-873, 2015.

SERPI, C.; KOVATSI, L.; GIROUSI, S. Electroanalytical quantification of total ds DNA extracted from human sample using, anionic liquid modified, carbon nanotubes paste electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 812, p. 26-32, 2014.

SHAH, A.; NOSHEEN, E.; ZAFAR, F.; UDDIN, S. N.; DIONYSIOU, D. D.; BADSHAH, A.; REHMAN, Z.; KHAN, G. S. Photochemistry and electrochemistry of anticancer uracils. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 117, p. 269-277, 2012.

SHARMA, V. K.; YNGARD, R. A.; LIN, Y. Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 145, p. 83-96, 2009.

SHE, Y.; TANG, Y.; LIU, H.; HE, P. Electrochemical determination of hydroquinone using hydrophobic ionic-type carbon paste electrodes. **Chemistry Central Journal**, v. 4, n. 17, p. 1-8, 2010.

SHENDE, S.; INGLE, A. P.; GADE, A.; RAI, M. Green synthesis of copper nanoparticles by *Citrus medica* Linn. (Idilimbu) juice and its antimicrobial activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 6, p. 865-873, 2015.

SHERVEDANI, R. K.; REZVANINIA, Z.; SABZYAN, H.; BOEINI, H. Z. Characterization of gold-thiol-8-hydroxyquinoline self-assembled monolayers for selective recognition of aluminum ion using voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 825, p. 34-41, 2014.

SHI, J. Steric stabilization. The Ohio State University, 2002. Disponível em: <http://muri.lci.kent.edu/References/NIM_Papers/stabilization_of_NP_suspensions/2002_Shi_steric_stabilization.pdf>. Acesso em: 6 jan. 2016.

SHIH, Y.; ZEN, J.; KUMAR, A. S.; CHEN, P. Flow injection analysis of zinc pyrithione in hair care products on a cobalt phthalocyanine modified screen-printed carbon electrode. **Talanta**, v. 62, p. 912-917, 2004.

SIARA, L. R.; LIMA, F.; CARDOSO, C. A. L.; ARRUDA, G. J. Electrochemically pretreated zeolite-modified carbon-paste electrodes for determination of linuron in an agricultural formulation and water. **Electrochimica Acta**, v. 151, p. 609-618, 2015.

SILVA, M. M. S.; DIAS, A. C. M. S.; SILVA, B. V. M.; GOMES-FILHO, S. L. R.; KUBOTA, L. T.; GOULART, M. O. F.; DUTRA, R. F. Electrochemical detection of dengue virus NS1 protein with a poly(allylamine)/carbonnanotube layered immunoelectrode. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 90, p. 194-200, 2015.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric identification of organic compounds**. Seventh Edition. Danvers: John Wiley & Sons, 2005.

SMITH, D. M.; SIMON, J. K.; BAKER JR, J. R. Applications of nanotechnology for immunology. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, p. 605, 2013.

SOCIETY OF CRITICAL CARE MEDICINE. Guidelines for ICU admission, discharge, and triage. **Critical Care Medicine**, v. 27, n. 3, p. 633-638, 1999.

SOKOLOVA, E; BYANKINA, A. O.; KALITNIK, A. A.; KIM, Y. H.; BOGDANOVICH, L. N.; SOLOV'eva, T., YERMAK, I. M. Influence of red algal sulfated polysaccharides on blood coagulation and platelets activation *in vitro*. **Journal of Biomedical Materials Research A**, v. 102A, n. 5, p. 1431-1438, 2014.

SOUZA, A. A. S. **Galactana sulfatada da alga marinha vermelha *Gelidium crinale* (Turner) Lamouroux: respostas na inflamação e nocicepção**. 2010, 92 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2010.

SOUZA, M. F. B. Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise: uma breve abordagem. **Química Nova**, v. 20, n. 2, p. 191-195, jan. 1997.

SREEDHAR, N. Y.; KUMAR, M. S.; KRISHNAVENI, K. Sensitive determination of chlorpyrifos using Ag/Cu alloy nanoparticles and graphene composite paste electrode. **Sensors and Actuators B**, v. 210, p. 475-482, 2015.

STEFAN, R.; BAIRU, S. G. Diamond paste based electrodes for the determination of Pb(II) at trace concentration levels. **Talanta**, v. 63, p. 605-608, 2004.

STEWART, B. W.; WILD, C. P. **World cancer report 2014**. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, 2014.

STEWART, W. D. P. **Algal Physiology and Biochemistry**. Botanical Monographs, volume 10. Los Angeles: University of California Press, 1974.

STOZHKO, N. Y.; MALAKHOVA, N. A.; FYODOROV, M. V.; BRAININA, K. Z. Modified carbon-containing electrodes in stripping voltammetry of metals. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 12, p. 1185-1204, 2008.

SUN, H.; LI, L.; CHEN, X. Sensitized chemiluminescence determination of fluorouracil in pharmaceutical and biological fluids based on potassium permanganate oxidation in the presence of formaldehyde. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 21, p. 213-219, 2007.

SUN, T.; ZHANG, Y. S.; PANG, B.; HYUN, D. C.; YANG, M.; XIA, Y. Engineered nanoparticles for drug delivery in cancer therapy. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 53, p. 12320-12364, 2014.

ŠVANCARA, I.; VYTRÁS, K.; KALCHER, K.; WALCARIUS, A.; WANG, J. Carbon paste electrodes in facts, numbers, and notes: a review on the occasion of the 50-years jubilee of carbon paste in electrochemistry and electroanalysis. **Electroanalysis**, v. 21, n. 1, p. 7-28, 2009.

ŠVOBAITĚ, R.; SOLASSOL, I.; PINGUET, F.; MAZARD, T.; IVANAUSKAS, L.; YCHOU, M.; BRESSOLLE, F. M. M. A liquid chromatography-mass spectrometry method for the simultaneous determination of capecitabine, 5'-deoxy-5-fluorouridine, 5-fluorouracil, and 5-fluorodihydrouracil in human plasma. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 33, p. 1705-1719, 2010.

TAEI, M.; RAMAZANI, G. Simultaneous determination of norepinephrine, acetaminophen and tyrosine by differential pulse voltammetry using Au-nanoparticles/poly(2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol) film modified glassy carbon electrode. **Colloids and Surfaces B**, v. 123, p. 23-32, 2014.

TAURAN, Y.; BRIOUDE, A.; COLEMAN, A. W.; RHIMI, M.; KIM, B. Molecular recognition by gold, silver and copper nanoparticles. **World Journal of Biological Chemistry**, v. 4, n. 3, p. 35-63, 2013.

TIWARI, P.; KUMAR, A.; PRAKASH, R. Electrochemical detection of azidothymidine on modified probes based on chitosan stabilised silver nanoparticles hybrid material. **RSC Advances**, v. 5, p. 90089-90097, 2015.

TYSZCZUK-ROTKO, K.; BĘCZKOWSKA, I.; WÓJCIAK-KOSIOR, M.; SOWA, I. Simultaneous voltammetric determination of paracetamol and ascorbic acid using a boron-doped diamond electrode modified with Nafion and lead films. **Talanta**, v. 129, p. 384-391, 2014.

USLU, B.; OZKAN, S. A. Electroanalytical application of carbon based electrodes to the pharmaceuticals. **Analytical Letters**, v. 40, p. 817-853, 2007.

USP. **United States Pharmacopeia 30 – The Official Compendia of Standards**. National Formulary 25. Rockville, 2007, p. 2165.

VENKATPURWAR, V.; POKHARKAR, V. Green synthesis of silver nanoparticles using marine polysaccharide: study of *in-vitro* antibacterial activity. **Materials Letters**, v. 65, p. 999-1002, 2011.

VENKATPURWAR, V.; SHIRAS, A.; POKHARKAR, V. Porphyrin capped gold nanoparticles as a novel carrier for delivery of anticancer drug: In vitro cytotoxicity study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 409, p. 314-320, 2011.

VIANA, A. G. **Caracterização química de polissacarídeos neutros e sulfatados isolados de algas vermelhas e cinética química da reação de ciclização em galactanas sulfatadas**. 2005, 390 f. Tese (Doutorado em Ciências (Bioquímica)) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

VO, T.; NGO, D.; KANG, K.; JUNG, W.; KIM, S. The beneficial properties of marine polysaccharides in alleviation of allergic responses. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 59, p. 1299-138, 2015.

VOLLMER, C.; JANIÁK, C. Naked metal nanoparticles from metal carbonyls in ionic liquids: easy synthesis and stabilization. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 255, p. 2039-2057, 2011.

WANG, G.; SHI, G.; CHEN, X.; YAO, R.; CHEN, F. A glassy carbon electrode modified with graphene quantum dots and silver nanoparticles for simultaneous determination of guanine and adenine. **Microchimica Acta**, v. 182, p. 315-322, 2015.

WANG, H.; OHNUKI, H.; ENDO, H.; IZUMI, M. Effects of self-assembled monolayers on amperometric glucose biosensors based on an organic-inorganic hybrid system. **Sensors and Actuators B**, v. 168, p. 249-255, 2012.

WANG, J. **Analytical Electrochemistry**. Second edition. New York: John Wiley & Sons, 2001.

WANG, J.; KIRGÖZ, Ü. A.; MO, J.; LU, J.; KAWDE, A. N.; MUCK, A. Glassy carbon paste electrodes. **Electrochemistry Communications**, v. 3, n. 4, p. 203-208, 2001.

WANG, S.; FU, S.; DING, H. Determination of 5-Fluorouracil using disposable gold nanoparticles modified screen-printed electrode. **Sensor Letters**, v. 10, n. 3-4, p. 974-978, 2012.

WANG, W.; WANG, Q.; ZHANG, Z. Hydrothermal synthesis of one-dimensional assemblies of Pt nanoparticles and their sensor application for simultaneous determination of dopamine and ascorbic acid. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 10, p. 255-262, 2008.

WANG, Y.; LABORDA, E.; CROSSLEY, A.; COMPTON, R. G. Surface oxidation of gold nanoparticles supported on a glassy carbon electrode in sulphuric acid medium: contrasts with the behavior of 'macro' gold. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 15, p. 3133-3136, 2013.

WHO MODEL LIST OF ESSENTIAL MEDICINES. 18th List. Disponível em: <http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/>.> Acesso em: 05 fev. 2015.

WIJESEKARA, I.; PANJESTUTI, R.; KIM, S. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 14-21, 2011.

XIA, F.; XU, X.; LI, X.; ZHANG, L.; ZHANG, L.; QIU, H.; WANG, W.; LIU, Y.; GAO, J. Preparation of bismuth nanoparticles in aqueous solution and its catalytic performance for the reduction of 4-nitrophenol. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 53, p. 10576-10582, 2014.

XIANG, C.; LI, R.; ADHIKARI, B.; SHE, Z.; LI, Y.; KRAATZ, H. Sensitive electrochemical detection of *Salmonella* with chitosan-gold nanoparticles composite film. **Talanta**, v. 140, p. 122-127, 2015.

XU, J.; WANG, Y.; QIU, H.; ZHANG, Y. The electrochemical oxidation of pentachlorophenol and its sensitive determination at chitosan modified carbon paste electrode. **Russian Journal of Electrochemistry**, v. 50, n. 6, p. 531-536, 2014.

XU, G.; WANG, W.; LI, B.; LUO, Z.; LUO, X. A dopamine sensor based on a carbon paste electrode modified with DNA-doped poly(3,4-ethylenedioxythiophene). **Microchimica Acta**, v. 182, p. 679-685, 2015.

XU, R. Progress in nanoparticles characterization: sizing and zeta potential measurement. **Particuology**, v. 6, p. 112-115, 2008.

YAN, J.; LIU, J.; SUN, Y.; TANG, S.; MO, Z.; LIU, Y. Green synthesis of biocompatible carboxylic curdlan-capped gold nanoparticles and its interaction with protein. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 771-777, 2015.

YANG, C.; DENNO, M. E.; PYAKUREL, P.; VENTON, B. J. Recent trends in carbon nanomaterial-based electrochemical sensors for biomolecules: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 887, p. 17-37, 2015.

YAO, S.; ZHU, Y. Nanomaterial-enabled stretchable conductors: strategies, materials and devices. **Advanced Materials**, v. 27, p. 1480-1511, 2015.

YE, J.; XIAO, H.; XIAO, B.; XU, W.; GAO, L.; LIN, G. Bioremediation of heavy metal contaminated aqueous solution by using red algae *Porphyra leucosticta*. **Water Science & Technology**, v. 72, n. 9, p. 1662-1666, 2015.

YESHCHENKO, O. A.; BONDARCHUK, I. S.; GURIN, V. S.; DMITRUCK, I. M.; KOTKO, A. V. Temperature dependence of the surface plasmon resonance in gold nanoparticles. **Surface Science**, v. 608, p. 275-281, 2013.

ZAHMAKIAN, M.; ÖZKAR, S. Metal nanoparticles in liquid phase catalysis; from recent advances to future goals. **Nanoscale**, v. 3, p. 3462-3481, 2011.

ZARBIN, A. J. G. Química de (nano)materiais. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1469-1479, 2007.

ZEYBEK, D. K.; DEMIR, B.; ZEYBEK, B.; PEKYARDIMCI, Ş. A sensitive electrochemical DNA biosensor for antineoplastic drug 5-fluorouracil based on glassy carbon electrode modified with poly(bromocresol purple). **Talanta**, v. 144, p. 793-800, 2015.

ZHAN, T.; CAO, L.; SUN, W.; HOU, W. Electrochemical behavior of 5-fluoro-1H-pyrimidine-2 on an ionic liquid modified carbon paste electrode. **Analytical Methods**, v. 3, p. 2651-2656, 2011.

ZHANG, Q.; QI, H.; ZHAO, T.; DESLANDES, E.; ISMAELI, N. M.; MOLLOY, F.; CRITCHLEY, A. T. Chemical characteristics of a polysaccharide from *Porphyra capensis* (Rhodophyta). **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 15, p. 2447-2450, 2005.

ZHANG, Z.; ZHANG, Q.; WANG, J.; SONG, H.; ZHANG, H.; NIU, X. Regioselective syntheses of sulfated porphyrans from *Porphyra haitanensis* and their antioxidant and anticoagulant activities *in vitro*. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 1124-1129, 2010.

ZHAO, Q.; ZHANG, Z.; BAO, L.; PANG, D. Surface structure-related electrochemical behaviors of glassy carbon electrodes. **Electrochemistry Communications**, v. 10, p. 181-185, 2008.

ZHOU, C.; YU, X.; ZHANG, Y.; HE, R.; MA, H. Ultrasonic degradation, purification and analysis of structure and antioxidant activity of polysaccharide from *Porphyra yezoensis* Ueda. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 2046-2051, 2012.

ZHU, L.; SHEN, G.; DING, S.; HUA, X. Determination of 5-fluorouracil in 5-fluorouracil injection and human serum by HPLC. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 20, n. 4, p. 947-950, 2012.

ZIMA, J.; ŠVANCARA, I.; BAREK, J.; VYTŘAS, K. Recent advances in electroanalysis of organic compounds at carbon paste electrodes. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 39, p. 204-227, 2009.