

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

LUMA CLARINDO LOPES

SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS: POTENCIAIS APLICAÇÕES
NA CONSTRUÇÃO DE SENSORES ELETROQUÍMICOS

PONTA GROSSA

2020

LUMA CLARINDO LOPES

SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS: POTENCIAIS APLICAÇÕES
NA CONSTRUÇÃO DE SENSORES ELETROQUÍMICOS

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

2020

L864 Lopes, Luma Clarindo
 Síntese verde de nanopartículas metálicas: potenciais aplicações na
 construção de sensores eletroquímicos
 / Luma Clarindo Lopes. Ponta Grossa, 2020.
 146 f.

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

 Orientadora: Profa. Dra. Christiana Andrade Pessôa.
 Coorientador: Prof. Dr. Adriano Gonçalves Viana.

 1. Eletrodo de pasta de carbono. 2. Nanopartículas de ouro. 3.
 Nanopartículas de prata. 4. Síntese verde. 5. Voltametria de onda quadrada. I.
 Pessôa, Christiana Andrade. II. Viana, Adriano Gonçalves. III. Universidade
 Estadual de Ponta Grossa. Química. IV.T.

CDD: 540

TERMO DE APROVAÇÃO

LUMA CLARINDO LOPES

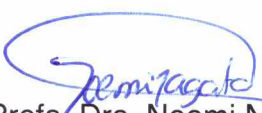
“SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS: POTENCIAIS APLICAÇÕES NA CONSTRUÇÃO DE SENSORES ELETROQUÍMICOS”

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.

Orientadora :


Profa. Dra. Christiana Andrade Pessoa
UEPG/PR


Profa. Dra. Karen Wohnrath
UEPG/PR


Profa. Dra. Noemi Nagata
UFPR/PR

Ponta Grossa, 28 de fevereiro de 2020

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus e minha mãe Nossa Senhora Aparecida por ter me abençoado tanto durante esses anos, me dando forças para continuar e permitindo que essa conquista fosse alcançada!

Agradeço imensamente à minha família, minha mãe Luciane, meu pai Mário e minhas irmãs Maria Luiza e Anna Clara! Sem vocês eu nada seria! Amo vocês!

Agradeço ao meu esposo, André, por todo amor, carinho, compreensão e paciência para comigo! Sou imensamente feliz por ter você ao meu lado! Aproveito também para agradecer meus sogros, Rita e Mário e a Vó Nádia, pessoas incríveis, de um coração de ouro e que sempre me acolheram!

Um agradecimento especial 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. Agradeço também à prof^a. Dr^a. Fernanda Simas e à prof^a. Dr^a. Cássia Magalhães pela parceria e pelo fornecimento dos biomateriais utilizados nas sínteses. Agradeço também aos membros da banca, prof^a. Dr^a. Karen Wohnrath e à prof^a. Dr^a. Noemi Nagata por participarem desta importante etapa em minha formação acadêmica.

Agradeço imensamente meu grande amigo Dhésmon por toda a parceria e amizade! Muito obrigada por tudo Dhesmitcho!!! Também agradeço a Ana Carolina pela amizade e pelo auxílio nos ensaios com amostras sanguíneas incluídos no presente trabalho.

Um agradecimento especial ao GDEM (Grupo de Desenvolvimento de Eletrodos Modificados) por todos esses anos de aprendizado e por terem me introduzido à vida acadêmica. Agradeço também as minhas queridas alunas de iniciação científica, Luana, Bianca e Elisa.

Também agradeço ao Complexo de Laboratórios Multiusuários da UEPG (C-labmu), ao CME da UFPR (Centro de Microscopia Eletrônica) e ao CNPEM (Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais) pela realização das muitas análises que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho.

Por fim, agradeço à todos que me auxiliaram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho e me apoiaram durante os anos da graduação. A todos vocês, muito obrigada!

*“Todos estes que aí estão atravancando meu
caminho, eles passarão...*

Eu passarinho!”

(Mário Quintana)

RESUMO

Neste trabalho, foram desenvolvidos dois eletrodos baseados na modificação de pasta de carbono com nanopartículas metálicas sintetizadas por rotas sintéticas verdes. O primeiro é um eletrodo de pasta de carbono vítreo (EPCV) modificado com nanopartículas de ouro (AuNPs) estabilizadas na goma do abacaxi (*Ananas comosus*; GA). Tal eletrodo foi aplicado na determinação do Cloridrato de Prometazina (PMZ). O segundo é um eletrodo de pasta de grafite modificado com nanopartículas de prata (AgNPs) sintetizadas empregando-se extrato de *Garcinia conchichinensis* (GAR), o qual foi empregado na determinação do 5-Fluorouracil (5-FU). Em ambas as sínteses, os extratos naturais empregados (GA e GAR) atuaram simultaneamente como agentes redutores e estabilizantes para as nanopartículas formadas. As caracterizações por espectroscopia de UV-VIS das nanopartículas revelaram uma banda de absorção em 524 e 407 nm para as AuNPs-GA e AgNPs-GAR, respectivamente. A análise de TEM mostrou diâmetros médios de partícula de $10,33 \pm 1,6$ nm para as AuNPs-GA e $9,2 \pm 1,5$ nm para as AgNPs-GAR. A caracterização eletroquímica do EPCV/AuNPs-GA e do EPC/AgNPs-GAR, realizadas por voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) em meio da sonda $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, evidenciou que os nanomateriais obtidos conferiram aos eletrodos maiores valores de corrente e menores resistências à transferência de carga (R_{ct}). O EPCV/AuNPs-GA foi aplicado na determinação da PMZ, a qual por VC foi oxidado em duas etapas, apresentando dois processos anódicos em aproximadamente 0,75 e 0,48 V e um processo catódico em aproximadamente 0,40 V. Para a determinação da PMZ foi utilizada a técnica de voltametria de onda quadrada (VOQ). Os parâmetros da VOQ foram otimizados por meio de um planejamento fatorial Box-Behnken com triplicata no ponto central e os valores obtidos foram $a = 90$ mV, $f = 100$ Hz e $\Delta E_s = 8$ mV. A ANOVA evidenciou que a variância explicada pelo mesmo é bem próxima da máxima variância explicável ($R_{sqr} = 0,9997$; $R_{adj} = 0,999$). O EPCV/AuNPs-GA apresentou linearidade de resposta na faixa de 3,98 a 15,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de PMZ, com limites de detecção e de quantificação iguais a 1,09 e 3,62 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Este foi aplicado para a quantificação de PMZ em formulações farmacêuticas comerciais, tendo-se obtido porcentagens de determinação entre 94,89 a 97,30 %, com valores de DPR abaixo de 5,0%. A hemocompatibilidade das AuNPs-GA foi avaliada por ensaios de citotoxicidade e fragilidade osmótica em leucócitos e eritrócitos humanos e o nanomaterial sintetizado no presente trabalho não exibiu efeitos citotóxicos para as referidas células. O EPC/AgNPs-GAR foi aplicado na determinação do 5-FU. Por VC, verificou-se que o agente antitumoral 5-Fluorouracil (5-FU) foi oxidado irreversivelmente em 1,13 V na superfície do EPC/AgNPs-GAR segundo um mecanismo dependente do pH e controlado por difusão. O pH do tampão BR para a determinação de 5-FU foi otimizado por VOQ, tendo-se observado um máximo de corrente em pH 8,0. Os parâmetros da VOQ otimizados por meio de um planejamento fatorial Box-Behnken com triplicata no ponto central foram de $a = 80$ mV, $f = 85$ Hz e $\Delta E_s = 17$ mV. A ANOVA evidenciou que a variância explicada pelo mesmo é bem próxima da máxima variância explicável ($R_{sqr} = 0,9896$; $R_{adj} = 0,9818$) e a falta de ajuste não foi significativa. O EPC/AgNPs-GAR apresentou linearidade de resposta na faixa de 30 a 300,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de 5-FU, com limites de detecção e de quantificação iguais a 0,76 e 2,53 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. 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 99,83 com desvio padrão relativo dentro dos limites aceitáveis (0,11%).

Palavras-chave: eletrodo de pasta de carbono; nanopartículas de ouro; nanopartículas de prata síntese verde; voltametria de onda quadrada; Cloridrato de Prometazina; 5-Fluorouracil

ABSTRACT

Two electrodes were developed based on the modification of carbon paste with metallic nanoparticles synthesized by green synthetic routes. The first one is a glassy carbon paste electrode (GCPE) modified with gold nanoparticles (AuNPs) stabilized in pineapple gum (*Ananas comosus*; PG). This electrode was applied in the determination of Promethazine Hydrochloride (PMZ). The second electrode developed was a graphite paste electrode modified with silver nanoparticles (AgNPs) synthesized using (GAR) extract. In both syntheses, the natural extracts used (PG and GAR) simultaneously acted as a reducing and stabilizing agents for the formed nanoparticles. The UV-VIS spectroscopy characterization of the nanoparticles revealed an absorption band at 524 and 407 nm for AuNPs-PG and AgNPs-GAR, respectively. TEM analysis showed mean particle diameters of 10.33 ± 1.6 nm for AuNPs-PG and 9.2 ± 1.5 nm for AgNPs-GAR. The electrochemical characterization of GCPE/AuNPs-PG and CPE/AgNPs-GAR, carried out by cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) in presence of $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ probe, showed that obtained nanoparticles conferred to the electrodes higher current values and a lower charge transfer resistance (R_{ct}). GCPE/AuNPs-PG was applied to determine PMZ, which by VC was oxidized in two stages, with two anodic processes at approximately 0.75 and 0.48 V and a cathodic process at approximately 0.40 V. For the determination of PMZ, the square wave voltammetry (SWV) technique was used. The SWV parameters were optimized by means of a Box-Behnken factorial design with triplicate at the central point and the obtained values were $a = 90$ mV, $f = 100$ Hz and $\Delta E_s = 8$ mV. ANOVA showed that the variance explained is very close to the maximum explainable variance ($R_{sq} = 0.9999$; $R_{adj} = 0.999$) and the lack of adjustment was not significant. The GCPE/AuNPs-PG showed linear response in the range of 3.98 to $15.7 \mu\text{mol L}^{-1}$ of PMZ, with detection and quantification limits equal to 1.09 and $3.62 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectively. The GCPE/AuNPs-PG was applied for the quantification of PMZ in commercial pharmaceutical formulations, obtaining recovery percentages between 94.89 to 97.30%, with RDS values below 5.0%. The hemocompatibility of the obtained AuNPs-PG were evaluated by cytotoxicity and osmotic fragility assays in human leukocytes and erythrocytes and the nanomaterial synthesized in the present work did not exhibit toxic effects towards the referred cells. CPE/AgNPs-GAR was applied to determine 5-FU. By VC, it was found that the antitumor agent 5-Fluorouracil (5-FU) was irreversibly oxidized at 1.13 V on the surface of the CPE/AgNPs-GAR according to a pH dependent and diffusion-controlled mechanism. The pH of the BR buffer for the determination of 5-FU was optimized by SWV, with a maximum current at pH 8.0 being observed. The SWV parameters optimized through a Box-Behnken factorial design with triplicate at the central point were $a = 80$ mV, $f = 85$ Hz and $\Delta E_s = 17$ mV. ANOVA showed that the variance explained is very close to the maximum explainable variance ($R_{sq} = 0.9896$; $R_{adj} = 0.9818$) and the lack of adjustment was not significant. The CPE/AgNPs-GAR showed a linear response in the range of 30 to $300.0 \mu\text{mol L}^{-1}$ of 5-FU, with detection and quantification limits equal to 0.76 and $2.53 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectively. The modified electrode was applied for the quantification of 5-FU in commercial injectable pharmaceutical formulation, with an average recovery percentage equal to 99.83 with relative standard deviation within acceptable limits (0.11%).

Keywords: carbon paste electrode; gold nanoparticles; silver nanoparticles; green synthesis; square wave voltammetry; Promethazine Hydrochloride; 5-Fluorouracil

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	–	Representação esquemática do fenômeno de RPS em uma nanopartícula metálica, mostrando a oscilação dos elétrons da banda de condução com a radiação incidente.....	21
Figura 2	–	Deslocamento dos valores de comprimento de onda com o diâmetro das AgNPs de (a) 19,0 nm (b) 30,4 nm (c) 57,0 nm (d) 64,1 nm (e) 95,3 nm.....	23
Figura 3	–	Esquema representando a medida da intensidade da luz espalhada por um ângulo θ	25
Figura 4	–	Esquema representando o raio hidrodinâmico obtido por DLS.....	26
Figura 5	–	Esquema geral de um microscópio eletrônico de transmissão.....	28
Figura 6	–	Frutos, flores e folhas da <i>Garcinia cochinchinensis</i>	35
Figura 7	–	Estrutura química de benzofenonas poliisopreniladas isoladas do pericarpo do fruto da <i>Garcinia conchinchinesis</i>	36
Figura 8	–	Estrutura química da morelloflavona.....	36
Figura 9	–	Estrutura química da garcianina.....	37
Figura 10	–	Estrutura da Prometazina.....	41
Figura 11	–	Estrutura química do agente quimioterápico 5-FU.....	43
Figura 12	–	(A) Solução aquosa a 10 mmol L ⁻¹ do complexo AuCl ₄ ⁻ . (B) Suspensão de AuNPs-GA.....	57
Figura 13	–	Processo de oxidação do monossacarídeo β -D-galactopiranosose.....	58
Figura 14	–	Processo de desprotonação que origina a forma linear do monossacarídeo β -D-galactopiranosose.....	59
Figura 15	–	Espectros de absorção na região do UV-VIS da suspensão de AuNPs-GA, HAuCl ₄ 0,625 mmol L ⁻¹ e GA 3,33 mg mL ⁻¹	60
Figura 16	–	Distribuição de tamanho de partículas obtida por DLS para as AuNPs-GA (A) correspondente à 52,91 nm e (B) correspondente à 318,5 nm.....	61
Figura 17	–	(A) Micrografias obtida na análise de TEM para as AuNPs-GA. (B) Histograma de distribuição de diâmetro das AuNPs-GA.....	62
Figura 18	–	Espectros vibracionais na região do infravermelho de filmes cast de GA 10 mg mL ⁻¹ e das AuNPs-GA sobre substratos de silício.....	63

Figura 19	–	Difratograma de raios X das AuNps-PFR após liofilização, com atribuição dos picos observados.....	64
Figura 20	–	(A) Espectros de absorção na região do UV-VIS da suspensão de AuNPs-GA ao longo de 60 dias. (B) Correlação entre os máximos de absorbância e o número de dias.....	65
Figura 21	–	(A) Voltamogramas cíclicos e (B) espectros de impedância eletroquímica (diagramas de Nyquist) do EPC-grafite e do EPCV, ambos modificados com 250 μL de AuNPs-GA, 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).....	66
Figura 22	–	(A) Voltamogramas cíclicos e (B) Espectros de impedância eletroquímica do EPCV/AuNPs-GA, EPCV/GA e EPCV não modificado, em meio de solução equimolar de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ preparada em tampão PBS 0,15 mol L^{-1} (pH 6,5).....	68
Figura 23	–	Voltamogramas cíclicos ($v = 50,0 \text{ mV s}^{-1}$) do EPC com diferentes volumes of AuNPs-GA (125,250, 500, e 1000 μL), na presença de 0,15 mol L^{-1} de tampão PBS (pH 7.4) contendo 10,0 mmol L^{-1} de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	71
Figura 24	–	Voltamogramas cíclicos (A) de um eletrodo sólido de ouro e (B) do EPCV/AuNPs-GA, EPCV/GA e EPCV não modificado, em meio ácido (tampão BR 0,04 mol L^{-1} pH 2,0).....	72
Figura 25	–	Voltamogramas cíclicos para o EPCV/AuNPs-GA na presença de $4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de PMZ em meio de KCl 0,1 mol L^{-1} e $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$	73
Figura 26	–	Mecanismo de oxidação da PMZ.....	74
Figura 27	–	Voltamogramas cíclicos do EPCV, do EPCV/GA e do EPCV/AuNPs-GA na presença de $1,96 \mu\text{mol L}^{-1}$ de PMZ, em meio de KCl 0,1 mol L^{-1} e $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. As linhas pontilhadas representam os voltamogramas dos mesmos eletrodos na ausência dos analitos.....	75
Figura 28	–	(A) Voltamogramas de onda quadrada para o Pico I (A) e para o pico III (B) do EPCV/AuNPs-GA na presença de $4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de PMZ, em meio de tampão BR 0,04 mol L^{-1} , com valores de pH variando na faixa de 2,0 a 6,0. Os gráficos inseridos em ambos são referentes as relações de E_{pa} em função do pH obtidas a partir dos voltamogramas.....	77
Figura 29	–	Voltamogramas de onda quadrada do EPCV/AuNPs-GA na presença de $4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de PMZ, em diferentes tipos de solução tampão, em pH 5,0 (parâmetros utilizados: $a = 50 \text{ mV}$; $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$; $f = 100 \text{ Hz}$).....	79

Figura 30	–	Voltamogramas cíclicos obtidos para $4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de PMZ, em meio de tampão McIlvaine em pH 5,0, com v variando de 10 a 100 mV s^{-1}80
Figura 31	–	Relações do duplo logaritmo ($\log I_{pa}$ vs. $\log v$) obtida para a PMZ.....82
Figura 32	–	Distribuição dos resíduos.....86
Figura 33	–	Superfícies de resposta obtidas no planejamento Box-Behnken com triplicata no ponto central.....86
Figura 34	–	(A) Voltamogramas de pulso onda quadrada obtidos com o EPCV/AuNPs-GA na faixa de $3,98$ a $15,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ de PMZ, em tampão McIlvaine pH 5,0, com $a = 90 \text{ mV}$, $f = 100 \text{ Hz}$ e $\Delta E_s = 8 \text{ mV}$ (B) Curva analítica obtida para o EPCV/AuNPs-GA (média de três determinações).....88
Figura 35	–	Efeito de AuNPs-GA e GA em leucócitos humanos. Os resultados são expressos em porcentagem em relação ao controle negativo (água destilada). Os valores são a média de 3 experimentos independentes realizados em duplicata $\pm$ desvio padrão.....95
Figura 36	–	Efeito das AuNPs-GA e da GA na fragilidade osmótica de eritrócitos humanos (os valores médios de absorvância foram obtidos de três experimentos independentes realizadas em duplicata e são proporcionais às células lisadas e à hemoglobina liberada).....96
Figura 37	–	Suspensão de AgNPs-GAR.....97
Figura 38	–	Espectros de absorção na região do UV-VIS da suspensão de AgNPs-GAR obtida e da solução de GAR $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$98
Figura 39	–	Oxidação da forma enólica.....99
Figura 40	–	Distribuição de tamanho de partículas obtida por DLS para as AgNPs-GAR.....100
Figura 41	–	(A) Micrografias obtidas na análise de TEM para as AuNPs-GAR (B) Histograma de distribuição de diâmetro das AgNPs-GAR.....100
Figura 42	–	A área selecionada de difração de padrão de elétrons das AgNPs-GAR.....101
Figura 43	–	Espectros vibracionais na região do infravermelho de filmes cast de GAR 2 mg mL^{-1} e das AgNPs-GAR sobre substratos de silício.....102
Figura 44	–	(A) Espectros de absorção na região do UV-VIS da suspensão de AgNPs-GAR ao longo de 90 dias. (B) Correlação entre os máximos de absorvância e o número de dias.....104
Figura 45	–	(A) Voltamogramas cíclicos e (B) espectros de impedância eletroquímica (diagramas de Nyquist) do EPC-grafite e do EPCV,

		ambos modificados com 500 μL de AgNPs-GAR, 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).....	104
Figura 46	–	(A) Voltamogramas cíclicos e (B) Espectros de impedância eletroquímica do EPC/AgNPs-GAR, EPC/GAR e EPC 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 mol L^{-1} preparada em tampão PBS 0,15 mol L^{-1} (pH 6,5).....	106
Figura 47	–	Voltamogramas cíclicos ($v = 50,0 \text{ mV s}^{-1}$) do EPC com diferentes volumes of AgNPs-GAR (250, 500, 750 e 1000 μL), na presença de 0,15 mol L^{-1} de tampão PBS (pH 7.4) contendo 10,0 mmol L^{-1} de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	108
Figura 48	–	Voltamogramas cíclicos do EPC não modificado, do EPC/GAR e do EPC/AgNPs-GAR na presença de $4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ 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 ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$).....	109
Figura 49	–	Mecanismo do processo de oxidação eletroquímica do 5-FU sobre os eletrodos estudados.....	110
Figura 50	–	(A) Voltamogramas de onda quadrada do EPC/AgNPs-GAR na presença de $4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de 5-FU, em meio de tampão BR 0,04 mol L^{-1} , com valores de pH variando na faixa de 2,0 a 12,0. (B) Relação de E_{pa} em função do pH obtidas a partir dos voltamogramas.....	112
Figura 51	–	Desprotonação do 5-FU.....	112
Figura 52	–	Voltamogramas de onda quadrada do EPC/AgNPs-GAR na presença de $4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de 5-FU, em diferentes tipos de solução tampão, em pH 8,0.....	114
Figura 53	–	(A)Voltamogramas cíclicos obtidos para $4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ 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} . (B)Relação do duplo logaritmo ($\log I_{pa}$ vs. $\log v$) obtida para o 5-FU.....	115
Figura 54	–	Distribuição dos resíduos.....	118
Figura 55	–	Superfícies de resposta em função das variáveis (A) ΔE_s e a , (B) f e ΔE_s e (C) f e a	118
Figura 56	–	(A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos com o EPC/AgNPs-GAR 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 mol L^{-1} pH 8,0. (B) Curva analítica obtida.....	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	–	Níveis e fatores estudados no Planejamento Box Behnken para a otimização dos parâmetros da VOQ para o EPCV/AuNPs-GA na determinação da PMZ.....	52
Tabela 2	–	Níveis e fatores estudados no Planejamento Box Behnken para a otimização dos parâmetros da VOQ para o EPC/AgNPs-GAR na determinação do 5-FU.....	56
Tabela 3	–	Principais bandas observadas no espectro de FTIR para filmes cast de GA (10 mg mL ⁻¹) e de AuNPs-GA, com as respectivas atribuições.....	63
Tabela 4	–	Valores de I _{pa} , I _{pc} , ΔE _p e R _{ct} obtidos em estudo comparativo para o EPC-grafite e para o EPCV modificados com AuNPs-GA.....	67
Tabela 5	–	Valores de I _{pa} , I _{pc} , ΔE _p e R _{ct} obtidos para o EPCV, para o EPCV/GA e para o EPCV/AuNPs-GA.....	68
Tabela 6	–	Valores médios da área eletroativa estimados do EPCV não modificado, EPCV/GA e EPCV/AuNPs-GA (n = 3 para cada um dos eletrodos).....	70
Tabela 7	–	Coeficientes de contraste para o planejamento fatorial Box-Behnken empregado para a otimização dos parâmetros da VOQ.....	84
Tabela 8	–	ANOVA obtida no tratamento estatístico dado aos resultados.....	85
Tabela 9	–	Parâmetros analíticos obtidos a partir da regressão linear das curvas para a determinação de PMZ com o EPCV não modificado, EPCV/GA e EPCV/AuNPs-GA.....	88
Tabela 10	–	Valores de LD e de LQ obtidos para a determinação de PMZ em diferentes trabalhos reportados na literatura.....	90
Tabela 11	–	Resultados para repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade de preparação do eletrodo para a determinação de PMZ com o EPCV/AuNPs-GA.....	91
Tabela 12	–	Valores de recuperação obtidos com o EPCV/AuNPs-GA na determinação de PMZ.....	92
Tabela 13	–	Resultados obtidos por VOQ para o estudo de recuperação em amostras de formulação farmacêutica comerciais empregando-se o EPCV/AuNPs-GA.....	93

Tabela 14	–	Principais bandas observadas no espectro de FTIR para filmes <i>cast</i> de GAR (2 mg mL ⁻¹) e de AgNPs-GAR, com as respectivas atribuições.....	102
Tabela 15	–	Valores de I _{pa} , I _{pc} , ΔE _p e R _{ct} obtidos em estudo comparativo para o EPC-grafite e para o EPCV.....	105
Tabela 16	–	Valores de I _{pa} , I _{pc} , ΔE _p e R _{ct} obtidos para o EPC, para o EPC/GAR e para o EPC/AgNPs-GAR.....	106
Tabela 17	–	Valores médios da área eletroativa estimados do EPC não modificado, EPC/GAR e EPC/AgNPs-GAR (n = 3 para cada um dos eletrodos).....	107
Tabela 18	–	Coeficientes de contraste para o planejamento fatorial Box-Behnken empregado para a otimização dos parâmetros da VOQ.(ΔEs : (-) = 11 mV , (0) = 14 mV , (+) = 17 mV ; α : (-) = 60 mV, (0) = 80 mV, (+) = 100 mV; f : (-) = 45 Hz , (0) = 65 Hz , (+) = 85Hz).....	116
Tabela 19	–	ANOVA obtida no tratamento estatístico dado aos resultados.....	117
Tabela 20	–	Parâmetros analíticos obtidos a partir da regressão linear das curvas e valores de LD e LQ para a determinação de 5- FU com o EPC não modificado, EPC/GAR e EPC/AgNPs-GAR.....	120
Tabela 21	–	Valores de LD e de LQ obtidos para a determinação de 5-FU por diferentes trabalhos reportados na literatura.....	121
Tabela 22	–	Resultados para repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade de preparação do eletrodo para a determinação de 5-FU com o EPC/AgNPs-GAR.....	122
Tabela 23	–	Valores de recuperação obtidos com o EPC/AgNPs-GAR na determinação do 5-FU.....	123
Tabela 24	–	Resultados obtidos por VOQ para o estudo de recuperação em amostra de formulação farmacêutica injetável de 5-FU empregando-se o EPC/AgNPs-GAR.....	124

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ΔE_p	Separação entre potenciais de pico
AgNPs	Nanopartículas de prata
AuNPs	Nanopartículas de ouro
AgNPs-GAR	Nanopartículas de prata estabilizadas no extrato de <i>Garcinia cochinchinensis</i>
AuNPs-GA	Nanopartículas de ouro estabilizadas na goma do abacaxi
BR	Tampão Britton-Robinson
CV	Carbono vítreo
DLS	Espalhamento dinâmico da luz
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/GA	Eletrodos(s) de pasta de carbono modificado com goma do abacaxi
EPCV/AuNPs-GA	Eletrodos(s) de pasta de carbono modificado com AuNPs-GA
EQM	Eletrodo(s) quimicamente modificado(s)
FTIR	Espectroscopia da região do infravermelho com transformada de Fourier
GA	Goma do abacaxi
GAR	<i>Garcinia cochinchinensis</i>
GAX	Glucoronoarabinoxilana
I_{pa}	Corrente de pico anódico
I_{pc}	Corrente de pico catódico
MNps	Nanopartículas metálicas
PBS	Tampão fosfato-salino
PMZ	Cloridrato de prometazina
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
R_{ct}	Resistência à transferência de carga
UV-VIS	Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível
VC	Voltametria cíclica
VOQ	Voltametria de onda quadrada
v	Velocidade de varredura de potencial

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
1.1 NANOPARTÍCULAS DE OURO E DE PRATA: PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS E APLICAÇÕES	20
1.2 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DA MORFOLOGIA E TAMANHO DAS MNPS	24
1.2.1 Espalhamento Dinâmico da Luz	24
1.2.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão	26
1.3 SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO E PRATA	28
1.4 POLISSACARÍDEOS DE GOMAS DE EXSUDATOS	32
1.5 <i>Garcinia Conchichinensis</i>	34
1.6 ELETRODOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS COM NANOPARTÍCULAS DE OURO E DE PRATA SINTETIZADAS POR ROTAS VERDES	37
1.7 ANALITOS EMPREGADOS NESTE TRABALHO	40
1.7.1 Cloridrato de Prometazina	40
1.7.5 5-Fluorouracil	42
2 OBJETIVOS	46
2.1 OBJETIVO GERAL	46
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
3 MATERIAIS E MÉTODOS	48
3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES	48
3.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	48
3.2.1 Síntese das Nanopartículas de Ouro Estabilizadas na GA (AuNPs-GA) e de Prata Estabilizadas na GAR (AgNPs-GAR)	48
3.2.2 Caracterização das Nanopartículas Metálicas	49
3.2.2 Preparação dos Eletrodos Modificados e Não Modificados	50
3.2.5 Caracterização Eletroquímica dos Eletrodos	50
3.2.6 Determinação Voltamétrica do Cloridrato de Prometazina	51
3.2.7 Otimização dos Parâmetros da Voltametria de Onda Quadrada (VOQ) empregando-se o EPCV/AuNPs-GA para a Determinação do PMZ	52

3.2.8	Obtenção de Curvas Analíticas com o EPCV/AuNPs-GA na Presença da PMZ.....	52
3.2.9	Determinação da PMZ em Formulações Farmacêuticas Comerciais.....	53
3.2.10	Ensaio de Hemocompatibilidade.....	53
3.2.10.1	Ensaio de citotoxicidade em leucócitos humanos.....	53
3.2.10.2	Ensaio de fragilidade osmótica em eritrócitos humanos.....	54
3.2.10.2	Análise estatística.....	54
3.2.13	Determinação voltamétrica do 5-Fluorouracil.....	55
3.2.14	Otimização dos parâmetros da voltametria de onda quadrada (VOQ) empregando-se o EPC/AgNPs-GAR para a determinação do 5-FU.....	55
3.2.15	Obtenção de curvas analíticas para o EPC/AgNPs-GAR na presença de 5-FU.....	56
3.2.16	Determinação do 5-FU em formulações farmacêuticas comerciais.....	56
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
4.1	NANOPARTÍCULAS DE OURO ESTABILIZADAS EM POLISSACARÍDEO EXTRAÍDO DA GOMA DO ABACAXI (<i>Ananas comosus</i>): APLICAÇÃO EM ELETRODO DE PASTA DE CARBONO PARA A DETERMINAÇÃO DO CLORIDRATO DE PROMETAZINA.....	57
4.1.1	Síntese e Caracterização das AuNPs-GA.....	57
4.1.2	Caracterização Eletroquímica do EPCV Modificado com AuNPs-GA (EPCV/AuNPs-GA).....	66
4.1.3	Determinação do Cloridrato de Prometazina (PMZ).....	73
4.1.3.1	Comportamento voltamétrico.....	73
4.1.3.2	Influência do pH na resposta voltamétrica da PMZ.....	76
4.1.3.3	Influência do eletrólito suporte.....	78
4.1.3.4	Influência da velocidade de varredura.....	80
4.1.3.5	Otimização dos parâmetros da VOQ.....	83
4.1.3.6	Obtenção de curvas analíticas.....	87
4.1.3.7	Determinação de níveis de repetibilidade, reprodutibilidade e ensaios de recuperação.....	90
4.1.3.8	Determinação em formulação farmacêutica comercial.....	92
4.1.4	Ensaio de Hemocompatibilidade.....	93
4.1.4.1	Ensaio de citotoxicidade em leucócitos humanos.....	94
4.1.4.2	Ensaio de fragilidade osmótica em eritrócitos humanos.....	95

4.2	UM NOVO SENSOR ELETROQUÍMICO PARA O AGENTE ANTI-TUMORAL 5-FLUOROURACIL BASEADO EM UM ELETRODO DE PASTA DE CARBONO MODIFICADO COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA ESTABILIZADAS EM EXTRATO DE <i>Garcinia Cochinchinensis</i>	97
4.2.1	Síntese e Caracterização das AgNPs-GAR.....	97
4.2.2	Caracterização Eletroquímica do EPC Modificado com AgNPs-GAR (EPC/AgNPs-GAR).....	104
4.2.3	Determinação eletroanalítica do 5-Fluorouracil (5-FU).....	109
4.2.3.1	Comportamento voltamétrico.....	109
4.2.3.2	Influência do pH na resposta voltamétrica do 5-FU.....	111
4.2.3.3	Influência do eletrólito suporte.....	113
4.2.3.4	Influência da velocidade de varredura.....	114
4.2.3.5	Otimização dos parâmetros da VOQ.....	115
4.2.3.6	Obtenção de curvas analíticas.....	119
4.2.3.7	Determinação de níveis de repetibilidade, reprodutibilidade e ensaios de recuperação.....	121
4.2.3.8	Determinação em formulação farmacêutica comercial.....	123
5	CONCLUSÕES	125
6	PERSPECTIVAS	127
	REFERÊNCIAS	128

INTRODUÇÃO

O interesse acerca de materiais cujas partículas que os constituem encontram-se na escala nanométrica ($1\text{ nm} = 10^{-9}\text{ m}$) ganhou destaque no final do século XX, levando ao surgimento da Nanotecnologia (ZARBIN, 2007). Os nanomateriais apresentam diferentes propriedades comparando-se às observadas quando o mesmo material encontra-se em escala macroscópica (ou *bulk*), evidenciando o fato de que as propriedades dos materiais são fortemente dependentes do tamanho das partículas do mesmo (ZARBIN, 2007; BUZEA; PACHECO; ROBBIE, 2007).

Dentre os materiais nanoestruturados, as nanopartículas metálicas (MNps) são amplamente estudadas e utilizadas pelas mais diversas áreas. (VIJAYARAGHAVAN; ASHOKKUMAR et al, 2017). Existem dois efeitos principais responsáveis pela variação nas propriedades das MNps: efeitos de superfície e efeitos quânticos. Os efeitos de superfície estão relacionados à fração de átomos de superfície. O número de átomos presentes na superfície de uma MNps é maior comparado ao que se observa para o mesmo metal em uma dimensão *bulk*, o que acarreta em um aumento significativo em sua área superficial. Esta particularidade possibilita uma melhora em processos dependentes de fenômenos de superfície, tais como reatividade química e atividade catalítica. Além disso, os átomos na superfície das MNps possuem um número de coordenação menor. Consequentemente, tais átomos são menos estáveis termodinamicamente, apresentando elevada energia e susceptibilidade para formar ligações. (BUZEA; PACHECO; ROBBIE, 2007; FILIPPONI; SUTHERLAND, 2012). Os efeitos quânticos estão relacionados com variações nas propriedades ópticas e eletrônicas de um nanocomposto e são explicados pelo fato de que, nos nanomateriais, os portadores de carga ficam confinados nas dimensões reduzidas da nanopartículas. Os nanomateriais que exibem tal comportamento são denominados *quantum dots*. Essas nanoestruturas comportam-se como átomos individuais, obedecendo às leis da mecânica quântica. O confinamento quântico acarreta no aparecimento de momento magnético em nanopartículas de materiais que não são magnéticos na dimensão *bulk* e alterações na tendência do material em ceder ou receber elétrons, interferindo diretamente em sua reatividade. (BUZEA; PACHECO; ROBBIE, 2007; FILIPPONI; SUTHERLAND, 2012).

Vários métodos são utilizados para sintetizar as MNps, os quais podem ser divididos em métodos físicos (*top down*) e métodos químicos (*bottom up*). O método *top down* consiste da obtenção da MNps partindo-se do material em escala *bulk*, sendo que este é manipulado até que se atinja a escala de tamanho desejada. Processos físicos como desintegração térmica e

mecânica são comumente utilizados, entretanto, tais processos eventualmente produzem imperfeições na superfície das MNps sintetizadas. (MITTAL; CHISTI; BANERJEE, 2013). No método *bottom up*, são gerados átomos do precursor metálico utilizado (número de valência igual à zero) via redução ou decomposição química do metal precursor. Esses átomos gerados aglomeram-se em estruturas denominadas *clusters* que crescem e dão origem às MNps. Agentes redutores como sais e compostos inorgânicos (como borohidreto de sódio e citrato de sódio), compostos orgânicos (como ácido fórmico, brometo de tetraoctilamônio e ácido ascórbico), biomoléculas (como mono e polissacarídeos), dentre outros, são usualmente utilizados. (SOUZA et al, 2019)

Por possuírem uma elevada área superficial e, conseqüentemente, uma alta energia associada à superfície, as MNps são termodinamicamente instáveis e tendem a formar aglomerados. Essa aglomeração é indesejada, uma vez que pode acarretar na perda das propriedades que foram adquiridas pelos materiais ao alcançarem a escala nanométrica. Assim, faz-se necessário a aplicação de estratégias de estabilização das nanopartículas. (VOLLMER; JANIÁK, 2011). Os principais agentes estabilizantes utilizados na síntese de MNps são: hidrocarbonetos de cadeias longas (como oleilamina, ácido oleico e octadecilamina), polímeros, compostos supramoleculares (como calixarenos e dendrímeros), moléculas pequenas (glicose, oxalato, citrato, etileno glicol, formaldeído, dimetilformamida e ácido ascórbico) e biomoléculas (como peptídeos, proteínas e polissacarídeos). (DUAN; WANG; LI, 2015; NIU; LI, 2014; TAURAN et al., 2013).

Outra propriedade que diversifica as aplicações das MNps é a possibilidade de sua obtenção em uma variedade de morfologias, o que pode favorecer a interação com moléculas e biomoléculas específicas, além de modificar suas propriedades ópticas (fenômeno RPS). Dependendo das condições empregadas durante o processo de obtenção, as MNps podem ser produzidas em formas como nanoesferas, nanobastões, nanocubos, nanoestrelas, nanoconchas, nanobowls, octaedros etc. (DYKMAN; KHLEBTSOV, 2012; GARCIA-LEIS; RIVERA-ARREBA; SANCHEZ-CORTES, 2017)

Apesar das inúmeras características atrativas que as nanopartículas possuem, impactos negativos ao meio ambiente e a saúde podem eventualmente acontecer devido ao emprego de tais compostos na produção desses materiais. (KHARISSOVA et al., 2013; KUMAR; LATHER; PANDITA, 2015). Simultaneamente, apesar do intenso desenvolvimento no estudo e produção de materiais nanoestruturados, os efeitos adversos dos mesmos ao meio ambiente não são totalmente conhecidos. Processos de síntese empregando-se reagentes ecologicamente amigáveis e biocompatíveis podem diminuir a toxicidade dos nanomateriais resultantes,

causando um menor impacto ao meio ambiente. (SANCHEZ; VILCHIS, 2012; KHARISSOVA et al., 2013). A denominada “nanotecnologia verde” tem por objetivo principal reduzir as eventuais consequências atreladas à produção de nanomateriais via introdução de reagentes de fontes naturais nos processos de síntese. Dentre esses reagentes, destacam-se os extratos vegetais, vitaminas, polímeros biodegradáveis, microorganismos e polissacarídeos que atuam como agentes redutores e/ou estabilizantes. (DUAN; WANG; LI, 2015; KHARISSOVA et al., 2013; KUMAR; LATHER; PANDITA, 2015; MITTAL; CHISTI; BANERJEE, 2013; RAUWEL et al., 2015). A síntese verde de nanopartículas possui vantagens em comparação aos métodos convencionais, uma vez que compostos e extratos naturais são empregados para as reações de síntese, e desta forma procedimentos mais econômicos são desenvolvidos. Destaca-se também a reprodutibilidade de síntese e a maior estabilidade das nanopartículas sintetizadas. (KHARISSOVA et al., 2013; KUMAR; LATHER; PANDITA, 2015). A utilização de extratos vegetais, os quais são constituídos de biomoléculas (como flavonoides, compostos fenólicos, proteínas e polissacarídeos) conferem praticidade na síntese, uma vez que tais biomoléculas são capazes de atuar, simultaneamente, como agentes redutores e estabilizantes. Assim, a reação de geração das MNPs ocorre em apenas uma etapa, sem a necessidade de adição de outros reagentes. (KHARISSOVA et al., 2013; KUMAR; LATHER; PANDITA, 2015; RAUWEL et al., 2015). Além das vantagens anteriormente citadas, nanopartículas obtidas por métodos verdes de síntese possuem uma maior biocompatibilidade, o que aumenta o potencial de aplicação biológica das mesmas. A utilização de reagentes derivados de extratos naturais pode minimizar eventuais efeitos tóxicos (KUMAR; LATHER; PANDITA, 2015; SCHRÖFEL et al., 2014) e também favorecer a interação com sistemas biológicos tais como células, proteínas ou tecidos.

Dentre as MNPs, destacam-se as nanopartículas de metais nobres, em especial as nanopartículas de ouro (AuNPs) e de prata (AgNPs) devido as suas características tais como maior biocompatibilidade, alta área superficial, possibilidade de funcionalização em sua superfície, além de facilitarem processos de transferência de elétrons. As características das AuNPs e das AgNPs têm estimulado diferentes campos de aplicação nos últimos anos e a exploração de suas propriedades tem permitido a aplicação das mesmas em diversas áreas como medicina, biotecnologia e no desenvolvimento de sensores e biossensores. (ALEXANDRIDIS, 2011; KLEIJN et al., 2014; MODY et al., 2010).

Esses nanomateriais possuem propriedades diferenciadas e características que favorecem a sua aplicação no desenvolvimento de dispositivos eletroquímicos. 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 as AuNPs e as AgNPs estejam entre os mais empregados para detecção de analitos de importância biomédica, farmacológica, industrial e ambiental. Além disso, pode-se dizer que as suspensões das referidas nanopartículas podem ser facilmente incorporadas a diversos tipos de eletrodos como filmes, eletrodos sólidos e eletrodos de pasta de carbono. (SAHA et al., 2012).

As rotas verdes de síntese de MNPs, além de trazerem vantagens ao nanomaterial sintetizado, acarretam em vantagens também para o sensor. Dentre essas, pode-se citar a viabilidade econômica no processo de fabricação, o que minimiza o custo total do dispositivo. Além disso, a maior biocompatibilidade das MNPs resultantes de processos verdes de síntese, permite sua interação com biomoléculas (como proteínas, enzimas e anticorpos) e favorece as aplicações do sensor desenvolvido em sistemas biológicos.

Dentro deste contexto, o presente trabalho propõe o desenvolvimento de dois dispositivos eletroquímicos simples e eficientes para a determinação do Cloridrato de Prometazina e do 5-Fluorouracil. Tais dispositivos baseiam-se na modificação de um EPC modificado com AuNPs e AgNPs sintetizadas por rotas verdes empregando-se o polissacarídeo extraído da goma do abacaxi (GA) e o extrato de *Garcinia cochinchinensis* (GAR), respectivamente. Tais extratos foram escolhidos por possuírem grupos passíveis de oxidação e serem de fácil obtenção, uma vez que são abundantes na natureza. Além disso, o emprego de extratos naturais em rotas verdes de síntese é uma potencial aplicação biotecnológica para os mesmos. Neste trabalho também está apresentado a síntese e caracterização das MNPs. A GA e a GAR atuaram simultaneamente como agente redutor e estabilizante na síntese dos referidos nanomateriais. A utilização de tais extratos na síntese de nanopartículas metálicas é inédito, não sendo reportado nenhum trabalho anterior na literatura.

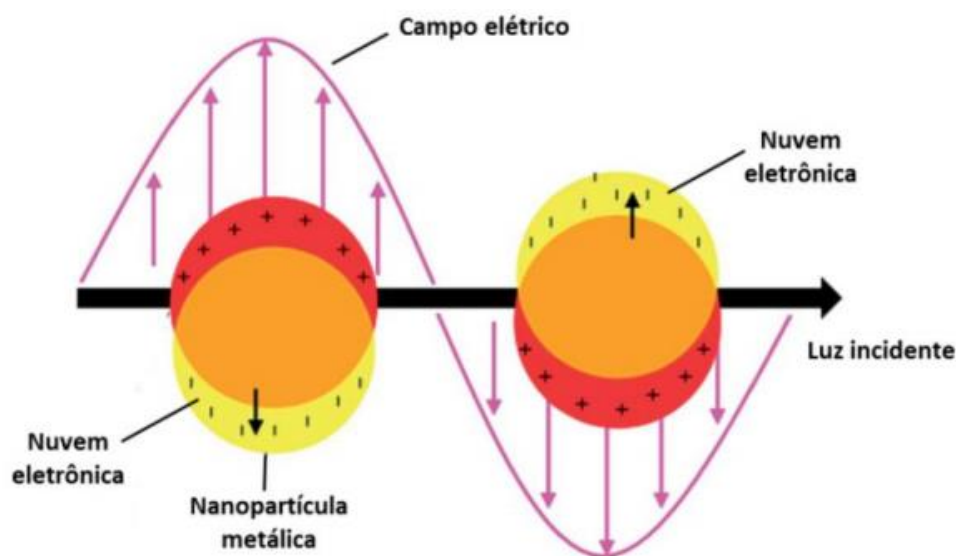
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 NANOPARTÍCULAS DE OURO E DE PRATA: PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS E APLICAÇÕES

As particularidades das nanopartículas de ouro (AuNPs) têm estimulado diferentes áreas nos últimos anos. A exploração das propriedades ópticas, eletrônicas, magnéticas e a biocompatibilidade deste nanomaterial tem permitido seu emprego em diferentes campos de aplicação. (SHI; ZHU; WU, 2015). É relatado na literatura a aplicação de AuNPs em catálise (em especial em reações de hidrogenação e degradação de compostos orgânicos) (SHI; ZHU; WU, 2015; CHOI et al., 2014), medicina e biomedicina (no tratamento de câncer, *drug delivery* e atividade antioxidante) (CRUZ et al., 2014; POOJA et al., 2015), biotecnologia (explorando sua atividade antimicrobiana) (RATTANA, et al., 2016) e no desenvolvimento de sensores e biossensores (SAHA et al., 2012).

As AuNPs, assim como algumas nanopartículas metálicas, exibem um fenômeno é denominado ressonância plasmon de superfície (RPS) o qual ocorre sempre em valores específicos de frequência (Figura 1). Este é decorrente do fato de que ao expor à radiação uma suspensão de AuNPs, o campo eletromagnético incidente irá induzir uma oscilação dos elétrons livres presentes na banda de condução do metal. Consequentemente, os elétrons deslocam-se de suas posições de equilíbrio, causando uma polarização em toda a superfície da nanopartículas. O dipolo criado oscila juntamente com o componente elétrico da radiação. (HUANG; EL-SAYED, 2010; KHLEBTSOV; DYKMAN, 2010). A energia associada a esse fenômeno depende de fatores que afetam a densidade eletrônica na superfície das partículas, tais como tamanho, morfologia, distância entre essas partículas e o meio no qual estão dispersas.

Figura 1 – 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.

Para as AuNPs, o fenômeno da RPS ocorre na região do visível do espectro eletromagnético, fato este que explica a coloração intensa que as suspensões de AuNPs apresentam. (HUANG; EL-SAYED, 2010; SAHA et al., 2012; YESHCENKO et al., 2013). O espectro de absorção de uma suspensão de AuNPs caracteriza-se por uma banda única denominada de banda plasmon em torno de 520 nm, podendo apresentar variações dependendo do tamanho das partículas. Conforme mencionado anteriormente, um dos fatores que alteram a energia de absorção decorrente do fenômeno RPS é o tamanho das partículas. Em decorrência disso, uma variação no diâmetro das AuNPs acarretará em uma alteração na coloração da suspensão. Para AuNPs com tamanhos inferiores a 10 nm, a banda plasmon apresenta pouca proeminência, em consequência de mudanças de fase resultantes do grande número de colisões entre os elétrons oscilantes na superfície da partícula. Já em suspensões de AuNPs com mais de 100 nm, observa-se um alargamento da banda plasmon, em resposta da contribuição de oscilações de ordens superiores para o fenômeno RPS. (HUANG; EL-SAYED, 2010). A agregação das partículas também é um fator que altera a energia da RPS para as AuNPs, sendo observado um alargamento da banda plasmon quando as partículas formam agregados. Nesse caso, observa-se um deslocamento do máximo de absorção para comprimentos de onda maiores e a suspensão apresenta uma mudança de coloração de vermelha para azul. (SAHA et al., 2012). A possibilidade de obter AuNPs em morfologias diferentes amplia o potencial de aplicação

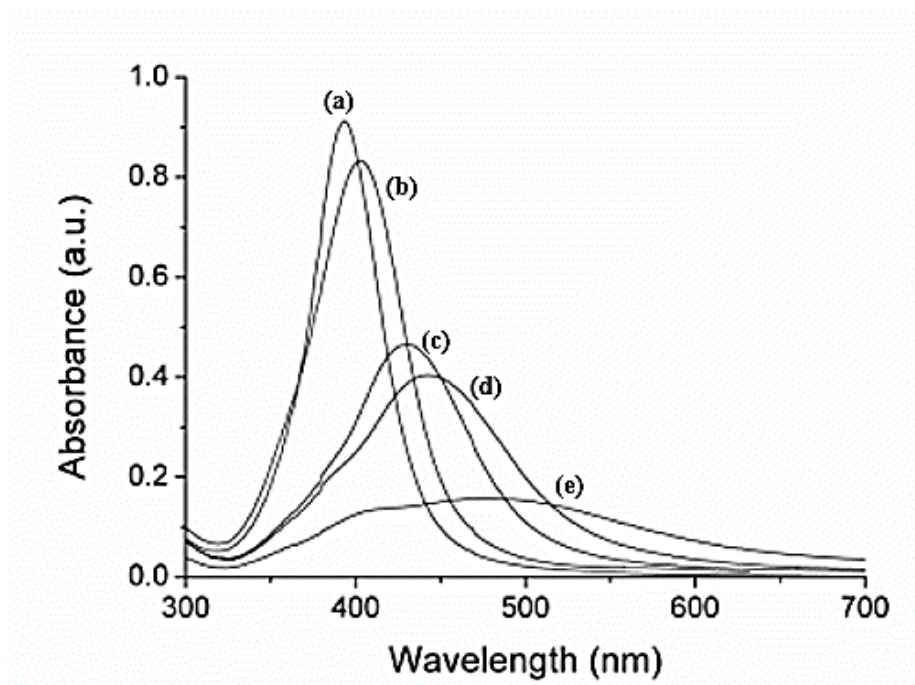
destes nanomateriais. Além de modificar suas propriedades ópticas através de alterações no fenômeno RPS, a síntese de AuNPs em diferentes formas pode beneficiar a sua interação com moléculas específicas. Ao empregar condições ideais, é possível se obter AuNPs em formas como nanoesferas, *nanobowls*, nanobastões, nanocubos, nanoestrelas, octaedros, bipirâmides e tetraedros. (KHLEBTSOV; DYKMAN, 2010).

Devido às suas propriedades únicas tais como estabilidade química, elevada condutividade elétrica e térmica, interessantes propriedades óticas, atividade catalítica, relativo baixo custo de produção e uma acentuada ação antimicrobiana frente a bactérias, vírus, fungos e protozoários, as nanopartículas de prata (AgNPs), são vastamente estudadas. Tais características permitem que as AgNPs sejam amplamente utilizadas em diferentes áreas (DURÁN, et al., 2019). É relatado na literatura a aplicação de AgNPs em catálise (KALANTARI, et al., 2017; YAO, et al., 2018) e na medicina, em especial no tratamento de câncer (RAJAWAT; MALIK, 2019; GOMATHI, et al., 2020; MAJEED, 2019) e *drug delivery* (PRAPHA KAR, et al., 2018; ÖZTÜRK KÜP; ÇOŞKUNÇAY; DUMAN, 2020). Na indústria alimentícia, as AgNPs são utilizadas no desenvolvimento de embalagens de alimentos com atividade antimicrobiana (KOWSALYA et al., 2019; YU, et al., 2019; MOURA; MATTOSO; ZUCOLOTTI, 2012). A indústria têxtil também vem empregando esse nanomaterial devido a sua pronunciada atividade antimicrobiana, sendo uma aplicação interessante para vestimentas médicas, curativos, roupas de cama dentre outros (BUDAMA, et al., 2013; HASSAN, 2019; BALLOTIN, et al., 2017). As propriedades condutoras das AgNPs também vêm sendo exploradas, em especial no desenvolvimento de sensores (ZHANG, et al., 2018; SUN, et al., 2019) e biossensores (HASSANPOUR; SAADATI; HASANZADEH, 2020; THUNKHAMRAK, et al., 2020). A elevada área superficial, a capacidade de acelerar a transferência de elétrons entre substâncias eletroativas e a superfície do eletrodo bem como a capacidade de incluir as nanopartículas em várias configurações durante o desenvolvimento do sensor e biossensor estão entre as principais razões pelo qual houve um aumento no interesse das pesquisas em utilizar AgNPs na construção de dispositivos eletroquímicos. (DODEVSKA, et al., 2019).

As AgNPs, assim como as AuNPs, absorvem e dispersam a luz com eficiência extraordinária e esta interação ocorre porque os elétrons de condução na superfície do metal sofrem uma oscilação coletiva quando são excitados pela luz em comprimentos de onda específicos, a qual é conhecida como ressonância plasmônica de superfície (RPS). O espectro de absorção de uma suspensão de AgNPs caracteriza-se por uma banda RPS única em torno de 400 nm podendo apresentar variações relacionadas ao diâmetro deste nanomaterial (no caso de

nanopartículas esféricas) e também a agregação. Nanopartículas de prata esféricas com diâmetros em cerca de 10 nm apresentam uma banda RPS em 400 nm. Com o aumento no diâmetro, a banda RPS desloca-se para comprimentos de onda maiores. Um alargamento no formato da banda também é observado. (NANOCOMPOSIX, 2019; SMITHA, et al., 2007). Tal comportamento foi observado por Paramelle e colaboradores (2014), e encontra-se na Figura 2. Os autores observaram um deslocamento do comprimento de onda para regiões maiores a medida em que se aumentou o diâmetro das AgNPs.

Figura 2 – Deslocamento dos valores de comprimento de onda com o diâmetro das AgNPs estabilizadas em citrato de (a) 19,0 nm (b) 30,4 nm (c) 57,0 nm (d) 64,1 nm (e) 95,3 nm



Fonte: Adaptado de Paramelle et al (2014).

As propriedades ópticas das AgNPs também são influenciadas pela agregação das mesmas. Quando as partículas se agregam, os elétrons de condução próximos a cada superfície de partícula se deslocalizam e são compartilhados entre as partículas vizinhas. Assim, a ressonância plasmônica da superfície muda para energias mais baixas, fazendo com que os picos de absorção se desloquem-se para regiões de maiores comprimentos de onda do espectro. Deste modo, a espectroscopia UV-Visível pode ser usada como um método simples e confiável para monitorar a estabilidade das soluções de nanopartículas. À medida que as partículas se desestabilizam, a intensidade do pico de absorção diminui (proporcionado pelo esgotamento de nanopartículas estáveis) e, muitas vezes, o pico se amplia ou um pico secundário se forma em

comprimentos de onda mais longos (devido à formação de agregados). (NANOCOMPOSIX, 2019; SMITHA, et al., 2007).

Conforme citado anteriormente, nanopartículas de metálicas são extensivamente estudadas em relação às suas aplicações biomédicas. Trabalhos recentes relatam a utilização de nanopartículas (principalmente AuNPs) em diferentes áreas médicas, como terapia fotodinâmica (CALAVIA, et al., 2018), terapia fototérmica (RILEY, et al., 2017), diagnóstico por imagem (COLE, et al., 2015) e sistemas de administração de medicamentos (PRAPHA KAR, et al., 2018). Tais aplicações envolvem principalmente a administração intravenosa de nanopartículas como uma maneira de atingir tecidos e órgãos específicos.

Nesse contexto, a avaliação primária dos possíveis efeitos tóxicos das nanopartículas metálicas para as células sanguíneas consiste em um tópico essencial para uma aplicação mais segura dessas nanoestruturas (WEBER, et al., 2018). Com esse objetivo, estudos de hemocompatibilidade para nanopartículas metálicas e de óxidos metálicos já são reportados na literatura (ANGELOVA, et al., 2017; UCHIYAMA, et al, 2014; RUNDLE, et al., 2016; GOSHI, et al., 2012). Este também é um estudo relevante para a aplicação das nanopartículas sintetizadas em biossensores, visando a detecção de analitos em amostras sanguíneas.

Como grande parte das propriedades e aplicações das MNPs estão relacionadas ao seu tamanho e forma, a avaliação destas é de grande importância de forma a direcionar a aplicação das nanopartículas obtidas. As principais técnicas para avaliação destas propriedades são o Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM).

1.2 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DA MORFOLOGIA E TAMANHO DAS MNPS

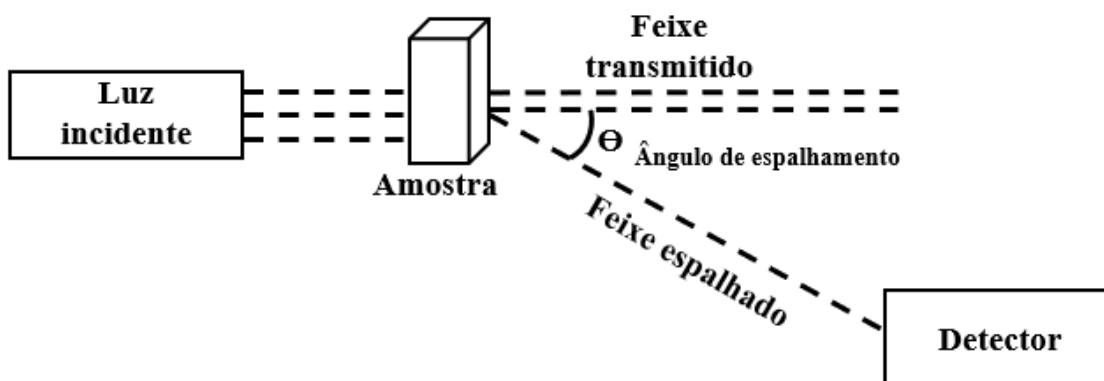
1.2.1 Espalhamento Dinâmico da Luz

Dentre as técnicas mais importantes na caracterização de MNPs, pode-se citar o Espalhamento dinâmico da luz (DLS) e a Microscopia eletrônica de transmissão (TEM), as quais tem por objetivo determinar o tamanho das partículas sintetizadas.

O DLS é um dos métodos mais utilizados na determinação do tamanho de nanopartículas metálicas. Nesta análise, a suspensão de nanopartículas é exposta a um feixe de luz. Ao incidir sobre as nanopartículas que estão em constante movimento (Movimento Browniano), a direção e a intensidade da luz são alterados em um determinado ângulo, conforme pode ser visualizado na Figura 3. Esta análise, portanto, irá fornecer informações

acerca do movimento das nanopartículas, o qual é responsável pelo espalhamento da luz que foi inicialmente incidida.

Figura 3 – Esquema representando a medida da intensidade da luz espalhada por um ângulo θ .



Fonte: Adaptado de Scharltl, 2007.

Para amostras monodispersas com partículas não-interagentes (ou seja, diluídas), em movimento Browniano, é possível extrair o coeficiente de difusão translacional da partícula, D_T a partir do ângulo de espalhamento. Considerando as partículas esfericamente, usa-se a equação de Stokes-Einstein para o cálculo do diâmetro hidrodinâmico, das partículas em equilíbrio térmico com o solvente:

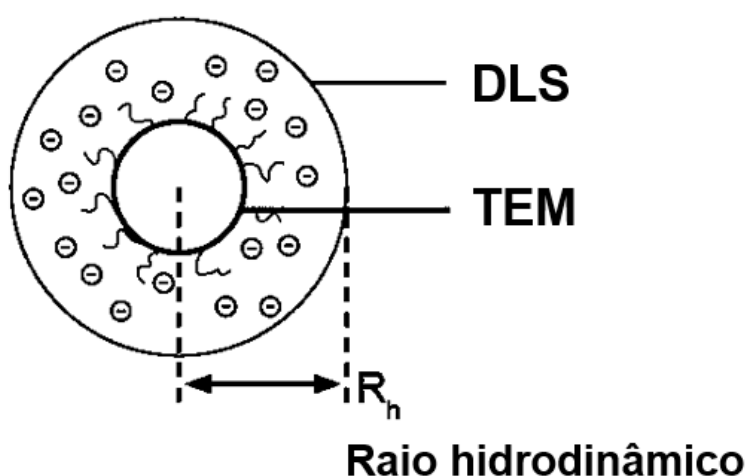
$$D_f = \frac{k_B T}{6\pi \eta R_H}$$

onde D_f é o coeficiente de difusão, k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura, η é a viscosidade do meio dispersante e R_H é o raio hidrodinâmico das partículas em suspensão (LIM et al., 2013). Entretanto, as partículas em suspensão nem sempre são esféricas e, além disso, são solvatadas ou estabilizadas por outras moléculas (Figura 4). As estruturas ao redor das nanopartículas movem-se juntamente com as mesmas e como consequência o diâmetro hidrodinâmico obtido por DLS inclui a camada de hidratação e o conjunto de moléculas que estabilizam as nanopartículas (MALVERN INSTRUMENTS LIMITED, 2011).

1.2.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão

O diâmetro real de uma nanopartícula é frequentemente obtido pela técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) que não detecta as moléculas arranjadas ao seu redor e é capaz de fornecer, deste modo, o tamanho da partícula em si, conforme pode ser visualizado na Figura 4. (LIM et al., 2013).

Figura 4 – Esquema representando o raio hidrodinâmico obtido por DLS



Fonte: Adaptado de Chaâbani, 2019

O TEM é uma técnica que permite a visualização e análise de amostras em escala nanométrica ($1 \text{ nanômetro} / \text{nm} = 10^{-9} \text{ m}$). Tal equipamento revela níveis de detalhe e complexidade de micro e nanoestruturas inacessíveis para um microscópio ótico, uma vez que um feixe focalizado de elétrons de alta energia é utilizado para se “iluminar” a amostra no TEM. O equipamento também permite a investigação de estruturas cristalinas, orientações de amostras e composições químicas de fases, precipitados e contaminantes através padrão de difração, raios X e análise de energia eletrônica. (MA; SHIEH; QIAO, 2006)

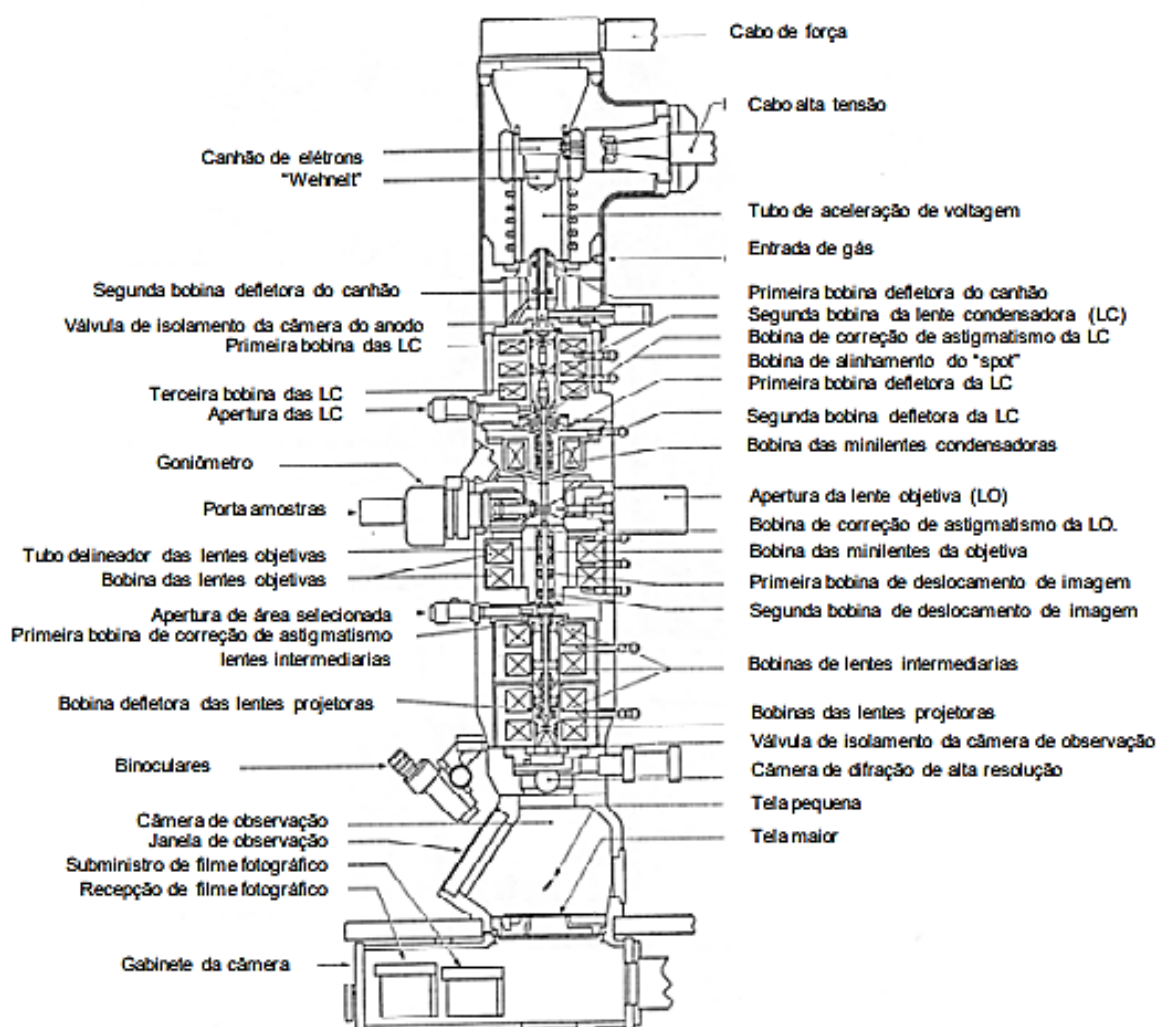
O fundamento do TEM baseia-se na geração de um feixe de elétrons, o qual é transmitido através de uma amostra suficientemente fina (transparente ao feixe). Os feixes resultantes da interação com a amostra, combinados através da lente objetiva fornecem informação interna do material analisado como morfologia, estrutura cristalina e defeitos. Além disto, usando detectores especiais, os sinais gerados pela interação do feixe com a amostra podem ser coletados, por exemplo, para se obter informação da composição da amostra. O

instrumento usa como fonte de iluminação elétrons devido a seu pequeno comprimento de onda que é inversamente proporcional a energia do feixe incidente na amostra, por exemplo, 0,0025 nm a 200 kV e 0,0017 nm a 300 kV, permitindo observar estruturas com resolução até em escala atômica (WILLIAMS; CARTER, 2009).

Por meio de uma diferença de potencial aplicado (na ordem de dezenas ou centenas de kV), um feixe de elétrons é acelerado ao longo da coluna do microscópio, passando por uma série de aberturas e lentes magnéticas condensadoras antes de atingir a amostra. Ao atingir a amostra, o feixe de elétrons interage com ela à medida em que a atravessa. A amostra é disposta entre a fonte de elétrons e um anteparo, onde a imagem ampliada é formada pelo impacto dos elétrons transmitidos e difratados. A imagem gerada é uma projeção bidimensional da amostra, em campo claro ou escuro, ou ainda de difração de elétrons, dependendo do modo de operação do equipamento (ASTUTO, 2020)

O TEM é constituído basicamente por um sistema de iluminação, uma coluna que contém o sistema de lentes, um sistema de aquisição de informação, o porta-amostras, e detectores externos que podem ou não serem acoplados ao equipamento. O sistema de iluminação é encarregado de gerar o feixe de elétrons. As principais fontes de emissão de elétrons utilizadas são de emissão termiônica (filamento tungstênio e LaB6) e de emissão de campo (FEG). Dentro da coluna, que deve estar a vácuo, encontram-se o sistema de lentes condensadoras, objetivas, intermediárias e projetoras. A lente objetiva limita o poder de resolução do microscópio. As lentes intermediárias e projetoras são as encarregadas de projetar e magnificar seja a imagem ou o padrão de difração. Finalmente, a imagem é projetada numa tela fosforescente, podendo também ser impressa num filme fotográfico, ou capturada por uma câmera CCD. No geral parece um sistema simples, mas existe uma complexidade de elementos dentro do instrumento, conforme pode ser observado na Figura 5. (WILLIAMS; CARTER, 2009; JEOL 2100, 2004)

Figura 5 – Esquema geral de um microscópio eletrônico de transmissão



Fonte: JEOL 2100, 2004

1.3 SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO E DE PRATA

As nanopartículas de ouro são geralmente produzidas pela redução do ácido tetracloroaúrico com vários agentes, como borohidreto, aminas, álcoois, ácidos carboxílicos, citrato de sódio, ácido ascórbico e outros. Ao mesmo tempo, moléculas orgânicas ou polímeros podem ser adicionados ao sistema para impedir a agregação das nanopartículas formadas. A morfologia final é geralmente esférica. No entanto, conforme já dito anteriormente, o emprego de tais agentes químicos pode vir a causar efeitos negativos na saúde humana e no meio ambiente, uma vez que frequentemente utilizam-se agentes redutores e estabilizantes tóxicos. Portanto, é crucial explorar opções alternativas para a síntese de AuNPs (KHAN et.al.,2019;

SOUZA; NOGUEIRA; ROSTELATO, 2019; KALIMUTHU, K.; CHA, B.S.; KIM, S.; PARK, K.S, 2020).

A utilização de estratégias verdes para a produção de AuNPs apresenta 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). De maneira geral, pode-se afirmar que extratos vegetais que possuem biomoléculas tais como compostos fenólicos, terpenoides, flavonoides, polissacarídeos, proteínas, enzimas e aminoácidos podem ser empregados na síntese verde de MNPs como as AuNPs. Tais compostos possuem grupos passíveis de sofrer oxidação e podem atuar tanto como agentes redutores quanto como agentes estabilizantes. (KHARISSOVA et al., 2013; KUMAR; LATHER; PANDITA, 2015; RAUWEL et al., 2015).

Diversos trabalhos recentes são reportados na literatura os quais empregam rotas verdes para a síntese de AuNPs. Manikandakrishnan e colaboradores (2019) relataram a síntese de AuNPs empregando-se um extrato aquoso de uma alga marinha denominada *Caulerpa racemosa*. A síntese se deu misturando-se o extrato de *Caulerpa racemosa* juntamente com HAuCl_4 1 mol L^{-1} , na relação 1:1 v/v. A mistura permaneceu sob agitação durante 24 horas. O espectro de absorção no UV-VIS das referidas nanopartículas apresentou uma banda de absorção em 528 nm, sugerindo a presença das AuNPs formadas. A análise de DLS evidenciou um diâmetro hidrodinâmico de 425,2 nm e a análise de potencial zeta confirmou a estabilidade das nanopartículas formadas, com um valor de -27,4 mV. Os espectros obtidos pela técnica espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) para o extrato e para as nanopartículas exibiram absorções similares. No entanto, no espectro das AuNPs foi observado uma diminuição nas bandas de absorção referentes aos estiramentos C-O de ácidos carboxílicos e aminas e C=O de amidas, sugerindo que tais grupos estariam envolvidos no processo de redução do ouro para a formação das nanopartículas.

Chellapandian e colaboradores (2019) reportaram a utilização do extrato de uma alga vermelha denominada *Gracilaria verrucosa* na síntese verde de AuNPs. Para a síntese, aqueceu-se uma 50 mL do extrato de *Gracilaria verrucosa* sob 60°C por 20 minutos. Posteriormente, adicionou-se por gotejamento a solução do precursor metálico HAuCl_4 , até atingir a concentração de 0,0199 mol L^{-1} . Tal mistura permaneceu sob agitação vigorosa por mais 20 minutos. Pela técnica de UV-VIS observou-se uma banda de absorção em 520 nm,

demonstrando assim a formação das nanopartículas. A análise de TEM revelou diversas morfologias para as AuNPs (esférica, oval, pentagonal, romboédrica e triangular). O diâmetro das nanopartículas obtidas foi de aproximadamente 20 nm e a análise de potencial zeta revelou o caráter aniônico das nanopartículas formadas, com um valor de -21,3 mV. Os autores concluíram a partir da caracterização das AuNPs obtidas que as biomoléculas presentes no extrato aquoso de *Gracilaria verrucosa*, como proteínas, compostos fenólicos e aromáticos, desempenharam um papel importante na formação e estabilização das AuNPs.

Thangamani e Bhuvaneshwari (2019) relataram o emprego do extrato da folha de *Simarouba glauca*, uma espécie de árvore comum na América do Sul, na síntese verde de AuNPs. A síntese se procedeu adicionando-se diferentes alíquotas do precursor metálico (2,7; 2,4; 2,1; 1,8 mL) HAuCl_4 na concentração de $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ juntamente com alíquotas do extrato de *Simarouba glauca* (0,3; 0,6; 0,9; 1,2 mL). Dentre esses valores, otimizou-se como condição ótima de síntese 0,3 mL do extrato e 2,7 mL de HAuCl_4 , uma vez que apresentou o menor diâmetro de partícula pela análise de TEM, que foi de 10 nm. A análise de FTIR realizada com o extrato utilizado revelou uma banda referente ao estiramento do grupo C=O. Tal grupamento provavelmente é responsável pela redução do precursor metálico, promovendo-se, assim, a síntese das AuNPs. O espectro de UV-VIS revelou uma absorção em 530 nm. A análise de DRX confirmou a estrutura cúbica de face centrada apresentada pelo ouro metálico e a análise de potencial zeta revelou um valor de -29,3 mV.

Com relação as AgNPs, apesar de suas excelentes propriedades, são reportados trabalhos anteriores na literatura os quais mencionam que estas podem apresentar níveis de citotoxicidade e induzir alterações cromossômicas, parada do ciclo celular além de ocasionar um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio. (ASHARANI, et al, 2009; ANTONY; SIVALINGAM; CHEN, 2015). No entanto, o método de síntese, o tamanho, a morfologia, funcionalidade e agentes estabilizadores estão relacionados a esses efeitos. (GIRÓN-VÁZQUEZ, 2019). Dentre os métodos convencionais de síntese de AgNPs pode-se citar os físicos, que envolvem técnicas como evaporação-condensação, ablação a laser, irradiação elétrica, irradiação gama e litografia. Os métodos químicos convencionais envolvem a redução da Ag^+ para Ag^0 na forma nanoparticulada com reagentes redutores tais como citrato de sódio, ascorbato e borohidreto de sódio. (GÜZEL; ERDAL, 2018). Entretanto, tais métodos apresentam desvantagens como alto custo, alta demanda de energia, uso de agentes redutores nocivos à saúde e ao meio ambiente e produção de resíduos tóxicos. (GIRÓN-VÁZQUEZ, 2019). Neste sentido, faz-se necessário explorar opções alternativas para a síntese de AgNPs.

Diversos trabalhos recentes vêm empregando rotas verdes na síntese de AgNPs. É reportado na literatura o uso de microrganismos como fungos (HULIKERE; JOSHI, 2019; NANDA;NAYAK; MOORTHY, 2018) e bactérias (DESAI; PATIL; PAWAR, 2020; DAKHIL, 2017; SHANTHI, et al, 2016) para se promover a síntese de nanopartículas de prata.

Hulikere e colaboradores (2019) reportaram a síntese de AgNPs empregando-se o fungo marinho *Cladosporium cladosporioides*, que foi isolado da alga marrom *Sargassum wightii*. Para se realizar a síntese, adicionou-se 10 mL da cultura do fungo previamente purificado à 90 mL de AgNO_3 1 mmol L⁻¹. A mistura reacional permaneceu sob agitação em temperatura ambiente por determinado período de tempo. A suspensão de AgNPs obtida apresentou uma banda de absorção de UV-VIS em 440 nm, indicando a presença do nanomaterial formado. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo mostraram que as AgNPs sintetizadas apresentaram morfologia esférica e com um tamanho de partícula variando entre 30 e 60 nm. Uma análise de DRX demonstrou a natureza cristalina das AgNPs, exibindo picos referentes a estrutura cúbica de face centrada característica da prata metálica.

Contudo, a utilização de extratos de plantas apresenta vantagens como fácil preparação, uma vez que não requer culturas específicas para o crescimento de microrganismos e processos de purificação trabalhosos, além de ser uma opção mais econômica e de fácil acesso para se promover a síntese verde de AgNPs. (HERNÁNDEZ-MORALES, et al, 2019).

Siddiquee e colaboradores (2019) reportaram a síntese verde de AgNPs empregando-se extratos da folha de *Delonix regia*, conhecida como flamboiã no Brasil. Neste trabalho, o extrato atuou como agente redutor e estabilizante para a síntese de AgNPs. A síntese foi realizada misturando-se alíquotas do extrato de *D.regia* à uma solução de AgNO_3 , de modo que a proporção na síntese fosse de 20:80 V/V. Tal mistura permaneceu sob em agitação constante e em temperatura de 25°C por 10 minutos. O espectro de UV-Vis da suspensão revelou uma única banda em 455 nm e a pela análise de DLS obteve-se um diâmetro hidrodinâmico de 72,77 nm. A análise de DRX confirmou a natura cristalina das nanopartículas sintetizadas, e a partir da análise de FTIR pode-se confirmar os fenóis e as amins presentes no extrato de *D.regia* atuaram na formação das AgNPs.

Ravichandran et al (2019) relataram a síntese verde de AgNPs empregando-se o extrato aquoso da folha de *Parkia speciosa*. Para a síntese, misturou-se 1 mL do extrato obtido com 1 mL solução de AgNO_3 0,01 mol L⁻¹. A suspensão obtida revelou uma banda em 410 nm, o que denota a presença das AgNPs. A análise de DRX confirmou a estrutura cúbica de face centrada da prata metálica. A análise de TEM revelou uma morfologia esférica para as AgNPs sintetizadas e o diâmetro médio foi igual a 35 nm. Neste trabalho, os flavonóides e os compostos

fenólicos presentes na estrutura do extrato das folhas de *P. Speciosa* foram os responsáveis por promover a redução da Ag^+ para a formação de AgNPs.

Hamedí e Shojaosadati (2019) realizaram a síntese de AgNPs empregando-se extratos aquosos da folha da planta *Diospyros lotus*. A síntese foi realizada de maneira similar as demais descritas. O espectro de UV-Vis da suspensão obtida revelou uma banda em 410 nm, referente a formação das AgNPs. A análise de TEM revelou que as AgNPs sintetizadas possuíam um diâmetro médio de 20 nm. Os padrões de DRX comprovaram a natureza cristalina das AgNPs sintetizadas. As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostraram a presença de nanopartículas esféricas sem evidência de agregados.

Pode-se observar nos trabalhos relatados, referentes as sínteses da nanopartículas metálicas, que as análises de UV-VIS apresentaram valores próximos ao valor característico da suspensão de AuNPs de 520 nm e de 410 nm para as AgNPs, confirmando a presença das mesmas, sendo sua morfologia esférica. Além disso, as nanopartículas obtidas apresentaram boa estabilidade, uma vez que os valores de potencial zeta aproximaram-se do valor característico de -30 mV. Assim, as AuNPs e AgNPs obtidas pelas rotas verdes apresentadas apresentam pequena tendência de sofrerem coalescência (ŠEGOTA; HEIMER; TEŽAK, 2006). Os grupamentos passíveis de sofrerem oxidação como O-H, C=O, compostos fenólicos e amidas, presentes nos extratos citados foram responsáveis pela formação das nanopartículas. Portanto, é possível afirmar que além de promoverem a redução íon Au^{3+} para Au^0 e do Ag^+ para Ag^0 na forma de nanopartículas, os extratos empregados nos referidos trabalhos também foram eficientes agentes estabilizantes para as nanopartículas formadas.

1.4 POLISSACARÍDEOS DE GOMAS DE EXSUDATOS

Polissacarídeos são polímeros naturais e consistem em um dos principais constituintes dos seres vivos, exercendo papel essencial na constituição estrutural e na geração de energia. Essas biomoléculas são formadas por longas cadeias poliméricas de mono-, di- ou oligossacarídeos unidos por ligações glicosídicas. Possuem grupos funcionais tais como $-\text{NH}_2$, $-\text{OSO}_3^-$, $-\text{NH}(\text{CO})\text{CH}_3$ e $-\text{COOH}$ covalentemente ligados ao esqueleto carbônico em diferentes posições. Os polissacarídeos podem ser extraídos de plantas (incluindo algas), animais, fungos ou obtidos por fermentação microbiana. Em plantas superiores, estes podem ser obtidos de exsudatos, frutos, tubérculos e sementes. (RAVEENDRAN et al., 2013; CUNHA; PAULA; FEITOSA, 2009).

Um exsudato consiste em um fluido orgânico emitido através das paredes e membranas celulares, tanto de animais quanto de plantas, em resposta a uma inflamação ou lesão. Em plantas, exsudatos são produzidos como mecanismo de defesa contra o estresse causado por injúrias físicas ou ataque de microorganismos, prevenindo uma possível infecção ou desidratação da planta (VERBEKEN; DIERCKX; DEWETTINCK, 2003). Nesse processo, há a secreção de um fluido viscoso, geralmente no tronco da planta. Quando exposta ao ar, esse fluido solidifica-se dando origem a um sólido amorfo e translúcido que é conhecido como goma (CUNHA; PAULA; FEITOSA, 2009; OLORUNSOLA et.al, 2016).

Em geral, gomas de plantas são constituídas majoritariamente de polissacarídeos, apresentando uma massa molecular elevada e variável. Sua estrutura é composta de uma variedade de monossacarídeos, ligações glicosídicas e ramificações. (STEPHEN; PHILILIPS; WILLIAMS, 2006). A intensa aplicação industrial de gomas de exsudatos é em decorrência de sua capacidade de reter água, produzir géis ou soluções de alta viscosidade e de incrementar a estabilidade de emulsões e espumas. Tais propriedades dependem da estrutura química dos polissacarídeos das gomas de exsudatos bem como sua conformação em solução. (TOSIN, et.al, 2014). Dentre as aplicações tecnológicas das gomas, destacam-se a sua utilização como agentes espessantes, gelificantes, emulsificantes, flocculantes, adesivos, inibidores de cristalização, formadores de filmes e protetores coloidais. (SILVA; RODRIGUES; PAULA, 1998).

A estrutura polissacarídica mais abundante encontrada em gomas de exsudatos são as arabinogalactanas, como as da *Acacia senegal* (goma arábica). É composta por uma cadeia principal de β -D-galactopiranosose com ligação 1 $\rightarrow$ 3 e cadeias laterais compostas por duas a cinco unidades de β -D-galactopiranosose ligadas à cadeia principal por ligações 1 $\rightarrow$ 6. Ambas as cadeias contêm unidades de α -L-arabinofuranose, α -L-ramnopiranosose, β -Dglucuronopiranosose, e 4-O-metil- β -D-glucuronopiranosose. Outras gomas de exsudato frequentemente utilizadas comercialmente são a goma ghati (*Anogeissus latifolia*), tragacante (*Astragalus* sp) e caraia (*Sterculia urens*). (CUNHA; PAULA; FEITOSA, 2009).

Outros polissacarídeos como as Glucoronoarabinoxilanas (GAX) também são encontrados em gomas de exsudatos, embora menos frequentemente. Estudos de caracterização de tais gomas revelaram uma composição variada de monossacarídeos, destacando-se a arabinose, xilose, galactose, fucose e ácido urônico. (TOSIN et al., 2013; TOSIN et al., 2014). O abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merrill) é a terceira fruta tropical mais cultivada no Brasil. Dentre as doenças que podem atingir o abacaxi, a gumose, que é causada pela contaminação pelo fungo *Fusarium subglutinans*, caracteriza-se pela exsudação de uma goma a partir da casca da fruta. O polissacarídeo da goma do abacaxi (GA) foi extraído e caracterizado como uma

GAX composto por arabinose, xilose, galactose e ácido glucurônico na razão molar de 40:23:7:30. A cadeia principal é composta por unidades de β -D-xilopirranose com ligações 1 $\rightarrow$ 4 altamente substituídas em O-2 e O-3 por unidades de α -arabinofuranose e ácido α -glucuronopirranose, com unidades terminais não redutoras de α -arabinofuranose, β -arabinopirranose, β -xilopirranose, β -galactopirranose e ácido α -glucurônico pirranose (TOSIN et al., 2013).

1.5 *Garcinia conchichinensis*

O gênero *Garcinia* (Clusiaceae) é composto por cerca de 550 espécies, em sua maioria árvores, distribuídas em áreas tropicais da África, América, Polinésia e Ásia. Algumas espécies são frutíferas, como a *Garcinia mangostana*, *Garcinia buchananii*, *Garcinia atroviridis*, *Garcinia dulcis*, *Garcinia xanthochymus* e *Garcinia cochinchinensis* (FARINAZZI-MACHADO, et al, 2016). Estudos de fitoquímicos tem revelado que as espécies da *Garcinia* são ricas fontes de metabólitos secundários, incluindo flavonoides e biflavonoides e alguns destes compostos apresentam inúmeras atividades biológicas. É reportado na literatura estudos sobre as propriedades antioxidantes (JUNG, et al, 2006; SHARMA; JOSEPH; SINGH, 2014; PANDA; ASHAR; SRINATH, 2012), anti-inflamatórias (SERUJII; KHONG; KUTOI, 2013; SANTA-CECÍLIA, et al, 2011; ZHANG, et al, 2014) e até mesmo anti-câncer (AISHA, et al, 2012; LI, et al, 2013; WANG, et al, 2012) de diversas espécies de *Garcinia*. Usada na medicina tradicional em várias partes do mundo, espécies de *Garcinia* vem sendo estudadas no tratamento e prevenção de patologias neurológicas como o Alzheimer (WANG, et al, 2016; SABOGAL-GUÁQUETA, et al, 2017) e o Parkinson (ANTALA, et al, 2012). Também é relatado na literatura sua utilização no tratamento de doenças auto-imunes como lupus eritematoso (LI, et al, 2015), psoríase (CHEN, et al, 2017) e esclerose múltipla (WANG, et al, 2016).

A *Garcinia cochinchinensis* (Figura 6), conhecida por mangostão amarelo, garcinia e falso mangostão, pertence ao mesmo táxon genérico. É uma fruta nativa do Vietnã e é utilizada pela medicina popular vietnamita. A casca da *Garcinia cochinchinensis* é usada para curar alergia, irritações e doenças de pele. É encontrada no Brasil e comumente é confundida com a *Garcinia mangostana*, em especial na fase jovem do fruto, pela morfologia de suas folhas (SACRAMENTO et al., 2007). A árvore atinge até 20 metros de altura, seus frutos são comestíveis e é uma espécie muito utilizada em parques e jardins públicos.

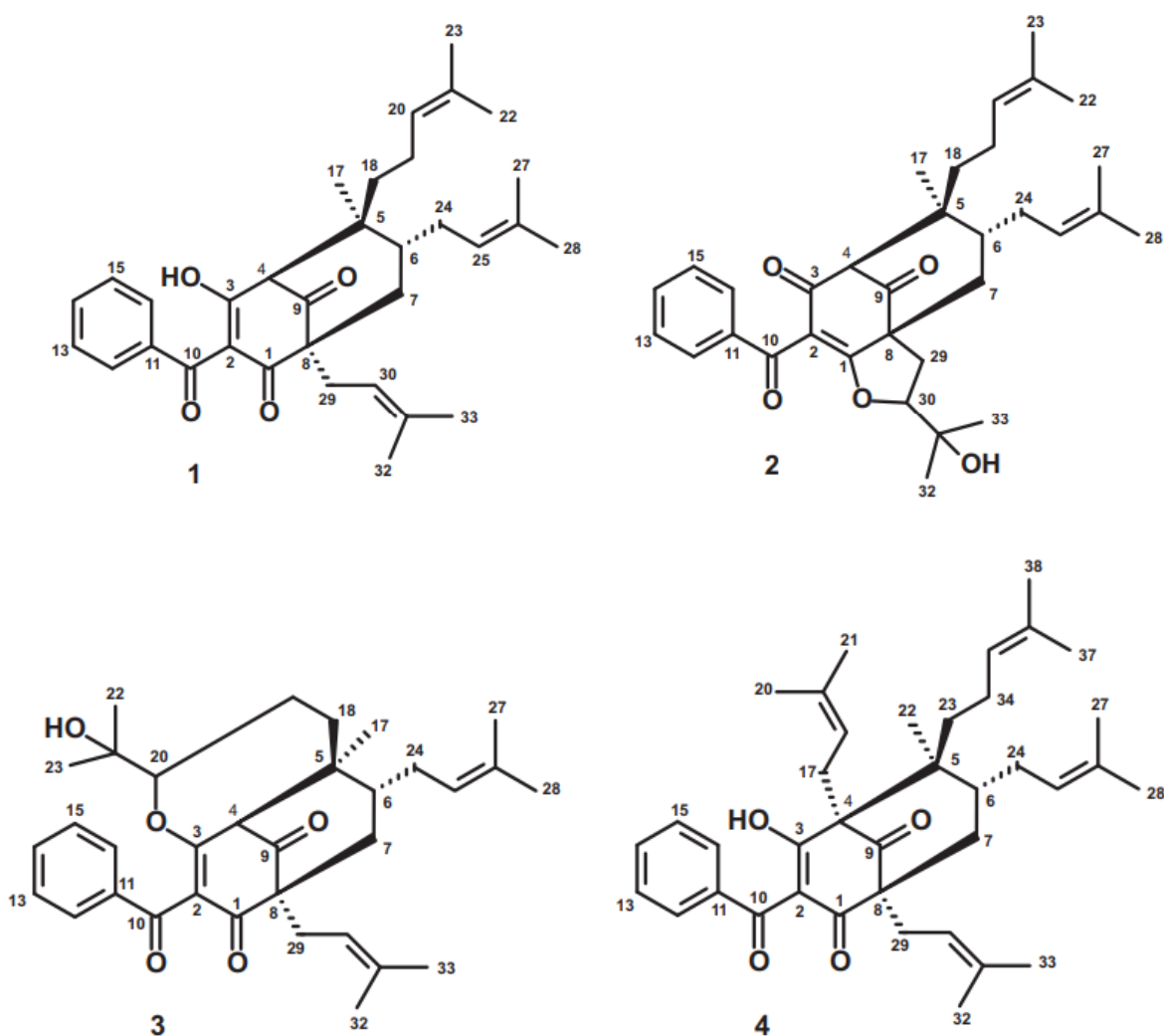
Figura 6 - Frutos, flores e folhas da *Garcinia cochinchinensis*



Fonte: MACHADO, 2016

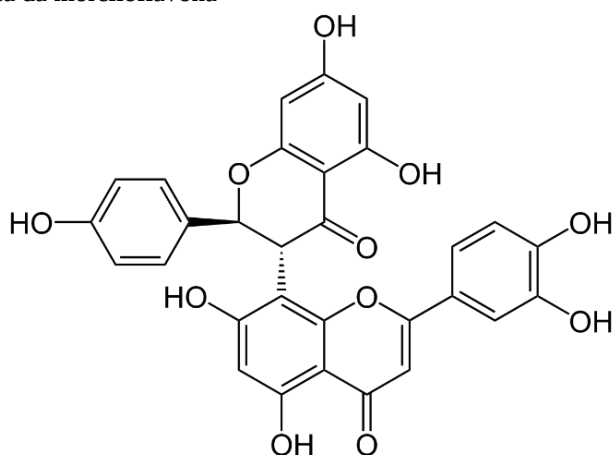
Os principais compostos encontrados nos extratos dos frutos, folhas e sementes dessa espécie são benzofenonas poliisoprenadas e biflavonóides. Estudos de caracterização da flora do estado do Paraná reportam a presença de espécies do gênero *Garcinia*. Contudo, até o presente momento, são escassos os relatos a respeito do estudo fitoquímico de *G. cochinchinensis*. Nguyen e colaboradores (2011) isolaram e elucidaram benzofenonas poliisopreniladas (Figura 7) do pericarpo do fruto da *Garcinia conchinchinesis*. Um estudo fitoquímico da casca das sementes dessa espécie foi realizado, das quais foram isoladas a morelloflavona (Figura 8) e a garcianina (Figura 9), dois biflavonóides. (SCHAFFKA, et al, 2019).

Figura 7 – Estrutura química de benzofenonas poliisopreniladas isoladas do pericarpo do fruto da *Garcinia conchinchinesis*.



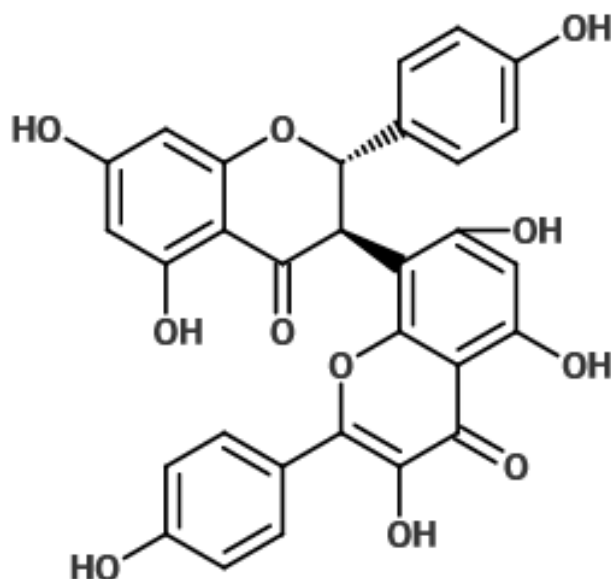
Fonte: Nguyen, et al, 2011

Figura 8 – Estrutura química da morelloflavona



Fonte: Adaptado de SCHAFFKA et al, 2019

Figura 9 – Estrutura química da garcianina



Fonte: Adaptado de CANUTO, 2007

1.6 ELETRODOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS COM NANOPARTÍCULAS DE OURO E DE PRATA SINTETIZADAS POR ROTAS VERDES

Já é reportado na literatura alguns trabalhos utilizando-se da síntese verde de nanopartículas de ouro na fabricação de eletrodos modificados para diversas aplicações. Dentre esses estudos, pode-se citar o trabalho de Taib e colaboradores (2019) onde é proposta uma rota de síntese verde de AuNPs empregando-se um extrato aquoso das folhas de *Hibiscus sabdariffa*, que atuou simultaneamente como agente redutor e estabilizante para a síntese. As nanopartículas obtidas foram utilizadas para modificação de um eletrodo de carbono vítreo (ECV), gotejando-se uma alíquota da suspensão de AuNPs na superfície do mesmo e posteriormente realizou-se a secagem em estufa por 6 horas. O eletrodo desenvolvido foi utilizado no estudo do processo de eletrooxidação de nitrito, um contaminante que está relacionado com o desenvolvimento de câncer. O ECV não apresentou nenhuma resposta eletroquímica frente ao analito estudado, apenas corrente capacitiva e ao adicionar a suspensão de AuNPs obtida, pode-se observar o pico de oxidação do nitrito em 0,8 mV. A elevada área superficial das AuNPs conferiu ao eletrodo modificado uma maior sensibilidade frente ao analito em estudo no referido trabalho. O ECV modificado (ECVM) com as AuNPs exibiu

sensibilidade frente ao processo de eletrooxidação do nitrito, obtendo-se um limite de detecção de $0,11 \text{ nmol L}^{-1}$. Foi observado que o eletrodo desenvolvido apresentou uma estabilidade em 21 dias de estudo, perdendo 20% de sua resposta inicial de corrente. O estudo de reprodutibilidade de confecção do eletrodo apresentou um valor de desvio padrão relativo aceitável menor que 5% (4,27%).

Lima e colaboradores (2018) relataram a utilização da porfirana, um polissacarídeo sulfatado extraído de algas vermelhas como agente redutor e estabilizante na síntese de AuNPs. A suspensão de AuNPs (que apresentou um diâmetro de 16 nm) foi utilizada na modificação de um eletrodo de pasta de carbono (EPC) para a posterior detecção do agente anti-tumoral 5-flurouracil (5-FU). Estudos de voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) mostraram que o nanocompósito melhorou o desempenho eletroquímico dos eletrodos, sendo observado um aumento de corrente e uma diminuição na resistência de transferência de carga. Tal melhora foi atribuída a alta condutividade e grande área superficial apresentada pelas AuNPs. O EPCM com as AuNPs obtidas pela rota verde proposta eletrocatalisou o processo de eletrooxidação do 5-FU, sendo observado uma diminuição de 30 mV no valor de potencial de pico de oxidação (E_{pa}) para o eletrodo modificado com as AuNPs em comparação ao eletrodo sem modificação. Por voltametria de pulso diferencial (VPD), uma relação linear entre as correntes de pico (I_{pa}) e a concentração de 5-FU foi verificada, na faixa de concentração de 29,9 a $234 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Os valores de limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram de 0,66 e $2,22 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. O bom desempenho analítico do eletrodo modificado foi confirmado para determinação 5-FU em uma formulação farmacêutica comercial. O eletrodo desenvolvido apresentou percentagens de recuperações variando de 96,6 a 101,4%, bem como um desvio padrão relativo aceitável ($RSD = 2,80\%$).

Emmanuel e colaboradores (2014) reportaram a síntese verde de AuNPs empregando-se extratos do galho da *Acacia nilotica* e a posterior aplicação da suspensão obtida como modificador em eletrodos de carbono vítreo (ECV) para a determinação do poluente nitrobenzeno (NB). A modificação do ECV se deu gotejando-se uma alíquota de volume conhecido das AuNPs obtidas pela síntese verde na superfície do eletrodo previamente limpa, deixando-se secar em temperatura ambiente. Uma comparação por VPD entre o ECV e o ECVm com as AuNPs na presença do analito NB revelou uma maior resposta de corrente para o eletrodo modificado com as nanopartículas obtidas, bem como um deslocamento de potencial de oxidação para regiões mais negativas. Os resultados indicaram que o ECVm com as AuNPs é mais adequado para a determinação do NB comparado ao ECV pois as nanopartículas conferiram uma maior sensibilidade ao ECV, além de promover a eletrocatalise do processo de

oxidação do analito. Uma relação linear entre as correntes de pico do VPD e a concentração de NB foi verificada, na faixa de concentração de 0,1 a 600 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A partir das curvas analíticas obtidas, calculou-se um limite de detecção o qual foi de 0,016 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A estabilidade do eletrodo foi avaliada em 8 dias e 92, 3% da resposta inicial de corrente foi mantida. A reprodutibilidade de confecção do eletrodo e a repetibilidade de medida apresentaram valores de DPR aceitáveis de 2,1% e 2,7%, respectivamente.

Karuppiah e colaboradores (2015) relataram a síntese verde de AuNPs empregando-se extratos da folha de *Justicia glauca*. Posteriormente, realizou-se a modificação de um ECV com a suspensão de AuNPs obtida e aplicou-se na determinação de íons Pb^{2+} . Para a modificação do ECV, gotejou-se uma alíquota conhecida de AuNPs sobre a superfície do ECV previamente limpa, deixando-se secar em temperatura ambiente. Uma comparação por VPD entre o ECV e o ECVM com as nanopartículas obtidas na presença de íons Pb^{2+} revelou que, para o eletrodo sem modificação, nenhum processo eletroquímico foi observado. Entretanto, o ECVM com as AuNPs apresentou um pico de anódico referente a eletrooxidação do analito pode ser observado, indicando ser um eletrodo adequado para a determinação do referido analito. Uma relação linear entre as correntes de pico do DPV e a concentração de Pb^{2+} foi verificada, na faixa de concentração de 0,005 à 800 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A partir das curvas analíticas, obteve-se um LD de 0,07 nmol L^{-1} . Bons níveis de reprodutibilidade e repetibilidade de resposta foram obtidos, com valores de RSD de 2,9 e 3,6 %, respectivamente.

Também é reportado na literatura trabalhos utilizando-se da síntese verde de AgNPs na fabricação de eletrodos modificados para diversas aplicações. Dentre esses estudos, pode-se citar o trabalho de Shivakumar e colaboradores (2017). Neste estudo, empregou-se descarte industrial da madeira *Nilgiri*, denominado como licor, para se promover a síntese de AgNPs. Os ECVs foram modificados com as AgNPs sintetizadas a partir do gotejamento de uma solução contendo 10 mL da suspensão das mesmas, 20 mL de Nafion e 980 mL de água destilada sobre este eletrodo. Uma comparação entre o ECV e o ECVM com as AgNPs na presença do nitrito revelou que, para o ECVM, o potencial de oxidação eletroquímico do nitrito foi menor em comparação ao eletrodo sem modificação, evidenciando deste modo as propriedades catalíticas das AgNPs. Além disso, uma maior resposta de corrente para a eletrooxidação do nitrito foi observada para o e ECVM. Isso se deve às propriedades condutoras bem como a elevada área superficial apresentada pelas AgNPs. Curvas analíticas foram obtidas por amperometria, na faixa de concentração 0,1 - 8,0 mmol L^{-1} e, a partir delas, obteve-se um LD de 0,031 mmol L^{-1} .

Khalilzadeh e Borzoo (2016) relataram a síntese verde de AgNPs empregando-se extrato aquoso de cebola. Após isso, EPCs foram modificados com a suspensão de AgNPs obtida, misturando-se a mesma com uma massa conhecida de grafite em pó. Posteriormente, adicionou-se parafina que atuou como um agente aglutinante. O EPC/AgNPs foi empregado na determinação do ácido ascórbico. Uma comparação por VOQ entre um EPC sem modificação e o EPC/AgNPs em presença de uma solução de ácido ascórbico revelou que o EPC/AgNPs possui uma maior sensibilidade frente ao analito estudado, uma vez que apresentou maiores respostas de corrente em comparação ao eletrodo sem modificação. Curvas analíticas foram obtidas para o EPC/AgNPs frente ao ácido ascórbico numa faixa de concentração de 0,4 – 450,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, obtendo-se um limite de detecção de 0,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

A partir dos trabalhos acima citados, pode-se notar que ambos apresentam sínteses verdes que promovem de maneira eficiente a formação das AuNPs e AgNPs. Tais nanopartículas sintetizadas melhoraram o desempenho eletroquímico dos eletrodos não modificados utilizados. Isso se deve às propriedades apresentadas pelos nanomateriais como elevada condutividade, alta área superficial e eletrocatalização. Ressalta-se ainda a praticidade das sínteses apresentadas, uma vez que os extratos naturais atuaram simultaneamente como agentes redutores e oxidantes, bem como a fácil preparação dos eletrodos acima mencionados. Além disso, ambos os eletrodos foram capazes de detectar os analitos mencionados em baixas concentrações.

1.7 ANALITOS EMPREGADOS NESTE TRABALHO

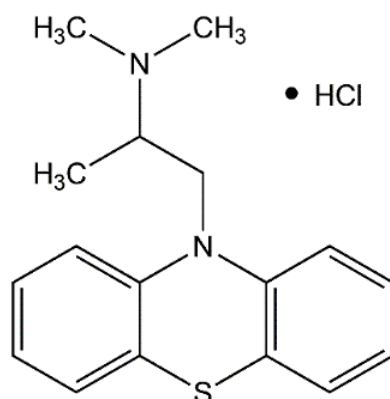
1.7.1 Cloridrato de Prometazina

Uma reação de hipersensibilidade, comumente denominada de reação alérgica, caracteriza-se por uma resposta imunológica exagerada a um determinado antígeno (alérgeno) e se apresenta em duas fases. A primeira fase, conhecida como fase imediata, ocorre minutos após o contato com o alérgeno e caracteriza-se pela liberação de mediadores, em especial a histamina. A histamina é sintetizada e liberada por diferentes células humanas, especialmente basófilos, mastócitos, plaquetas, neurônios histaminérgicos, linfócitos e células enterocromafínicas, sendo estocada em vesículas ou grânulos liberados sob estimulação (CRIADO et al., 2010). Vários mediadores estão envolvidos na fisiopatologia das doenças alérgicas, entretanto, a histamina continua sendo o principal deles, exercendo papel fundamental na gênese dessas doenças, particularmente da rinite e da urticária. A segunda fase

é denominada fase tardia ou inflamatória onde há a liberação de citocinas e interleucinas. (NUNES; LADEIRA,2005; IBIAPINA et al.,2008; DÁVILA et al., 2011; NUNES, 2006). Os efeitos da histamina são mediados pela sua ligação com quatro subtipos de receptores: receptor de histamina (H_1 , H_2 , H_3 e H_4). A histamina exerce seus efeitos nas doenças alérgicas interagindo principalmente com os receptores H_1 presentes nos diferentes órgãos. No nariz, a histamina estimula as terminações nervosas sensoriais (prurido e espirros), aumenta a permeabilidade vascular (edema e obstrução) e as secreções glandulares (coriza). Na pele, provoca vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (eritema e edema) e estimula as terminações nervosas sensoriais (prurido). Nos pulmões, atua, principalmente, na musculatura lisa brônquica (broncoconstrição). Os anti-histamínicos são denominados de acordo com o receptor para histamina com o qual interagem. Aqueles que atuam preferencialmente em receptores H_1 , H_2 , H_3 e H_4 são denominados, respectivamente, anti- H_1 , anti- H_2 , anti- H_3 e anti- H_4 . Os anti- H_1 são os mais utilizados no tratamento das doenças alérgicas. (CRIADO et al., 2010; NUNES, 2006).

O Cloridrato de Prometazina (cloridrato de N,N-dimetil-1-fenotiazina-10-il-propan-2-amina) (PMZ) pertence a primeira geração de anti-histamínico H_1 e é um derivado fenotiazínico de cadeia lateral alifática, que possui atividade anti-histamínica, sedativa, antiemética e efeito anticolinérgico (Figura 10). É indicada para situações de rinite sazonal, reações de hipersensibilidade a medicamentos, prevenção de urticárias, tratamento de picadas de insetos, reações alérgicas oculares (como por exemplo conjuntivite alérgica e nasais). Uma vez que possuiu efeito sedativo, pode ser utilizada no controle de náuseas, vômitos e enxaqueca além de prolongar o sono induzido por barbitúricos, sendo seu emprego terapeuticamente útil em anestesia clínica. (KAMEI et al., 2005; MENEGATTI et al., 2004).

Figura 10 – Estrutura do anti-histamínico Cloridrato de Prometazina



Fonte: A autora.

Apesar de seus efeitos benéficos, como um receptor anti-histamínico H_1 , a prometazina pode causar efeitos adversos a saúde humana. Os receptores H_1 encontram-se distribuídos no sistema nervoso central e os anti- H_1 podem ocasionar efeitos tais como: sedação, variando de sonolência leve a sono profundo; depressão, identificada por sintomas do tipo distúrbio de coordenação, tontura, lassidão e falta de concentração. Os anti- H_1 de primeira geração, como no caso da PMZ, são bastante lipossolúveis, têm baixo peso molecular e alta afinidade pelos receptores H_1 cerebrais, o que faz com que os efeitos anteriormente citados ocorram com frequência, mesmo em doses terapêuticas. Além disso, pode apresentar efeitos farmacológicos não relacionados à ligação ao receptor H_1 , podendo também ligar-se a receptores muscarínicos, ocasionando boca seca, taquicardia e retenção urinária. (NUNES, 2006). Devido à sua ampla utilização e a seus possíveis efeitos adversos, a determinação da PMZ em formulações comerciais é de grande importância. Inúmeras técnicas já foram anteriormente empregadas na determinação da PMZ em compostos farmacêuticos, tais como cromatografia líquida de alta eficiência (WOJCIAK-KOSIOR; SKALSKA; MATYSIK, 2006; GILPIN; GILPIN, 2007), eletroforese capilar (LARA, et al., 2005) e espectrofotometria aliada a injeção de fluxo. (DANIEL; GUTZ, 2003; FENG et al., 2007; RAMA et al., 2004). Apesar de tais métodos apresentarem uma boa sensibilidade, são em sua maioria métodos caros, em muitos casos é necessário um pré-tratamento da amostra antes da análise, bem como a utilização de solventes tóxicos. Nesse sentido, as técnicas eletroanalíticas revelam-se uma excelente alternativa a tais métodos, uma vez que apresenta um menor custo, um menor tempo de análise e possibilita a medição diretamente na amostra, sem a necessidade de um tratamento prévio. (GALLI, et.al., 2006; JESUS et al, 2011; RIBEIRO, et al, 2008).

1.6.2 5-Fluorouracil

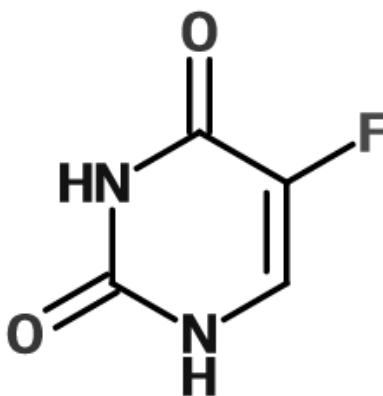
O câncer caracteriza-se na rápida multiplicação e disseminação de células anormais que crescem em ritmo superior ao natural e de modo desordenado, podendo invadir outros órgãos e regiões do corpo. (INCA, 2015). Consequentemente, as células cancerosas vão substituindo as saudáveis e os tecidos invadidos vão perdendo suas funções. (ALMEIDA et al., 2005).

A quimioterapia é o principal tratamento realizado contra o câncer. O objetivo de uma quimioterapia é a destruição das células doentes. Todavia, a maior parte dos agentes quimioterápicos utilizados atualmente atua de modo não específico, comprometendo assim as células saudáveis. Assim, células saudáveis, em especial as de rápido crescimento, como as

gastrointestinais, capilares e as do sistema imunológico, são afetadas pela quimioterapia. Esta é a razão pela qual frequentemente observam-se efeitos colaterais deste tipo de tratamento, como náuseas, perda de cabelo e maior vulnerabilidade a infecções. (ALMEIDA et al., 2005). Em geral, 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 5-fluorouracil (Figura 11) é um agente quimioterápico amplamente utilizado no tratamento de tumores do colo do útero, cólon, mama, estômago e pâncreas. (HEIDELBERGER; ANSFIELD, 1963; HUA et al., 2013). O mecanismo de ação deste medicamento baseia-se na incorporação direta aos ácidos nucleicos quanto por meio da inibição de sua biossíntese das células cancerosas. (LONGLEY; HARKIN; JOHNSTON, 2003). No entanto, o 5-FU tem algumas limitações na aplicação clínica devido à sua não especificidade, resultando em possíveis efeitos colaterais graves. O monitoramento da concentração de 5-FU livre circulante na corrente sanguínea é uma estratégia clínica para se avaliar as variações individuais no metabolismo e na resposta ao tratamento. (CATALDI et al., 1988; PRASAD et al., 2012).

Figura 11 – Estrutura química do agente quimioterápico 5-FU



Fonte: A autora.

Nesse contexto, o desenvolvimento de métodos analíticos sensíveis e seletivos para concentrações de 5-FU em produtos farmacêuticos e amostras biológicas é extremamente importante. Várias técnicas analíticas foram propostas para a detecção de 5-FU, como HPLC (SANSON, et al, 2011), eletroforese capilar (LIU, et al, 2018; SANCHEZ; VALENZUELA;

RODRIGUEZ-CACERES, 2015), cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LI, et al, 2018), cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (YU, et al, 2012) e espectroscopia de fluorescência. (KHOT, et al, 2010). 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. Assim, 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). Dentro deste contexto, as técnicas eletroquímicas são alternativas às técnicas mencionadas para a detecção de 5-FU. Os métodos eletroanalíticos apresentam vantagens tais como baixo custo, boa sensibilidade e seletividade, possibilidade de miniaturização e de análises diretamente na amostra (LIMA, et al, 2018)

Já é relatado na literatura estudos que empregam técnicas eletroanalíticas na determinação do 5-FU. Como exemplo pode-se citar o trabalho de Zahed e colaboradores (2018). Neste estudo, modificou-se um eletrodo de grafite com um nanocompósito de AgNPs com polianilina e nanotubos de carbono (AgNPs@PANINTs). O eletrodo foi posteriormente utilizado na determinação do 5-FU. Estudos de caracterização do eletrodo modificado por VC e VPD mostraram uma maior sensibilidade ao 5-FU para o AgNPs@PANINTs em comparação aos eletrodos sem modificação. Um estudo de pH empregando-se o AgNPs@PANINTs revelou que o pH 8 foi o ideal para a determinação do 5-FU, apresentando uma maior resposta de corrente. Curvas analíticas foram construídas na faixa de concentração de $1.0 \mu\text{mol L}^{-1}$ à $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ e o limite de detecção calculado foi de $0,06 \mu\text{mol L}^{-1}$. Estudos de detecção do 5-FU com o AgNPs@PANINTs em amostras de sangue apresentaram percentagens de recuperação de 95,08 a 101,8%.

Bukkitgar e Shetti (2016) descreveram a obtenção de um eletrodo de um EPC modificado por deposição eletroquímica de azul de metileno para a determinação do 5-FU. Uma comparação por VC entre o EPC e o EPCM com azul de metileno na presença de 5-FU mostrou um ganho de corrente bem como uma diminuição de potencial de oxidação do analito para o EPCM, demonstrando assim que a modificação do EPC com o azul de metileno foi vantajosa na determinação do 5-FU. Curvas analíticas foram obtidas por VPD na faixa de concentração de 4×10^{-5} à $1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ com um LD de $2,04 \text{ nmol L}^{-1}$ e um LQ de $6,18 \text{ nmol L}^{-1}$. Além disso, o eletrodo desenvolvido demonstrou boa reprodutibilidade para a determinação do 5-FU, com um valor de DPR de 1,4%.

Rahimi-Nasrabadi e colaboradores (2020) obtiveram um EPCM incorporando-se um compósito de tungstato de praseodímio e érbio (Pr:Er). Realizou-se uma comparação por VC

na presença de 5-FU de um EPC sem modificação e EPCMs com diferentes quantidades do compósito de tungstato de praseodímio e érbio incorporados na pasta. Pode-se verificar que o EPC sem modificação apresentou a menor resposta de corrente em comparação aos modificados. O EPC modificado com uma proporção de 5% do compósito de tungstato de praseodímio e érbio na pasta apresentou a maior resposta de corrente, portanto, essa proporção foi escolhida nos estudos subsequentes. Estudos de reprodutibilidade e repetibilidade apresentaram valores de DPR de 3,6% e 1,02%, respectivamente. Curvas analíticas foram obtidas na faixa de concentração de 0,01 a 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e a partir dessas curvas, com um LD de 0,98 nmol L^{-1} . Análises em formulação farmacêutica comercial empregando-se o eletrodo desenvolvido revelaram porcentagens de recuperação de 96,4 a 104,4%.

Neste sentido, o presente trabalho propõe o desenvolvimento de dois dispositivos eletroquímicos simples e eficientes obtidos com a modificação de AuNPs e AgNPs sintetizadas por rotas verdes para a determinação do Cloridrato de Prometazina e do 5-Fluorouracil, respectivamente. Tais dispositivos baseiam-se na modificação de eletrodos de pasta de carbono modificados com AuNPs estabilizadas na GA ou AgNPs estabilizadas na GAR. Ressalta-se que a utilização da goma do abacaxi e da *Garcinia cochinchinesis* na síntese de nanopartículas metálicas é inédita, não sendo reportado nenhum trabalho anterior na literatura.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo geral sintetizar e caracterizar nanopartículas de ouro e de prata estabilizadas na goma do abacaxi (GA) e no extrato de *Garcinia cochinchinesis* (GAR), respectivamente (AuNPs-GA e AgNPs-GAR). As AuNPs-GA serão empregadas na modificação de eletrodos de pasta de carbono vítreo (EPCV/AuNPs-GA) para a determinação eletroquímica do Cloridrato de Prometazina e a hemocompatibilidade deste nanomaterial será avaliada por meio de testes com sangue. As AgNPs-GAR serão empregadas na modificação de eletrodos de pasta de carbono (EPC/AgNPs-GAR) para a determinação eletroquímica do 5-Fluorouracil.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar as suspensões de AuNPs-GA e AgNPs-GAR e caracterizá-las utilizando as técnicas de espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-VIS), espectroscopia da região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), difração de raios X (DRX), espalhamento dinâmico da luz (DLS); determinação do potencial zeta (Potencial- ζ) e por meio de microscopia eletrônica de transmissão (TEM);
- Preparar eletrodos de pasta de carbono vítreo modificados com AuNPs-GA (EPCV/AuNPs-GA), bem como eletrodos não modificados (EPCV) e eletrodos modificados apenas com a GA (EPCV/GA), e caracterizar os mesmos por técnicas eletroquímicas (voltametria cíclica e espectroscopia de impedância química);
- Avaliar a hemocompatibilidade das AuNPs-GA através de testes em leucócitos e eritrócitos humanos;
- Modificar eletrodos de pasta de carbono com AgNPs-GAR (EPC/AgNPs-GAR) e comparar a resposta dos mesmos com eletrodos não modificados (EPC) e eletrodos modificados apenas com a GAR (EPC/GAR). Caracterizar estes eletrodos por técnicas eletroquímicas;
- Determinar as melhores condições de resposta do EPCV/AuNPs-GA e do EPC/AgNPs-GAR como pH, tipo de eletrólito suporte, além dos parâmetros da voltametria de onda quadrada (incremento ΔE , frequência f e amplitude a) por planejamento fatorial Box-

Behnken para a determinação de PMZ e do 5-FU em formulação farmacêutica comercial.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

A goma do abacaxi (GA) foi cedida pela Prof^a. Dr^a. Fernanda Simas, do Departamento de Biologia Celular (Biocel) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), extraída e caracterizada de acordo com procedimento descrito na literatura. (TOSIN et al., 2013). O extrato alcóolico de *Garcinia cochinchinesis* (GAR) foi cedido pela Prof^a. Dr^a. Cássia Magalhães, do Departamento de Química da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Todas as soluções foram preparadas com água destilada. O carbono vítreo em pó, a PMZ, os sais $K_4Fe(CN)_6$ e $K_3Fe(CN)_6$, o ácido tetracloroáurico trihidratado ($HAuCl_4.3H_2O$) e o nitrato de prata ($AgNO_3$) foram adquiridos da Sigma-Aldrich[®]. O grafite em pó foi adquirido da Fluka[®]. Todos os demais reagentes empregados na preparação de soluções e dos eletrodos foram de grau analítico, e utilizados sem purificação prévia. Para a preparação do tampão Britton-Robinson (BR) $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ foram empregados os ácidos acético (CH_3COOH), fosfórico (H_3PO_4) e bórico (H_3BO_3). As soluções estoque de PMZ e 5-FU foram preparadas imediatamente antes do uso, dissolvendo-se a quantidade apropriada do fármaco em água destilada, para obtenção de uma concentração igual a $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

3.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.2.1 Síntese das Nanopartículas de Ouro Estabilizadas na GA (AuNPs-GA) e de Prata Estabilizadas na GAR (AgNPs-GAR)

Para a obtenção das nanopartículas de ouro estabilizadas na GA (AuNPs-GA), adicionou-se uma alíquota da solução estoque de GA (10 mg mL^{-1}) sobre um volume apropriado de $HAuCl_4.3H_2O$ e H_2O destilada, de modo que as concentrações finais na mistura reacional fossem de 3 mg mL^{-1} de GA e $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ for $HAuCl_4.3H_2O$. Em seguida, adicionou-se gotas de uma solução de NaOH $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ até atingir o pH 11,0. A reação foi mantida sob agitação magnética e em aquecimento em banho-maria (70°C) durante 25 minutos e observou-se a mudança de coloração do meio reacional de amarelo para vermelho escuro. Após isso, a suspensão resultante foi resfriada até temperatura ambiente.

Para a síntese das AgNPs-GAR, adicionou-se uma alíquota da solução estoque de GAR (2 mg mL^{-1}) sobre um volume apropriado de $AgNO_3$ (10 mmol L^{-1}) e H_2O destilada, de modo

que as concentrações finais na mistura reacional fossem de $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ de GAR e $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ para o AgNO_3 . Posteriormente, adicionou-se gotas de $\text{NaOH } 2 \text{ mol L}^{-1}$ até o pH 11,0. A reação foi mantida sob agitação magnética e em banho de gelo durante 10 minutos e observou-se a mudança de coloração do meio reacional de incolor para amarelo.

As AuNPs-GA e AgNPs-GAR formadas foram devidamente acondicionadas em recipientes apropriados, com a posterior realização das análises de DLS e de potencial Zeta (equipamento Malvern, modelo NanoZ590). Quando não utilizadas, as suspensões foram mantidas refrigeradas.

3.2.3 Caracterização das Nanopartículas Metálicas

Seguiu-se os mesmos procedimentos para a caracterização de ambas as nanopartículas sintetizadas. As suspensões obtidas das nanopartículas metálicas, AuNPs-GA e AgNPs-GAR, foram inicialmente caracterizadas por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (equipamento Varian, modelo Cary 50). 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-GA e das AgNPs-GAR depositado sobre substrato de silício previamente limpo. O filme foi obtido pelo gotejamento de uma alíquota da suspensão sobre o substrato, seguido pela secagem do mesmo. Para fins de comparação, espectros de FTIR para um filme *cast* de uma solução de GA 10 mg mL^{-1} e de GAR 2 mg mL^{-1} foram também obtidos. Em ambos os casos, os espectros foram registrados na faixa de 4000 a 500 cm^{-1} .

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-GA 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} .

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) para as AuNPs-GA foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da Universidade Federal do Paraná em microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM 1200EX-II. Para as AgNPs-GAR, essas análises foram realizadas no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) em microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM-1400 Plus operando a 120 kV . As amostras foram preparadas pelo gotejamento de $10 \text{ }\mu\text{L}$ da suspensão de AuNPs-GA e das AgNPs-GAR sobre *grids* de carbono recobertos com cobre, seguido da secagem em

temperatura ambiente. Para a construção do histograma de distribuição de tamanho, contou-se aleatoriamente 450 partículas e anotou-se seus respectivos tamanhos, utilizando-se o programa *Image J* a partir das imagens geradas pelo TEM. A partir destes dados construiu-se o gráfico de numero de ocorrências em função do diâmetro.

3.2.4 Preparação dos Eletrodos Modificados e Não Modificados

A pasta de carbono vítreo (EPCV) e de grafite (EPC) não modificadas foram preparadas por meio da mistura e homogeneização de 50 mg de carbono vítreo ou grafite em pó com um volume fixo de 10 μL de óleo mineral (Nujol[®]). A pasta foi então devidamente introduzida e compactada na extremidade do corpo do eletrodo, resultando no EPCV ou EPC não modificado.

A confecção dos eletrodos modificados (EPCV/AuNPs-GA, EPCV/GA, EPC/AgNPs-GAR e EPC/GAR) deu-se de maneira semelhante à dos não modificados. Ao carbono vítreo em pó foram acrescentadas diferentes alíquotas de AuNPs-GA (125, 250, 500 e 1000 μL), no caso do EPCV/AuNPs-GA e 75 μL da solução da GA (de concentração 10 mg mL^{-1}) no caso do EPCV/GA. Para o EPC/AgNPs-GAR, ao grafite, foram adicionadas diferentes alíquotas de AgNPs-GAR (250, 500, 750 e 1000 μL) e no caso do EPC/GAR 25 μL da solução da GAR (de concentração 2 mg mL^{-1}).

Após homogeneização e secagem de tais misturas sob fluxo de ar, acrescentou-se para cada caso 10 μL 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 dos eletrodos não modificados. 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 secos e à temperatura ambiente.

3.2.5 Caracterização Eletroquímica dos Eletrodos

As medidas eletroquímicas com os eletrodos modificados (EPCV/AuNPs-GA, EPCV/GA, EPC/AgNPs-GAR e EPC/GAR), ou sem modificação (EPCV e EPC), foram realizadas à temperatura ambiente em uma célula convencional de 10 mL, à qual foram conectados três eletrodos, sendo empregados os eletrodos modificados e não modificados como eletrodos de trabalho, um eletrodo de Ag/AgCl como eletrodo de referência e um fio de platina como contra-eletrodo. Os 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 $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $0,010 \text{ mol L}^{-1}$ (sonda eletroquímica), preparada em tampão fosfato-salino (PBS) $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ pH 6,5. As medidas de VC foram realizadas na faixa de $-0,7 \text{ V}$ a $+0,9 \text{ V}$, com uma velocidade de varredura de potencial (v) 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 de 10 kHz a 100 mHz . Todas as medidas foram conduzidas em um potenciostato/galvanostato Autolab (modelo PGSTAT 100), controlado pelo software NOVA 2.1.3.

3.2.6 Determinação Voltamétrica do Cloridrato de Prometazina

O comportamento voltamétrico da PMZ foi verificado por VC empregando-se o EPCV/AuNPs-GA, o EPCV/GA e o EPCV não modificado. Para estes estudos, empregou-se uma concentração de PMZ igual a $1,96 \mu\text{mol L}^{-1}$, sendo as medidas realizadas em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Em condições apropriadas e empregando o EPCV/AuNPs-GA, 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 da PMZ sobre o eletrodo modificado.

Para avaliação do efeito da variação do pH do eletrólito de suporte sobre a resposta voltamétrica do EPCV/AuNPs-GA na presença do analito foi empregada a técnica de voltametria de onda quadrada (VOQ). As medidas foram realizadas em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, em diferentes valores de pH ($3,0$ a $7,0$), e na presença de uma concentração fixa de PMZ igual a $4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Uma vez estabelecido o pH ótimo para a determinação da PMZ, avaliou-se a influência do eletrólito de suporte sobre a resposta do EPCV/AuNPs-GA na presença do analito na concentração de $4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Tais medidas foram realizadas utilizando-se VOQ. As seguintes soluções-tampão foram testadas (no pH escolhido): 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 citrato (ácido cítrico e citrato de sódio) e tampão acetato (CH_3COOH e CH_3COONa).

3.2.7 Otimização dos Parâmetros da Voltametria de Onda Quadrada (VOQ) Empregando-se o EPCV/AuNPs-GA para a Determinação do PMZ

A fim de que uma maior sensibilidade de corrente fosse alcançada para a detecção da PMZ com o EPCV/AuNPs-GA, os parâmetros da VOQ (incremento ΔE , frequência f e amplitude a) foram otimizados. As medidas foram realizadas em meio de tampão McIlvaine pH = 5,0, na presença de $4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ da PMZ. A otimização foi conduzida de maneira multivariada por meio de um planejamento fatorial Box Behnken, de acordo com a Tabela 1. Os parâmetros da VOQ otimizados foram então aplicados na obtenção das curvas analíticas para a PMZ. Os valores dos fatores escolhidos foram baseados em experimentos previamente realizados.

Tabela 1 - Níveis e fatores estudados no Planejamento Box Behnken para a otimização dos parâmetros da VOQ para o EPCV/AuNPs-GA na determinação da PMZ

Fatores	- 1	0	+ 1
$\Delta E \text{ (mV)}$	6	8	10
$a \text{ (mV)}$	80	90	100
$f \text{ (Hz)}$	80	100	120

3.2.8 Obtenção de Curvas Analíticas com o EPCV/AuNPs-GA na Presença da PMZ

As curvas analíticas foram obtidas por VOQ, na faixa linear de concentrações de 3,98 a $15,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ de PMZ, e empregando-se o EPCV/AuNPs-GA 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-GA para a determinação da PMZ foi avaliado por meio de ensaios de recuperação em eletrólito suporte puro. Uma quantidade conhecida do fármaco foi adicionada ao eletrólito, e sua determinação foi feita em seguida empregando-se a equação da reta obtida na curva analítica determinada anteriormente.

3.2.9 Determinação da PMZ em Formulações Farmacêuticas Comerciais

A potencialidade de aplicação do EPCV/AuNPs-GA para a determinação da PMZ em amostras de formulação farmacêutica foi estudada por meio da realização de ensaios de recuperação empregando quatro amostras de medicamentos, três na forma de comprimidos e uma na forma de solução oral. As soluções foram preparadas em água destilada e, para os medicamentos na forma de comprimido, estas foram posteriormente filtradas. O medicamento na forma de solução oral dispensou uma filtração posterior. Alíquotas das soluções estoque das formulações comerciais preparadas foram adicionadas à cela eletroquímica, correspondendo a concentração final de PMZ $9,90 \mu\text{mol L}^{-1}$. Sua determinação foi feita em seguida empregando-se a equação da reta obtida na curva analítica determinada anteriormente. Para tais medidas, empregou-se o tampão McIlvaine em pH 5,0, como eletrólito suporte.

3.2.10 Ensaios de Hemocompatibilidade

3.2.10.1 Ensaio de citotoxicidade em leucócitos humanos

Amostras de sangue (10 mL) foram coletadas em tubos heparinizados e misturadas com solução de dextrano a 0,5% (m/v). A mistura foi deixada repousar por 45 minutos e os leucócitos foram separados por sedimentação diferencial. Em seguida, o sobrenadante foi coletado, centrifugado por 10 min a 2000 rpm e o sedimento obtido foi suspenso em uma solução de tampão de lise eritrocitária ($150 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$, $10 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$ e $1 \text{ mmol L}^{-1} \text{ EDTA}$), homogeneizado e deixado por 5 min. Os tubos foram centrifugados por 2 min a 2000 rpm e o sedimento foi lavado novamente com o tampão de lise dos eritrócitos. Em seguida, o sedimento obtido foi suspenso em 2 mL de solução tampão de Hank ($5,4 \text{ mmol L}^{-1} \text{ KCl}$; $0,3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NaHPO}_4$; $0,4 \text{ mmol L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$; $4,2 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$; $0,5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ MgCl}_2$; $122,6 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NaCl}$; $0,01 \text{ mmol L}^{-1} \text{ D-glicose}$; $10 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Tris-HCl}$; $1,3 \text{ mmol L}^{-1} \text{ CaCl}_2$; pH 7,4). A concentração de leucócitos foi ajustada para 2×10^6 células mL^{-1} com a solução tampão de Hank.

O efeito citotóxico de AuNPs-GA e GA em leucócitos foi determinado pelo ensaio de exclusão do azul de tripano, seguindo um método previamente relatado. Primeiramente, $2,5 \mu\text{L}$ de AuNPs-GA foram misturados com suspensão celular e incubados por 3 h a 37°C em banho-maria. Após a incubação, $50 \mu\text{L}$ de suspensão de células foram misturados com $50 \mu\text{L}$ de 0,4% (m/v) de solução de azul de Tripan e deixados por 5 minutos. A viabilidade celular foi

determinada microscopicamente em uma câmara de Neubauer e calculada como o número de células vivas (aquelas que não foram coradas com azul de Tripan) dividido pelo número total de células multiplicadas por 100%. Água destilada e solução de 10 mmol L⁻¹ de hidroperóxido de terc-butil (TBHP) foram usadas como controle negativo e positivo, respectivamente.

3.2.10.2 Ensaio de fragilidade osmótica em eritrócitos humanos

Amostras de sangue (10 mL) foram coletadas em tubos contendo EDTA e os eritrócitos foram separados por centrifugação das amostras de sangue a 2000 rpm por 5 min. A fração plasmática obtida foi descartada e o sedimento celular foi lavado três vezes com tampão PBS 0,15 mol L⁻¹. A influência dos AuNPs-PG e PG nos eritrócitos humanos foi avaliada medindo sua resistência à hemólise em concentrações crescentes de soluções de NaCl, como descrito anteriormente. Em resumo, 500 µL de eritrócitos, 100 µL de AuNPs-PG ou PG e 900 µL de solução de PBS foram incubados por 3 h a 37 °C em banho-maria. Após a incubação, as misturas foram centrifugadas por 10 min a 2500 rpm e os sobrenadantes foram descartados. Os eritrócitos foram lavados duas vezes com tampão PBS 0,15 mol L⁻¹, centrifugados a 2500 rpm por 2 min e o sobrenadante foi novamente descartado. Dois conjuntos duplicados de tubos de ensaio contendo 1,5 mL de soluções de NaCl a 0,0 - 0,9% (m/v) em água destilada foram incubados com 7,5 µL de eritrócitos tratados ou não tratados por 20 minutos. Em seguida, os tubos foram homogeneizados e centrifugados a 2000 rpm por 5 min à temperatura ambiente. O sobrenadante obtido de cada tubo foi transferido para uma microplaca e o conteúdo de hemoglobina foi medido a 540 nm em um leitor de microplacas (Leitor Híbrido Biotek µQuant® Synergy H1). Água destilada foi usada como controle.

3.2.10.2 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o software GraphPad Prism 5.0. Os valores foram expressos como média ± desvio padrão (DP). Foi realizada análise de variância unidirecional (ANOVA), com nível de confiança de 95%, e os resultados foram considerados significativamente diferentes quando $p < 0,05$.

3.2.13 Determinação Voltamétrica do 5-Fluorouracil

O comportamento voltamétrico do 5-FU foi verificado por VC empregando-se o EPC/AgNPs-GAR, o EPC/GAR e o EPC não modificado. 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. Nas condições otimizadas e empregando o EPC/AgNPs-GAR, 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 a superfície do EPC/AgNPs-GAR.

Para avaliação do efeito da variação do pH do eletrólito de suporte sobre a resposta voltamétrica do EPC/AgNPs-GAR na presença do 5-FU, empregou-se a técnica de voltametria de onda quadrada (VOQ). As medidas foram realizadas em tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, em diferentes valores de pH (2,0 a 12,0), e na presença de uma concentração fixa de 5-FU igual a $4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Após estabelecer o pH ótimo para a determinação do analito, avaliou-se a influência do eletrólito de suporte sobre a resposta do EPC/AgNPs-GAR na presença do analito na concentração de $4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Para essas medidas empregou-se a VOQ. As seguintes soluções-tampão foram testadas (no pH escolhido): tampão PBS $0,15 \text{ mol L}^{-1}$, tampão McIlvaine, tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, tampão $\text{H}_3\text{BO}_3\text{.KCl} - \text{NaOH}$ e tampão fosfato.

3.2.14 Otimização dos Parâmetros da Voltametria de Onda Quadrada (VOQ) Empregando-se o EPC/AgNPs-GAR para a Determinação do 5-FU

Os parâmetros da VOQ (incremento ΔE , frequência f e amplitude a) foram otimizados de maneira multivariada, empregando-se um planejamento fatorial Box-Behnken, de acordo com a Tabela 2. As medidas foram realizadas em meio de tampão McIlvaine pH = 5,0, na presença de $4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ da 5-FU. Os parâmetros da VOQ otimizados foram aplicados na obtenção das curvas analíticas para a 5-FU. Os valores dos fatores escolhidos foram baseados em experimentos previamente realizados.

Tabela 2 - Níveis e fatores estudados no Planejamento Box Behnken para a otimização dos parâmetros da VOQ para o EPC/AgNPs-GAR na determinação do 5-FU

Fatores	- 1	0	+ 1
ΔE (mV)	11	14	17
a (mV)	60	80	100
f (Hz)	45	65	85

3.2.15 Obtenção de Curvas Analíticas para o EPC/AgNPs-GAR na Presença de 5-FU

Curvas analíticas foram obtidas por VOQ, na faixa linear de concentrações de $3,0 \times 10^{-5}$ to $3,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de 5-FU, e empregando-se o EPC/AgNPs-GAR 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 EPC/AgNPs-GAR para a determinação do 5-FU foi avaliado por meio de ensaios de recuperação em eletrólito suporte puro. Uma quantidade conhecida do fármaco foi adicionada ao eletrólito, e sua determinação foi feita em seguida empregando-se a equação da reta obtida na curva analítica determinada anteriormente.

3.2.16 Determinação do 5-FU em Formulações Farmacêuticas Comerciais

A potencialidade de aplicação do EPC/AgNPs-GAR para a determinação do 5-FU em amostras de formulação farmacêutica foi estudada por meio da realização de ensaios de recuperação empregando um medicamento na forma de solução oral. Para tanto, adicionou-se uma alíquota de uma solução estoque da formulação comercial estudada, correspondendo a concentração final de 5-FU $1,92 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e realizou-se medidas de corrente. Sua determinação foi feita em seguida empregando-se a equação da reta obtida na curva analítica determinada anteriormente e inserindo-se os valores de corrente obtidos com as adições realizadas. Como eletrólito suporte, empregou-se o tampão BR 0,04 mol L⁻¹ em pH = 8,0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

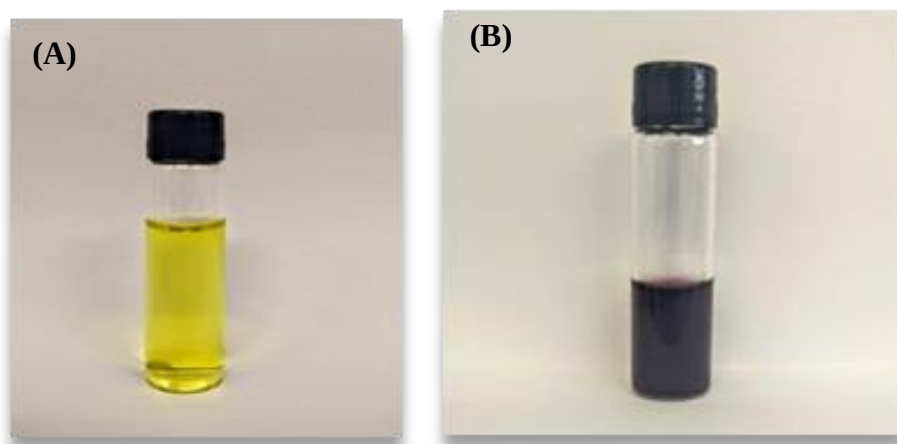
4.1 NANOPARTÍCULAS DE OURO ESTABILIZADAS EM POLISSACARÍDEO EXTRAÍDO DA GOMA DO ABACAXI (*Ananas comosus*): OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO EM ELETRODO DE PASTA DE CARBONO PARA A DETERMINAÇÃO DO CLORIDRATO DE PROMETAZINA

4.1.1 Síntese e Caracterização das AuNPs-GA

Os parâmetros da síntese das AuNPs-GA foram estipulados a partir do estudo relatado por Lima e colaboradores (2018). Desta forma, para se proceder a síntese das AuNPs-GA, adicionou-se uma alíquota da solução estoque de GA (10 mg mL^{-1}) sobre um volume apropriado de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ e H_2O destilada, de modo que as concentrações finais na mistura reacional fossem de 3 mg mL^{-1} de GA e $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ for $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Tais valores de concentração foram baseadas em estudos de otimização anteriores.

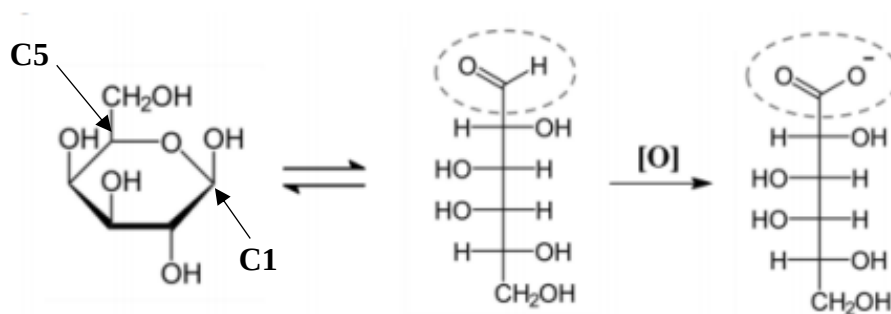
A formação das AuNPs utilizando-se a GA foi indicada pela mudança na coloração da solução, de amarelo (coloração característica do íon complexo AuCl_4^-) para vermelho escuro, cor característica das AuNPs em suspensão (Figura 12). A mudança na cor, e consequentemente a formação e estabilização das AuNPs, não ocorreu instantaneamente. Após a adição da GA e das gotas de NaOH, verificou-se que a solução de AuCl_4^- exibiu descoloração. Após 25 minutos de reação sob aquecimento a 70°C , a solução apresentou coloração vermelha, sugerindo a formação das AuNPs estabilizadas pela GA.

Figura 12 – (A) Solução aquosa a 10 mmol L^{-1} do complexo AuCl_4^- . (B) Suspensão de AuNPs-GA



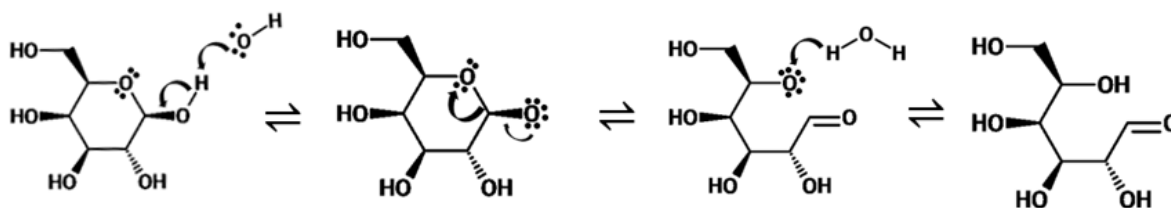
A GA atua simultaneamente como agente redutor e estabilizante na síntese de nanopartículas de ouro. A redução dos íons AuCl_4^- a Au^0 (na forma de AuNPs) pela GA ocorre devido ao fato de que as extremidades das cadeias do polissacarídeo possuem propriedades redutoras. Monossacarídeos como a glicose e a galactose podem atuar como agentes redutores moderados na presença de íons metálicos em um meio básico (VINOD et al.; 2011). O carbono carbonílico de suas estruturas pode ser oxidado a um grupo carboxilato, gerando derivados oxidados denominados de ácidos aldônicos (ácido glucônico para a glicose e ácido galactônico para a galactose). Todavia, este processo é possível apenas quando o monossacarídeo encontra-se em sua forma linear, que existe nas soluções em equilíbrio com a forma cíclica. (NELSON; COX, 2002). Isto ocorre devido ao fato de que, na forma de cadeia fechada, o carbono anomérico (C1) (Figura 13) está diretamente envolvido em uma ligação covalente intramolecular com o átomo de oxigênio da hidroxila ligada na posição C5. Desta maneira, é necessário que a cadeia esteja aberta para que o grupo aldeído seja exposto e a oxidação possa ocorrer. O meio básico favorece o deslocamento do equilíbrio em direção à forma de cadeia aberta, de modo a expor o grupo aldeído e possibilitando desta forma a oxidação. (VINOD et al.; 2011, PEIXOTO et al., 2002). A Figura 14 apresenta o mecanismo envolvido na formação da forma linear do monossacarídeo β -D-galactopiranoose.

Figura 13 – Processo de oxidação do monossacarídeo β -D-galactopiranoose.



Fonte: Lima, D. (2016)

Figura 14 – Processo de desprotonação que origina a forma linear do monossacarídeo β -D-galactopiranosose



Fonte: A autora.

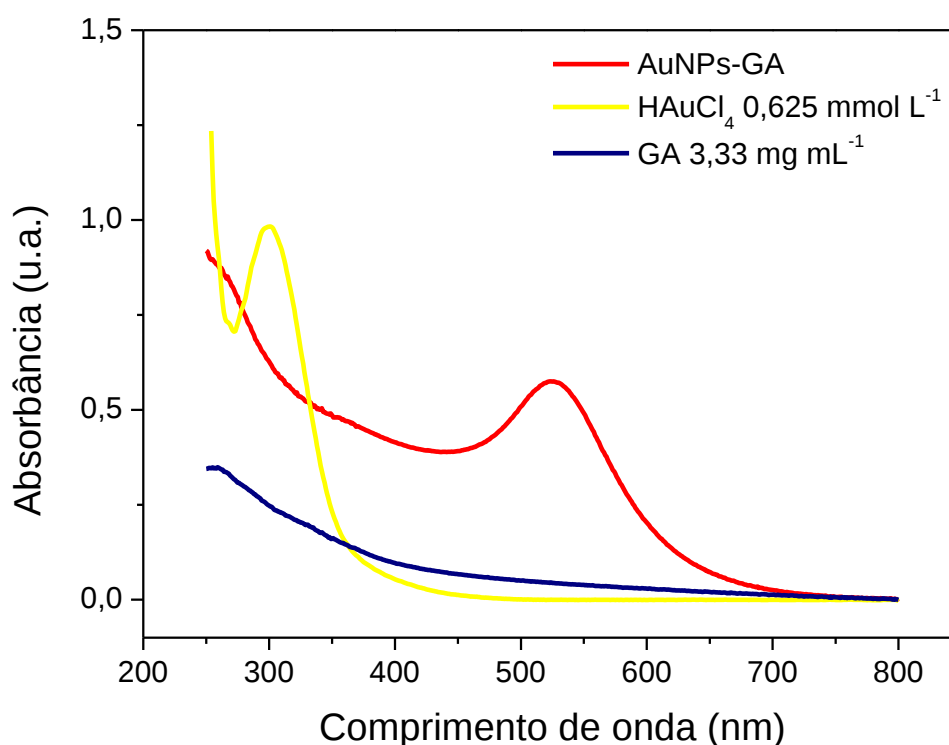
Uma vez que o carbono anomérico está envolvido em uma ligação glicosídica, como ocorre nos oligossacarídeos e polissacarídeos, o resíduo correspondente torna-se não redutor, pois a forma linear da cadeia não é possível de ser formada. Assim, somente a extremidade da cadeia que possuir um carbono anomérico livre (isto é, não envolvido em uma ligação glicosídica), denominada extremidade redutora, será passível de sofrer oxidação. (NELSON; COX, 2002). Na estrutura polissacarídica que compõem GA, apenas as extremidades das cadeias estão envolvidas no processo de redução do complexo AuCl_4^- a Au^0 , com os resíduos restantes atuando provavelmente na estabilização das partículas formadas.

Antes de adicionar a solução de NaOH na mistura reacional, pode-se afirmar que o meio estava ácido, devido ao fato do precursor metálico empregado possuir caráter ácido. Assim, sugere-se que no primeiro momento da síntese, a alta temperatura utilizada possibilitou que algumas cadeias tenham sido hidrolisadas, mesmo em pequena extensão. Consequentemente, há a formação de cadeias menores e uma maior quantidade de extremidades redutoras passa a estar disponível para a reação. (RAVEENDRAN et al., 2015). Assim, pode-se dizer que o processo de aquecimento pode ser tomado como essencial para a formação das AuNPs-GA. Posteriormente, adicionou-se NaOH, e o meio básico favoreceu com que o resíduo da extremidade das cadeias ficasse com o grupo aldeído disponível. Conforme pode ser observado 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. Esta estabilização pode ser resultante, principalmente, de efeitos estéricos exercidos pelo invólucro dos polissacarídeos. Tal efeito pode ser relacionado ao volume de polissacarídeo que

envolve cada nanopartícula, permitindo a estabilização das AuNPs recém-formadas, impedindo a agregação das mesmas.

A espectroscopia de absorção na região do UV-VIS é uma ferramenta importante para o estudo e caracterização de nanopartículas de ouro, uma vez que AuNPs em suspensão apresentam o fenômeno da RPS o qual ocorre na região do espectro visível. Além disso, a frequência e a forma da banda plasmônica pode sugerir informações a respeito do tamanho e da morfologia das partículas (MUTHUVEL et al., 2014). O espectro na região do UV-VIS da AuNPs-GA é ilustrado na Figura 15, bem como a sobreposição dos espectros das soluções do complexo AuCl_4^- e de GA.

Figura 15 – Espectros de absorção na região do UV-VIS da suspensão de AuNPs-GA, HAuCl_4 0,625 mmol L⁻¹ e GA 3,33 mg mL⁻¹

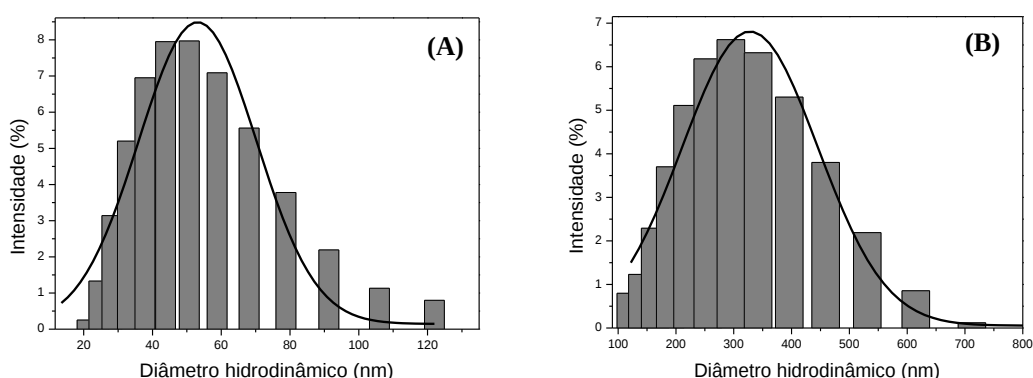


Observa-se que a solução do complexo AuCl_4^- apresentou uma única banda dentro da faixa analisada, em 300 nm, referente às transições de transferência de carga ligante-metal (TCLM). (LIANG; WANG; LIU, 2010). Nenhuma banda de absorção foi observada para a solução de GA na faixa de comprimento de onda estudada. A suspensão de AuNPs-GA apresentou uma única banda em 524 nm, a qual pode ser atribuída ao efeito de RPS das AuNPs

(banda plasmon). Essas bandas sugerem a presença das AuNPs, e também indicam que as nanopartículas sintetizadas possuem propriedades ópticas típicas deste tipo de nanomaterial. (FONG; YUNG, 2013; HUANG; EL-SAYED, 2010; NIESEN et al., 2010). A banda referente ao precursor AuCl_4^- desapareceu totalmente no espectro das AuNPs-GA, sugerindo que possivelmente todos os íons AuCl_4^- inicialmente presentes foram reduzidos a Au^0 .

O perfil de distribuição de tamanho de partículas da suspensão de AuNPs-GA obtida por DLS (Figura 16) revelou uma distribuição bimodal, com intensidades iguais a 8,48% e 6,8%, correspondentes aos diâmetros hidrodinâmicos médios de 52,91 e 318,5 nm, respectivamente. Tal distribuição bimodal pode ser explicada pelo fato de que como intensidade I de uma partícula esférica com raio r é proporcional a r^6 , a intensidade dispersa das partículas de maiores contribui fortemente para a medição do DLS, em relação às partículas menores (HOO et al, 2008). Desta forma, a presença dos polissacarídeos que estabilizam as nanopartículas, pode ser atribuída a esta distribuição. Outra possibilidade consiste na possibilidade de aglomeração de parte das AuNPs, as quais também podem ser formadas no exterior do invólucro da GA. No entanto, conforme será apresentado em seguida, as AuNPs-GA permaneceram estáveis por um período de dois meses. Portanto, tal justificativa deve ser menos provável.

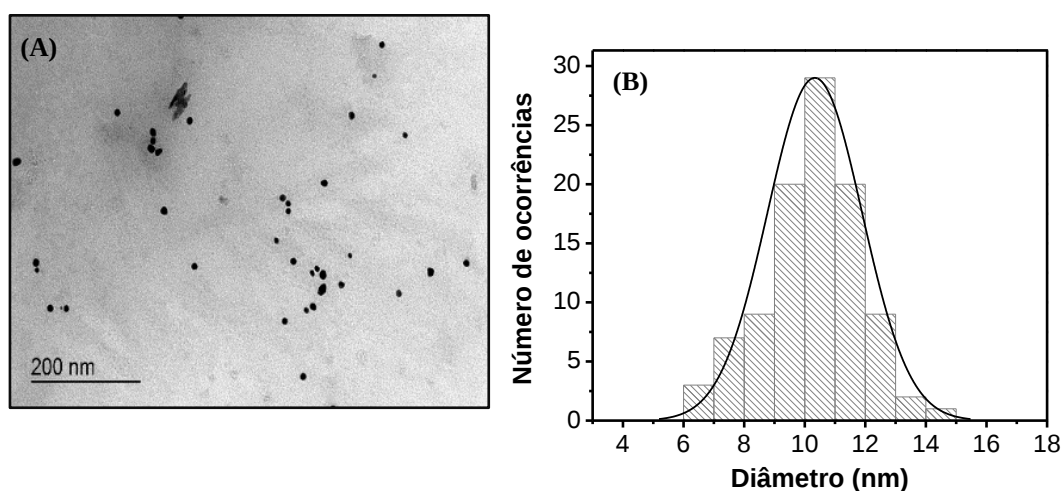
Figura 16 - Distribuição de tamanho de partículas obtida por DLS para as AuNPs-GA (A) correspondente à 52,91 nm e (B) correspondente à 318,5 nm.



O diâmetro real de uma nanopartícula é frequentemente obtido pela técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM), (LIM et al., 2013) que não detecta as moléculas arranjadas ao seu redor e é capaz de fornecer deste modo o tamanho da partícula em si, além de mostrar dados acerca da morfologia das mesmas. Logo, o tamanho das partículas em suspensão resultante de análises de TEM é geralmente menor que o obtido por DLS. Deste modo, a

morfologia e o tamanho de partícula das AuNPs-GA foram investigados pela análise de TEM. Pode-se verificar na micrografia obtida para as AuNPs-GA, mostrada na Figura 17A que as nanopartículas sintetizadas são esféricas, exibem homogeneidade de tamanho e poucos agregados são observados. O histograma de distribuição de tamanho (obtido pela contagem de 450 partículas encontradas em áreas das micrografias arbitrariamente escolhidas, Figura 17B) revelou que os tamanhos das AuNPs-GA sintetizadas variaram no intervalo de 6,5 - 14,5 nm, com um tamanho médio de partículas de $10,33 \pm 1,6$ nm.

Figura 17 – (A) Micrografias obtidas na análise de TEM para as AuNPs-GA. (B) Histograma de distribuição de diâmetro das AuNPs-GA.



A fim de se estudar a existência de interações entre a GA e as AuNPs e comprovar assim o papel dos polissacarídeos na síntese e na estabilização AuNPs, a espectroscopia de FTIR foi empregada. Os espectros de FTIR de filmes *cast* de uma solução de GA 10 mg mL^{-1} e do nanocompósito AuNPs-GA são mostrados na Figura 18, com as atribuições relativas listadas na Tabela 3.

Figura 18 – Espectros vibracionais na região do infravermelho de filmes *cast* de GA 10 mg mL⁻¹ e das AuNPs-GA sobre substratos de silício.

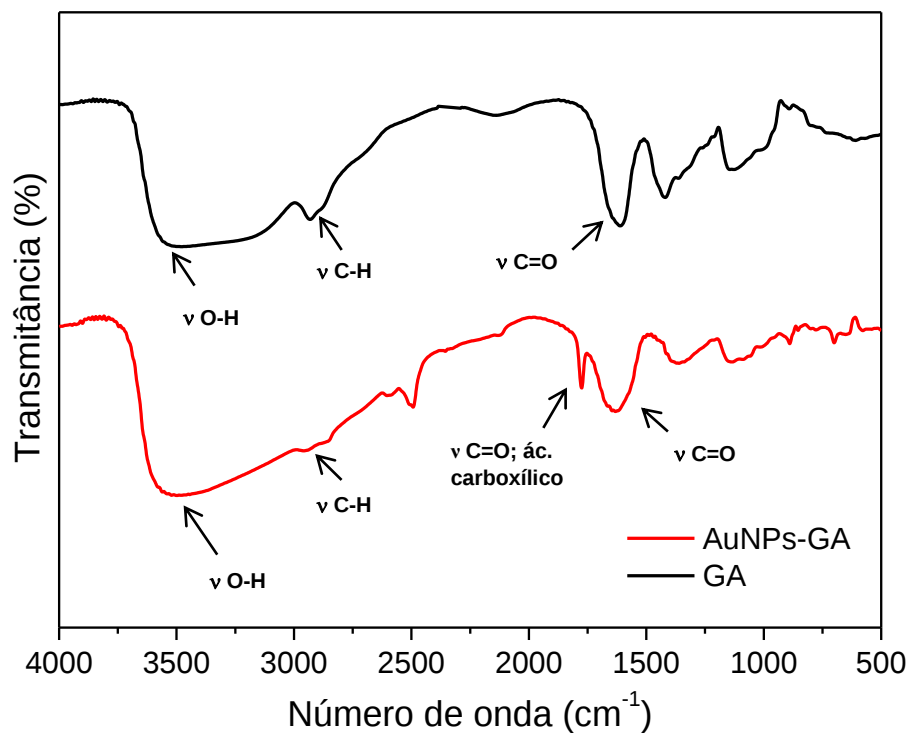


Tabela 3 – Principais bandas observadas no espectro de FTIR para filmes *cast* de GA (10 mg mL⁻¹) e de AuNPs-GA, com as respectivas atribuições.

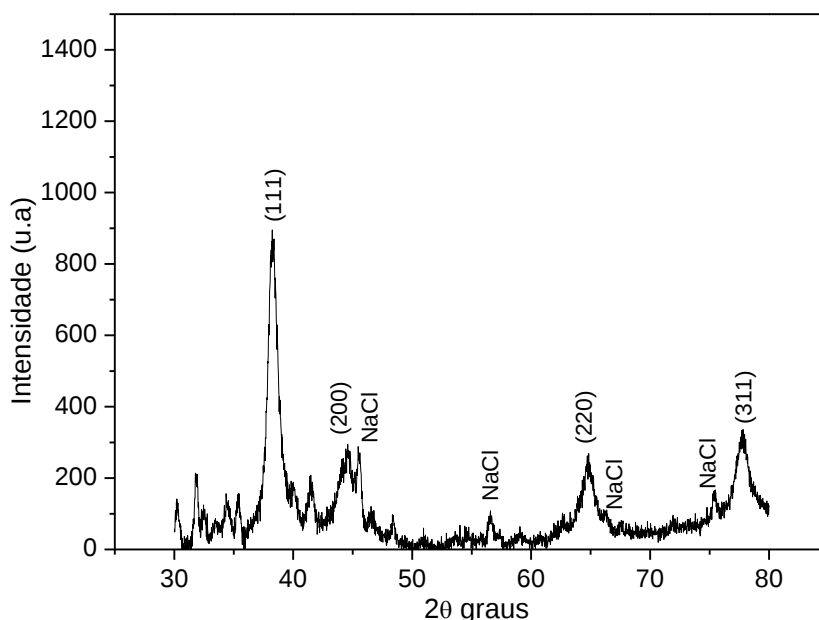
Número de onda (cm ⁻¹)		Modos Vibracionais (PRETSCH; BÜHLMANN; BADERTSCHER, 2009)
GA	AuNPs-GA	
3477	3493	ν O-H
2931	2939	ν C-H
-	1776	ν C=O ác. Carboxílico
1606	1625	ν C=O
1415	1348	δ C-O-C
1110	1107	ν _{as} C-O-C

*ν: deformação axial; δ: deformação angular; as: assimétrica.

As bandas apresentadas pelas AuNPs-GA podem ser atribuídas às mesmas vibrações apresentadas pela estrutura da GA e esta similaridade denota a presença da GA nas AuNPs-GA sintetizadas (CHIEN; CHEN, 2010). Entretanto, os deslocamentos nos valores de frequência observados evidenciam que existem interações entre a GA com as nanopartículas sintetizadas (BALAVANDY et al., 2014; MAITY; SEM; ISLAM, 2012). Adicionalmente, pode-se observar no espectro obtido para as AuNPs-GA o surgimento de uma banda em 1776 cm^{-1} atribuída à vibração de estiramento dos grupos C=O de ácidos carboxílicos. (PRETSCH; BÜHLMANN; BADERTSCHER, 2009) os quais são produtos da oxidação do polissacarídeo que compõem a GA, gerados na reação de redução do complexo $[\text{AuCl}_4^-]$ a AuNPs. Observações semelhantes foram verificadas no trabalho de Muthuvel e colaboradores (2014).

A análise de DRX foi realizada a fim de se determinar a natureza cristalina das AuNPs-GA obtidas, após liofilização da suspensão. O difratograma resultante é apresentado na Figura 19.

Figura 19 – Difratograma de raios X das AuNPs-GA após liofilização, com atribuição dos picos observados.



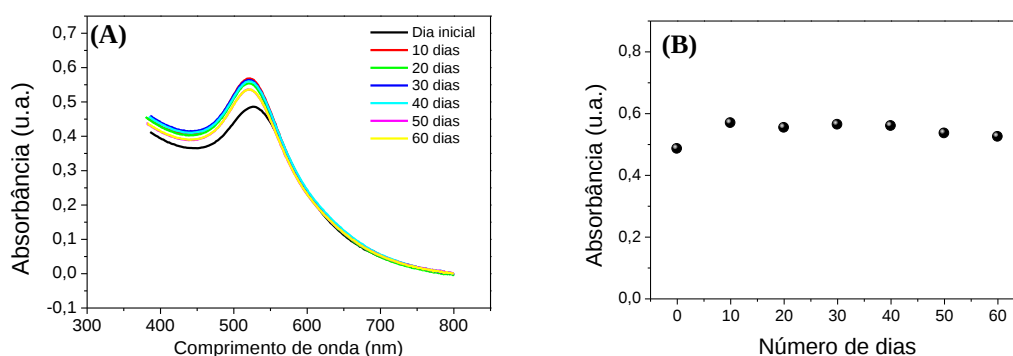
A presença de picos em valores de 2θ iguais a $38,24^\circ$, $44,50^\circ$, $64,84^\circ$ e $77,82^\circ$ são referentes aos planos (111), (200), (220) e (311), respectivamente, para a estrutura cúbica de face centrada apresentada pelo Au metálico. (PANDEY; GOSWAMI; NANDA, 2013; MAITY; SEM; ISLAM, 2012). Além dos picos característicos para o Au, foram identificados

no difratograma picos referentes à presença de NaCl na amostra de AuNPs-GA 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-GA 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 .

A análise de potencial- ζ das AuNPs-GA sintetizadas revelou um valor de -31 mV, o que indica que as AuNPs foram adequadamente estabilizadas com a GA, que possui um caráter aniônico. Como esse valor excedeu a faixa de potencial típica para colóides instáveis (-30,0 mV a +30,0 mV), pode-se afirmar que as AuNPs-GA sintetizadas apresentam uma boa estabilidade, com pequena tendência de sofrerem coalescência (ŠEGOTA; HEIMER; TEŽAK, 2006).

A fim de se avaliar a estabilidade das AuNPs sintetizadas a longo prazo, foram realizadas medidas periódicas de espectroscopia UV-VIS em uma mesma suspensão de AuNPs-GA (Figura 20). A estabilidade foi avaliada por meio de variações na banda plasmon das partículas sintetizadas. Analisou-se a alteração dos perfis em relação à sua forma, intensidade e deslocamento.

Figura 20 – (A) Espectros de absorção na região do UV-VIS da suspensão de AuNPs-GA ao longo de 60 dias. (B) Correlação entre os máximos de absorbância e o número de dias.



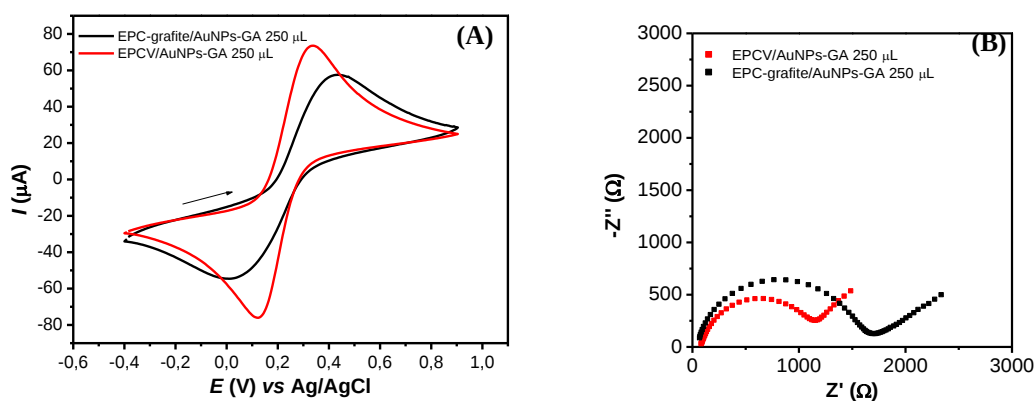
É possível observar que não ocorreram variações significativas na forma da banda plasmônica. O aumento de intensidade observado pode ser um indicativo de que, até 50 dias, a reação de formação das AuNPs-GA continuou ocorrendo lentamente, com a formação de novas partículas e reorganização daquelas já existentes. Os resultados obtidos dentro do período analisado sugerem que as AuNPs-GA permaneceram relativamente estáveis em suspensão,

indicando-se, deste modo, a eficiência da GA como agente estabilizante das nanopartículas sintetizadas, o que está de acordo com o resultado obtido para o potencial- ζ para a mesma (-31,0 mV).

4.1.2 Caracterização Eletroquímica do EPCV Modificado com AuNPs-GA (EPCV/AuNPs-GA)

Inicialmente, realizou-se um estudo comparativo 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), ambos modificados com 250 μL de AuNPs-GAR, utilizando-se VC e EIE, na presença da sonda eletroquímica $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 21.

Figura 21 – (A) Voltamogramas cíclicos e (B) espectros de impedância eletroquímica (diagramas de Nyquist) do EPC-grafite e do EPCV, ambos modificados com 250 μL de AuNPs-GA, 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 21A pode-se verificar que ambos os eletrodos apresentaram picos de corrente para o processo redox típico da sonda eletroquímica $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-} \rightleftharpoons [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. Entretanto, o EPCV/AuNPs-GA 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 modificado com as AuNPs-GA, 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 4). Isto sugere que para o EPCV/AuNPs-GA a cinética de transferência eletrônica é mais efetiva, além de apresentar uma maior reversibilidade para o processo (BRETT; BRETT, 1993) em comparação ao EPC/AuNPs-GA. Uma possível

justificativa para tal comportamento pode ser relacionada ao fato de que a suspensão de AuNPs-GA se incorporou mais eficientemente à pasta de carbono vítreo em relação a pasta de grafite. Ressalta-se também o 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).

A literatura afirma que o diâmetro do semicírculo obtido é igual à resistência à transferência eletrônica (R_{ct}) (BARD; FAULKNER, 2001; BRETT; BRETT, 1993). Verifica-se que o diâmetro do semicírculo obtido para o EPC-grafite/AuNPs-GA foi maior do que o obtido para o EPCV/AuNPs-GA, sugerindo que a resistência à transferência de carga para o carbono vítreo foi menor comparada a 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 4. A R_{ct} verificada para o EPCV justifica, portanto, a utilização do carbono vítreo para a fabricação de eletrodos.

Tabela 4 – Valores de I_{pa} , I_{pc} , ΔE_p e R_{ct} obtidos em estudo comparativo para o EPC-grafite e para o EPCV modificados com AuNPs-GA

Eletrodo	I_{pa} (μA)	$-I_{pc}$ (μA)	E_{pa} (mV)	E_{pc} (mV)	ΔE_p	R_{ct} (Ω)
EPC grafite/AuNPs-GA	52,01	53,35	430	16	414	1589,7
EPCV/AuNPs-GA	71,22	69,50	335	119	216	1065,8

A fim de se avaliar a influência das AuNPs-GA no eletrodo, realizou-se uma comparação por VC e EIE na presença de uma solução equimolar de $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ 0,010 mol L⁻¹ (sonda eletroquímica) preparada em tampão PBS 0,15 mol L⁻¹, pH = 6,5, entre o EPCV/AuNPs-GA, um eletrodo não modificado (EPCV) e modificado apenas com a solução de GA (EPCV/GA). Os resultados encontram-se nas Figuras 22 A e 22 B e na Tabela 5 estão os valores dos parâmetros obtidos dos voltamogramas e dos espectros de impedância.

Figura 22 – (A) Voltamogramas cíclicos e (B) Espectros de impedância eletroquímica do EPCV/AuNPs-GA, EPCV/GA 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).

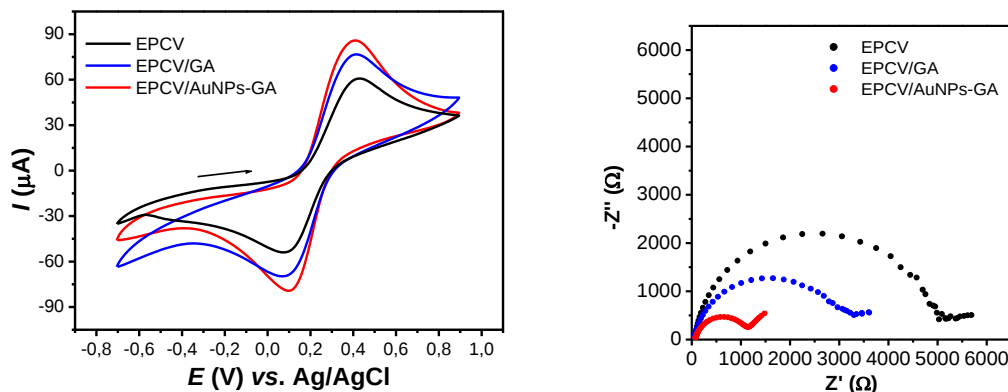


Tabela 5 – Valores de I_{pa} , I_{pc} , ΔE_p e R_{ct} obtidos para o EPCV, para o EPCV/GA e para o EPCV/AuNPs-GA

Eletrodo	I_{pa} (μA)	$-I_{pc}$ (μA)	E_{pa} (mV)	E_{pc} (mV)	ΔE_p	R_{ct} (Ω)
EPCV	42,29	49,23	430	75	355	4990,5
EPCV/GA	56,69	69,76	415	65	350	3266,4
EPCV/AuNPs-GA	69,04	76,83	400	95	305	1065,8

A partir da Tabela 4, é possível observar que o EPCV modificado apenas com a goma do abacaxi (EPCV/GA) 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. Verifica-se também que o diâmetro do semicírculo obtido para o EPCV foi maior do que o obtido para o EPCV/GA. Este aumento no diâmetro do semicírculo para o EPCV sem modificação em relação ao EPCV/GA, sugere que a R_{ct} para o eletrodo modificado com a GA foi menor comparada a observada para o eletrodo não modificado. Os maiores valores de I_p , menores valores de R_{ct} e um menor valor de ΔE_p para o EPCV/GA podem ser explicados devido ao fato de que a modificação da pasta com a GA possivelmente proporciona ao material um maior caráter hidrofílico, devido à grande quantidade de hidroxilas existentes na estrutura dos polissacarídeos que compõem as gomas. A presença destes 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).

Ao observar o voltamograma e o espectro de impedância obtidos para o EPCV/AuNPs-GA, verifica-se que um incremento ainda maior na resposta de corrente é obtido, além de uma maior diminuição no valor da R_{ct} , em comparação ao comportamento observado para o EPCV e para o EPCV/GA. Uma progressiva redução no valor de ΔE_p na ordem EPCV/AuNPs-GA < EPCV/GA < EPCV pode ser observada, demonstrando que a modificação dos eletrodos com as AuNPs-GA proporcionou uma reversibilidade ainda maior ao processo redox da sonda eletroquímica do que a observada para o EPCV/GA.

Os maiores valores de corrente, menor valor de ΔE_p e menor valor de R_{ct} apresentado pelo EPCV/AuNPs-GA (em comparação ao EPCV/GA e ao EPCV) podem ser atribuídos às propriedades características das AuNPs aliadas com a GA, como elevada condutividade e alta área superficial. Isto sugere que a modificação dos eletrodos com o nanocompósito sintetizado é um procedimento vantajoso para a aplicação do mesmo como sensor eletroquímico.

O valor da área eletroativa de cada um dos eletrodos estudados foi estimado pela equação (Equação 5) de Randles-Sevik. Tal equação foi empregada no presente trabalho adaptando-se para eletrodos modificados.

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

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 KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$); C é a concentração da espécie eletroativa em solução (em mol cm^{-3}) e ν é a velocidade de varredura de potencial (em V s^{-1}). (BARD; FAULKNER, 2001; BRETT; BRETT, 1993). De acordo com a equação, para uma mesma concentração de espécie eletroativa e a uma mesma velocidade de varredura, a corrente de pico dependerá diretamente da área do eletrodo. Os resultados obtidos para a determinação das áreas eletroativas dos eletrodos estudados são apresentados na Tabela 6. Neste caso analisou-se o valor de I_{pc} de cada eletrodo, a qual é originada no 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.

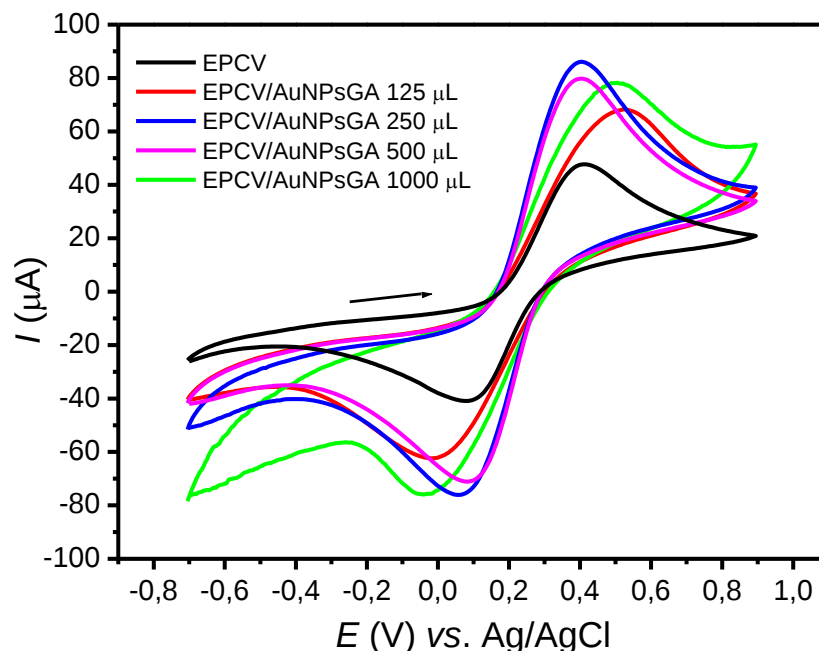
Tabela 6 – Valores médios da área eletroativa estimados do EPCV não modificado, EPCV/GA e EPCV/AuNPs-GA (n = 3 para cada um dos eletrodos).

Eletrodo	- I_{pc} (μA)	Área eletroativa estimada (cm^2)
EPCV	$40,65 \pm 0,59$	$0,048 \pm 0,60$
EPCV/GA	$42,46 \pm 0,62$	$0,05 \pm 0,60$
EPCV/AuNPs-GA	$51,39 \pm 0,18$	$0,062 \pm 0,18$

O valor da I_{pc} , e consequentemente o da área eletroativa, aumentou na ordem $EPCV < EPCV/GA < EPCV/AuNPs-GA$. A maior área obtida para o EPCV/GA em comparação ao EPCV pode ser uma consequência da superfície mais hidrofílica dos eletrodos modificados apenas com a GA, 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-GA, uma maior área foi observada comparando-se ao EPCV/GA, e com o EPCV. Provavelmente, isso é devido ao efeito da presença das AuNPs na superfície eletródica.

A fim estudar a influência que a quantidade de AuNPs-GA presente exerce sobre a resposta do EPCV, foi realizado um estudo com diferentes volumes de AuNPs-GA (125, 250, 500 e 1000 μL) adicionados em uma massa fixa de 50,0 mg de carbono vítreo em pó. Os estudos foram realizados na presença de $10,0 \text{ mmol L}^{-1} [Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$, com solução tampão de $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ PBS como eletrólito de suporte. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 23.

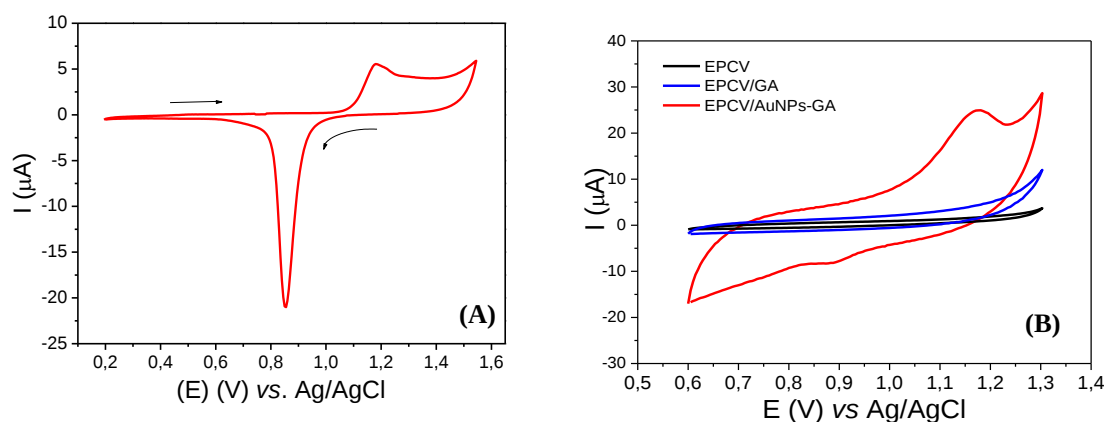
Figura 23 – Voltamogramas cíclicos ($v = 50,0 \text{ mV s}^{-1}$) do EPCV com diferentes volumes of AuNPs-GA (125,250, 500, e 1000 μL), na presença de $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ tampão PBS (pH 7.4) contendo $10,0 \text{ mmol L}^{-1} \text{K}_4\text{Fe(CN)}_6/\text{K}_3\text{Fe(CN)}_6$.



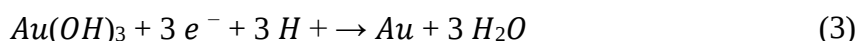
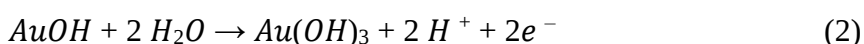
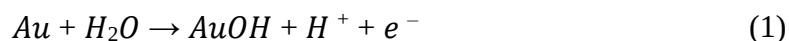
Conforme mostrado na Figura 23, a corrente de pico aumentou até a adição de 250 μL de AuNPs-GA e, em seguida, foi observada uma diminuição acentuada na corrente de pico. O aumento da quantidade de AuNPs pode ser prejudicial a performance do eletrodo, uma vez que pode ocorrer a agregação das mesmas na pasta, fazendo com que o nanomaterial perca suas propriedades condutoras e diminuindo sua área superficial. Assim, a corrente de pico também diminui (OREN; ANIK, 2017; ÇUBUKÇU;TIMUR; ANIK,2007). Portanto, 250 μL de AuNPs-GA foram empregados para a confecção dos eletrodos nos estudos subsequentes.

A fim de se comprovar a presença das AuNPs-GA no EPCV confeccionado, foram realizadas medidas de VC com o eletrodo modificado em meio ácido (tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, pH 2,0). Medidas nas mesmas condições foram realizadas para um eletrodo de ouro policristalino, para o EPCV e para o EPCV/GA. Os resultados são mostrados nas Figuras 24A e 24B.

Figura 24 – Voltamogramas cíclicos (A) de um eletrodo sólido de ouro e (B) do EPCV/AuNPs-GA, EPCV/GA e EPCV não modificado, em meio ácido (tampão BR 0,04 mol L⁻¹ pH 2,0)



É possível observar no voltamograma cíclico obtido do eletrodo de Au sólido processos redox característicos do ouro, com picos anódicos na região de +1,18 V e um pico catódico em +0,85 V (BURKE; NUGENT, 1997; WANG, Y.et al., 2013). Estes processos são referentes à formação de óxidos de ouro durante a varredura anódica que permanecem adsorvidos na superfície do eletrodo, e são posteriormente reduzidos durante a varredura catódica. Pode-se visualizar esta sequência de reações por meio das seguintes equações:



onde as equações (2) e (3) referem-se aos processos de oxidação e a equação (4) ao processo de redução. O produto formado $Au(OH)_3$, pode ser representado também na forma $Au_2O_3 \cdot 3H_2O$, correspondente ao óxido hidratado. Salienta-se que o processo é restrito à superfície eletródica e as moléculas de água que participam das reações estão adsorvidas à superfície do metal. (BURKE; NUGENT, 1997; WANG, Y.et al., 2013).

Pode-se observar pela Figura 24 B que o voltamograma obtido em meio ácido para o EPCV/AuNPs-GA apresentou um processo anódico em +1,18 V e um processo catódico em +0,87 V. Estes podem ser atribuídos ao processo redox típico para o Au, de acordo com as equações (1) a (3). Por outro lado, os voltamogramas obtidos em meio ácido para o EPCV não modificado e para o EPCV/GA não revelaram picos anódicos ou catódicos, exibindo apenas corrente capacitiva. Deste modo, pode-se afirmar que as AuNPs-GA exibiram eletroatividade e foram devidamente incorporadas nos EPCV/AuNPs-GA. A aplicação de ciclos voltamétricos

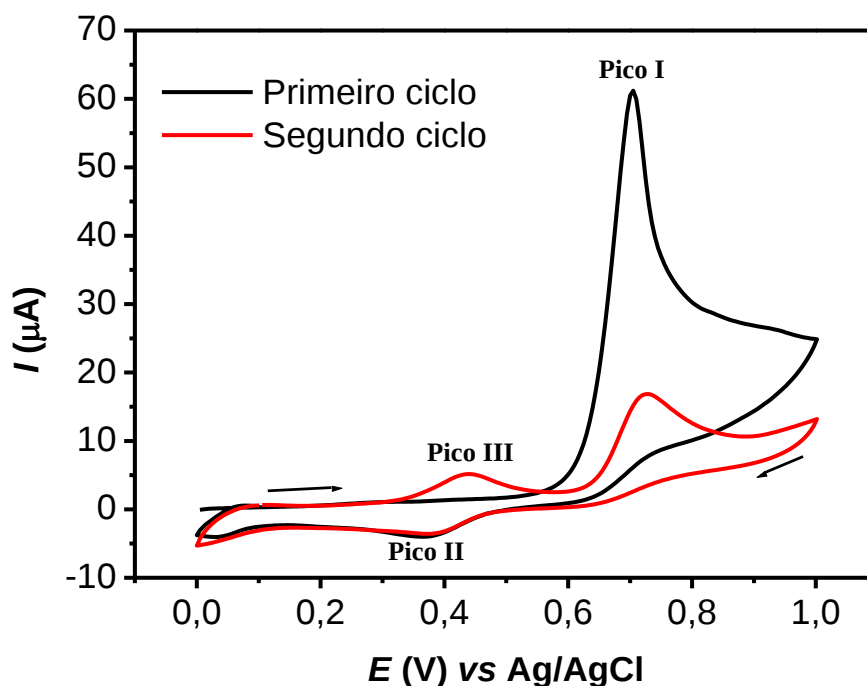
sucessivos não acarretou em um decréscimo significativo de corrente para os processos identificados, o que sugere que as nanopartículas permaneceram estáveis no eletrodo, não havendo a lixiviação das mesmas para o eletrólito.

4.1.3 Determinação do Cloridrato de Prometazina (PMZ)

4.1.3.1 Comportamento voltamétrico

Inicialmente, verificou-se o mecanismo de eletroxidação da PMZ na superfície do EPCV/AuNPs-GA. Os voltamogramas obtidos na faixa de 0,0 a 1,0 V (vs. Ag/AgCl) são mostrados na Figura 25.

Figura 25 – Voltamogramas cíclicos para o EPCV/AuNPs-GA na presença $4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de PMZ em meio de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

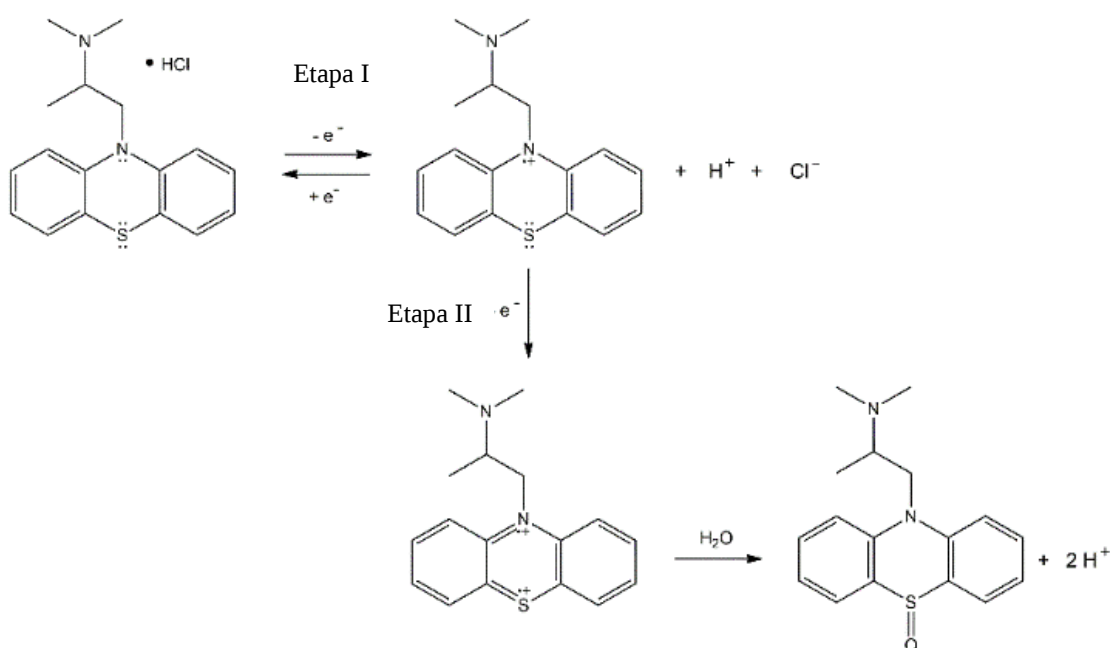


O pico III apareceu apenas na segunda varredura voltamétrica, o que pode ser visualizado na Figura 25. Conforme pode ser observado na Figura 26, esse comportamento evidencia que o mecanismo de oxidação da PMZ ocorre em duas etapas:

- *Etapa I* - Primeiro, um elétron é removido do átomo de nitrogênio da molécula de PMZ para produzir um radical cátion relativamente estável, gerando o Pico I em 0,75 V. Parte desses radicais são reduzidos novamente à PMZ, dando origem ao pico catódico II em 0,40 V. (NI; WANG; KOKOT, 2001; DANIEL; GUTZ, 2003; RIBEIRO, et al., 2008).;
- *Etapa II* - Os radicais catiônicos restantes formados no Pico I são mais facilmente oxidados com um potencial mais baixo, em 0,48 V (Pico III) e sofrem hidrólise para produzir sulfóxido de prometazina, o produto final da via de oxidação. (NI; WANG; KOKOT, 2001; DANIEL; GUTZ, 2003; RIBEIRO, et al., 2008), proporcionando um decréscimo do pico I.

Determinou-se o Pico I para ser avaliada as respostas dos eletrodos, uma vez que as correntes geradas pelo Pico I são maiores e também devido ao fato de que o Pico de oxidação III é dependendo do processo I. Além disso, esse é o pico estudado na maioria dos estudos eletroquímicos envolvendo a PMZ encontrados na literatura (MARCO et al., 2013; HONARMAND; MOTAGHEDIFARD; GHAMARI, 2014; HONARMAND et al., 2016; ALIZADEH; AKHOUNDIAN, 2010; JESUS, et al., 2011).

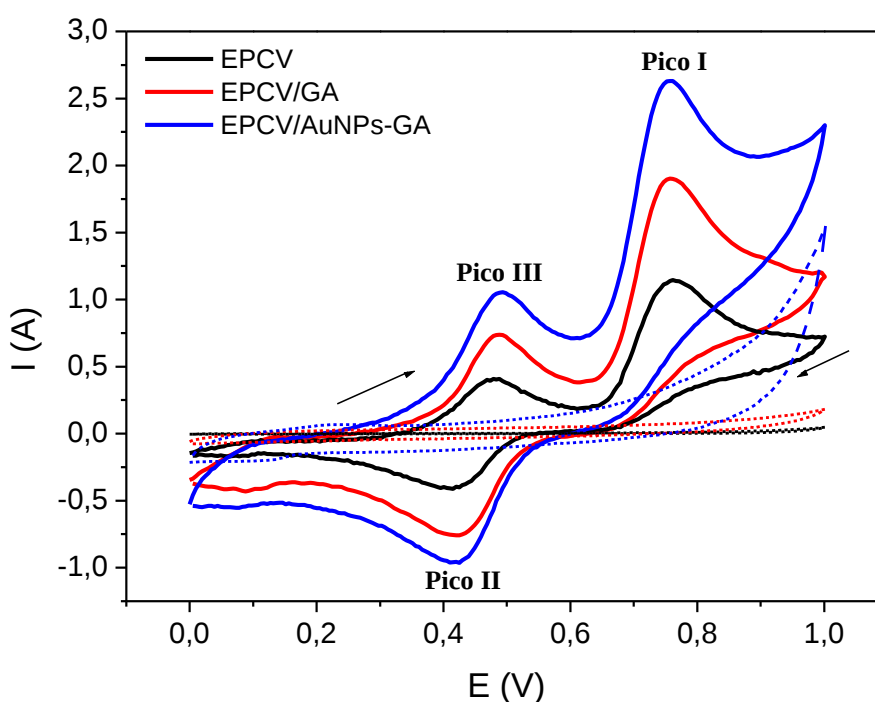
Figura 26 - Mecanismo de oxidação da PMZ



Fonte: Adaptado de HONARMAND; MOTAGHEDIFARD; GHAMARI, 2014.

Posteriormente, a fim de se verificar a eletroatividade da PMZ sobre os eletrodos estudados, foram realizados estudos por voltametria cíclica, empregando uma concentração fixa PMZ igual a $1,96 \mu\text{mol L}^{-1}$, em meio de uma solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Os voltamogramas obtidos na faixa de 0,0 a 1,0 V (vs. Ag/AgCl) são mostrados na Figura 27.

Figura 27 – Voltamogramas cíclicos do EPCV, do EPCV/GA e do EPCV/AuNPs-GA na presença de $1,96 \mu\text{mol L}^{-1}$ de PMZ, em meio de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. As linhas pontilhadas representam os voltamogramas dos mesmos eletrodos na ausência dos analitos.



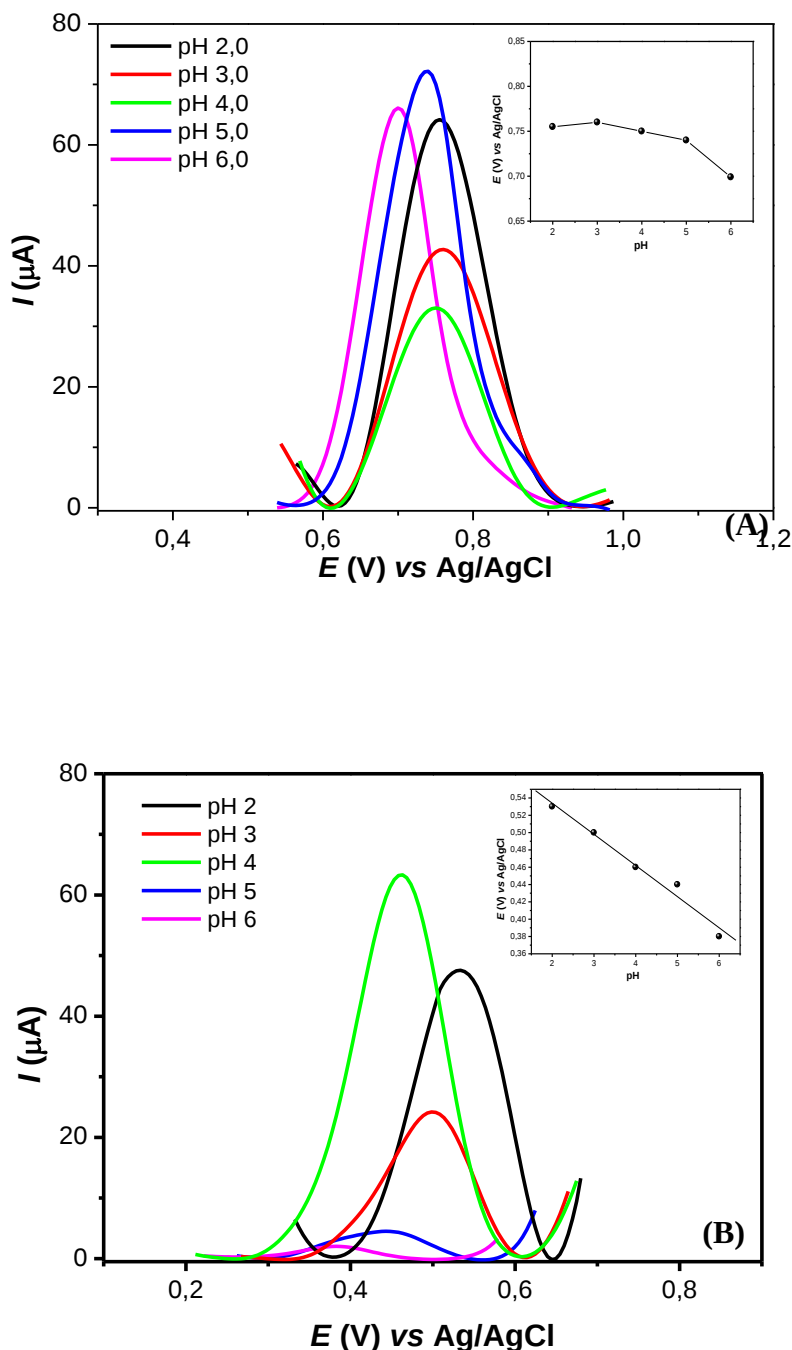
Pode-se observar nos voltamogramas da Figura 27 que, na ausência do analito, não houve o surgimento de picos de corrente para nenhum dos eletrodos estudados. Desta maneira, os mesmos não apresentam resposta eletroquímica na faixa de potencial e no pH estudados, possuindo apenas corrente capacitiva. No entanto, na presença de PMZ, foram identificados dois processos de oxidação em torno de 0,75 V (pico I) e 0,48 V (pico III) e um processo de redução (pico II) em torno de 0,40 V. É possível notar que os picos anódicos e catódicos da PMZ no EPCV/AuNPs-GA apresentaram maiores valores de corrente ($10,54$ e $26,29 \mu\text{A}$ para os picos I e III, respectivamente, e $-11,09 \mu\text{A}$ para o pico II) em comparação aos mostrados pela EPCV/GA ($7,38$ e $19,02 \mu\text{A}$ para o pico I e III, respectivamente, e $-7,90 \mu\text{A}$ para o pico II) e o EPCV ($4,09$ e $11,46 \mu\text{A}$ para o pico I e III, respectivamente, e $-3,72 \mu\text{A}$ para o pico II). O

incremento nas correntes de pico deve estar relacionado à alta condutividade elétrica dos AuNPs, associada ao aumento da área eletroativa proporcionada pela incorporação do nanocompósito no eletrodo, conforme foi apresentado previamente. Vale ressaltar que a GA também pode ter facilitado o processo de oxidação da PMZ devido aos seus grupos funcionais polares. Tais grupos podem ter proporcionado uma interação inicial mais forte com as moléculas de PMZ, provavelmente através de forças intermoleculares de ligação de hidrogênio e dipolo-dipolo, facilitando o processo de oxidação de PMZ.

4.1.3.2 Influência do pH na resposta voltamétrica da PMZ

Uma vez que há o envolvimento de prótons no mecanismo de oxidação eletroquímica da PMZ, pode-se inferir que o pH do meio terá influência direta sobre a resposta do EPCV/AuNPs-GA na presença do analito. O pH do eletrólito suporte é um dos parâmetros de maior importância para o desempenho analítico de um sensor, influenciando muitas vezes de maneira direta a resposta eletroquímica do dispositivo durante a detecção do analito. (HONG; ZHU; ZHANG, 2012). A fim de que esta influência fosse avaliada, estudos por meio de VOQ com o EPCV/AuNPs-GA foram realizados na presença de $4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de PMZ 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 6,0. Avaliou-se separadamente o comportamento de ambos os picos anódicos com a mudança do pH. Os voltamogramas de onda quadrada obtidos para o Pico I e para o Pico III assim como as relações de E_{pa} em função do valor de pH são mostrados na Figura 28. A técnica de VOQ 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, tal método empregado também para todos os estudos posteriores.

Figura 28 – (A) Voltamogramas de onda quadrada para o Pico I (A) e para o pico III (B) do EPCV/AuNPs-GA na presença de $4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de PMZ, em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, com valores de pH variando na faixa de 2,0 a 6,0. Os gráficos inseridos em ambos são referentes as relações de E_{pa} em função do pH obtidas a partir dos voltamogramas.



Pode-se observar na Figura 28A que para o Pico I houve um pequeno deslocamento, à medida em que o pH era elevado e o E_{pa} , permanecendo praticamente constante, sendo observado um valor máximo e mínimo de E_{pa} de 0,75 V e 0,70 V, respectivamente. Já para o

Pico III, um deslocamento foi verificado, conforme pode ser visualizado na Figura 28B, indicando que há prótons envolvidos nesse processo de oxidação. Comportamento semelhante a este também foi observado no trabalho de Ribeiro et al. (2008). Isso corrobora com o mecanismo de oxidação apresentado para a PMZ na Figura 26. Na Etapa I, há apenas o envolvimento de 1 elétron na eletrooxidação, não havendo o envolvimento de prótons e, portanto, não são observadas mudanças significativas no valor de E_{pa} com o pH para o pico I. Entretanto, na Etapa II, responsável pela formação do sulfóxido de prometazina há o envolvimento de prótons e consequentemente o deslocamento foi observado. Uma relação linear foi observada entre o E_{pa} e o pH do eletrólito suporte para o Pico III (Figura 23B), com uma inclinação igual a $-36,0 \text{ mV pH}^{-1}$ ($E_{pa} \text{ (vs. Ag/AgCl)} = 0,606 - 0,036 \text{ pH}$, $R = -0,991$). Este valor aproxima-se da inclinação nernstiana teórica de $-29,0 \text{ mV pH}^{-1}$, que corresponde a processos onde 2 elétrons e 1 próton estão envolvidos no processo de eletrooxidação (HONARMAND, et al, 2016), o que corrobora com o mecanismo da PMZ apresentado na Figura 26.

Pode ser observado que para o Pico III da PMZ, o potencial desloca-se para valores mais baixos com o aumento do pH do eletrólito de suporte, indicando que nestas condições o processo ocorre mais facilmente, uma vez que a oxidação se dá com a retirada de dois prótons. Consequentemente, o cátion radicalar formado nas primeiras duas etapas será oxidado em um potencial mais baixo. Em pHs ácidos, ao contrário, os prótons a serem removidos da molécula encontram-se mais firmemente ligados à mesma, pois a concentração de íons OH^- nestes pHs é baixa. Neste caso, a remoção de prótons pode estar dificultada e um maior valor de potencial é necessário para que os mesmos possam ser retirados da molécula, resultando então em sua oxidação (ARVAND; ANSARI; HEYDARI, 2011).

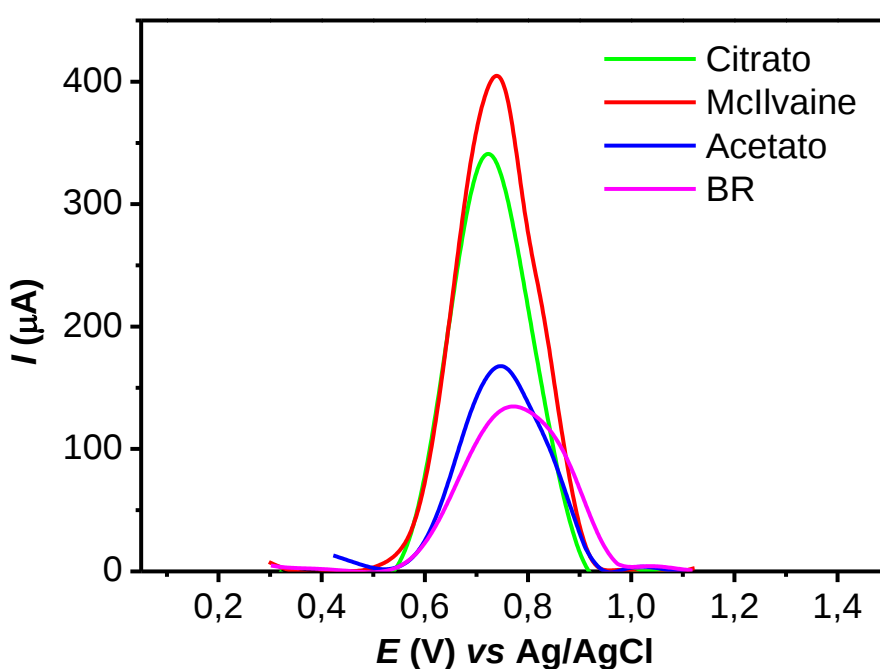
Pode-se observar pela Figura 28A que o pH 5,0 apresentou a melhor resposta eletroquímica em termos de intensidade de corrente, o que está de acordo com trabalhos anteriormente reportados na literatura (JESUS, et al., 2011; PRIMO et al., 2014). Desta maneira, o pH 5,0 foi utilizado nos estudos subsequentes.

4.1.3.3 Influência do eletrólito suporte

O tipo de eletrólito suporte a ser utilizado nas medidas eletroquímicas 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). Como a reação de oxidação da PMZ apresentou dependência em relação ao pH, foram escolhidos quatro meios tamponantes para

serem testados para o fármaco, todos com pH ajustado para 5,0, os quais foram: 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 citrato (ácido cítrico e citrato de sódio) e tampão acetato (CH_3COOH e CH_3COONa). Os voltamogramas de onda quadrada obtidos com o EPCV/AuNPs-GA para $4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de PMZ são mostrados na Figura 29.

Figura 29 – Voltamogramas de onda quadrada do EPCV/AuNPs-GA na presença de $4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de PMZ, em diferentes tipos de soluções tampão, em pH 5,0 (parâmetros utilizados: $a = 50 \text{ mV}$; $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$; $f = 100 \text{ Hz}$)

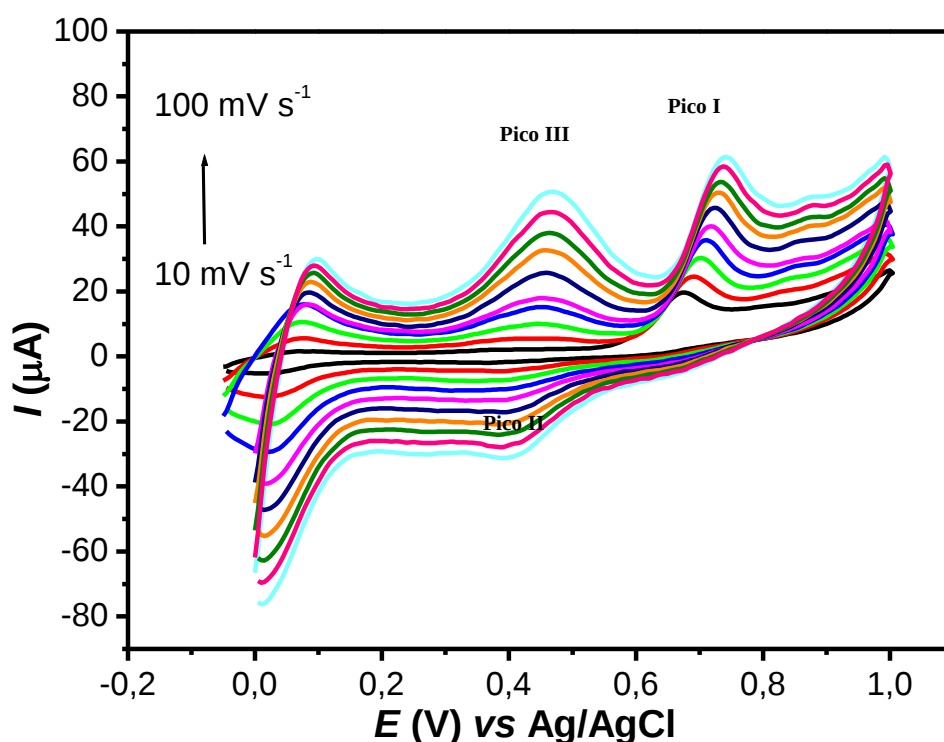


Verifica-se que a natureza do eletrólito influenciou a resposta do EPCV/AuNPs-GA para a PMZ, uma vez que pequenos deslocamentos de potencial e diferenças na magnitude da I_{pa} foram observados comparando-se os diferentes eletrólitos testados. Observou-se que soluções tampão contendo ácido cítrico em sua composição (McIlvaine e citrato) exibiram maiores respostas atuais. Isto sugere que a composição de tais soluções tampão pode de alguma forma facilitar a chegada da molécula de PMZ à superfície EPCV/AuNPs-GA. Verificou-se também que houve um considerável incremento de corrente para o tampão McIlvaine frente às demais soluções (tampão citrato = $341,04 \mu\text{A}$; tampão acetato = $167,70 \mu\text{A}$; tampão BR = $134,69 \mu\text{A}$, tampão McIlvaine = $404,81$). Assim, selecionou-se o tampão McIlvaine (em pH 5,0) para todas as análises subsequentes.

4.1.3.4 Influência da velocidade de varredura

Com o objetivo de se determinar o mecanismo de transporte de massa envolvido na reação de oxidação da PMZ na superfície eletródica do EPCV/AuNPs-GA, realizou-se um estudo de velocidade de varredura (v), por meio de VC. As medidas foram realizadas variando-se a v no intervalo de 10 mVs^{-1} a 100 mVs^{-1} . Empregou-se uma concentração fixa de PMZ igual a $4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, e como eletrólito de suporte o tampão McIlvaine em pH 5,0. Os voltamogramas obtidos são apresentados na Figura 30.

Figura 30 – Voltamogramas cíclicos obtidos para $4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de PMZ, em meio de tampão McIlvaine em pH 5,0, com v variando de 10 a 100 mV s^{-1} .



Para se estimar a natureza do processo redox da PMZ sobre a superfície do EPCV/AuNPs-GA, utilizou-se da relação de duplo logaritmo entre a I_{pa} e a v , assim como no trabalho realizado por Shih e colaboradores (2004). Tal método é baseado nas seguintes deduções:

- i. Processos reversíveis controlados por difusão são descritos pela equação:

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

onde: n é o número de elétrons transferidos na reação; A é a área do eletrodo (em cm^2); Γ é a concentração da espécie eletroativa adsorvida na superfície do eletrodo (mol cm^{-2}), D é o coeficiente de difusão, C é a concentração da espécie eletroativa em solução e v é a velocidade de varredura de potencial (em V s^{-1}). Assim, a corrente de pico (e também qualquer outro valor de corrente do voltamograma) é proporcional a $v^{1/2}$. (BARD; FAULKNER, 2001; BRETT; BRETT, 1993).

Aplicando-se o logaritmo (base 10) na equação (5), obtém-se:

$$(\log) I_p = \log [(2,69 \times 10^5) n^{3/2} A D^{1/2} C] + \log v^{1/2} \quad (7)$$

Esta equação pode ser reduzida a:

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

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

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

- ii. O mesmo tratamento acima mostrado acima para a equação (5) pode ser dado à equação (6).

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

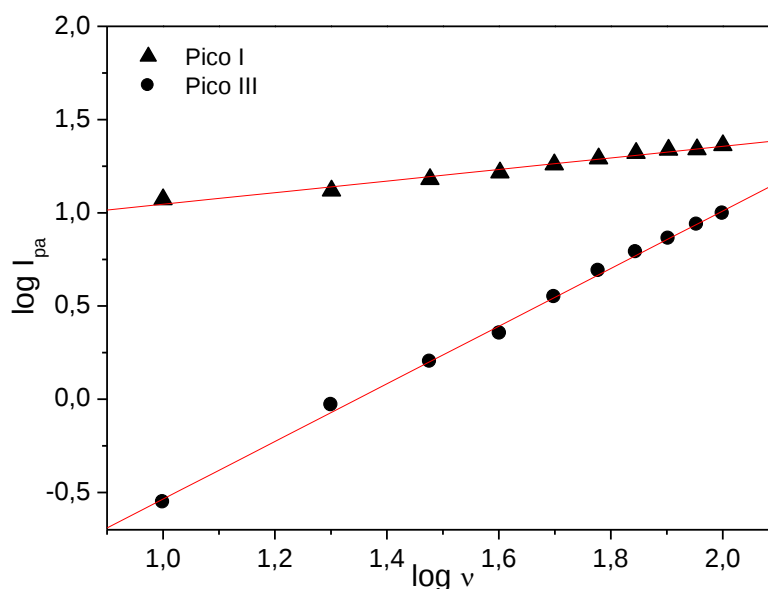
$$\log (I_p) = \log \left(\frac{n^2 F^2}{4RT} A \Gamma \right) + \log v \quad (11)$$

$$\log (I_p) = \text{constante} + \log v \quad (12)$$

$$\text{inclinação} = 1,0 = \frac{\partial \log I_p}{\partial \log v} \quad (13)$$

De acordo com a equação 9, uma inclinação do gráfico de $\log I_{pa}$ vs. $\log v$ igual a 0,5 é obtida no caso de processos puramente difusionais. Segundo a equação 13, o processo será inteiramente adsorptivo quando uma inclinação de 1,0 é obtida para o mesmo gráfico. Inclinações entre 0,5 e 1,0 indicam mecanismos mistos, controlados simultaneamente por difusão e adsorção. Apesar de tais relações apresentadas serem definidas para eletrodos sólidos não modificados (BARD; FAULKNER, 2001; BRETT; BRETT, 1993), estas foram utilizadas como forma de estimar a natureza do transporte de massa, de acordo com trabalhos já citados na literatura (SHIH et al., 2004; LIMA et al, 2018; TURUNC; GUMUS; ARSLAN, 2019; KUMAR et al, 2019). A fim de se verificar a natureza do transporte de massa do processo de oxidação da PMZ sobre o EPCV/AuNPs-GA, aplicou-se a relação do duplo logaritmo no sistema em estudo. Os gráficos resultantes são mostrados na Figura 31.

Figura 31 – Relações do duplo logaritmo ($\log I_{pa}$ vs. $\log v$) obtida para a PMZ.



As correlações do duplo logaritmo obtidas foram obtidas pelas equações $\log I_{pa} = 0,31 \log v + 0,74$, $R^2 = 0,989$ para o pico I e $\log I_{pa} = 1,55 \log v - 2,08$, $R^2 = 0,9968$ para o pico III. Assim, pode-se afirmar que o transporte de massa referente ao pico I é controlado predominantemente por difusão uma vez que o valor de inclinação da reta obtido (0,31) se

aproximou do valor característico para processos difusionais, sendo, portanto, este pico o mais adequado para acompanhar em determinações eletroanalíticas. Por sua vez, o transporte de massa do pico III é controlado predominantemente por adsorção, devido ao fato do valor da inclinação da reta obtida (1,55) ser próximo ao valor característico para processos adsorptivos.

4.1.3.5 Otimização dos parâmetros da VOQ

Nos últimos anos, planejamentos fatoriais vêm sendo frequentemente empregados na otimização de métodos analíticos, uma vez que permitem a redução no número de experimentos que precisam ser executados, resultando em um menor consumo de reagentes. Além disso, os planejamentos fatoriais possibilitam o desenvolvimento de modelos matemáticos capazes de avaliar a relevância estatística dos efeitos dos fatores em estudo, bem como investigar os efeitos de interação entre os mesmos. Os experimentos de Box-Behnken são caracterizados por planejamentos fatoriais com 3 níveis dos fatores e por modelos de segunda ordem e consistem em uma eficiente metodologia para a obtenção de superfícies de resposta. (FERREIRA, et al, 2007). Tal planejamento foi empregado pois os resultados obtidos são utilizados para a construção de modelos matemáticos que descrevem o comportamento do sistema dentro da região experimental investigada. (BREITKREITZ; SOUZA; POPPI, 2014).

Desta forma, a fim de obter uma maior intensidade de corrente para a determinação da PMZ com o EPCV/AuNPs-GA, os parâmetros instrumentais da VOQ amplitude de pulso a , incremento ΔE s e frequência f foram otimizados por meio de um planejamento fatorial Box-Behnken com triplicata no ponto central. Empregou-se para a otimização uma concentração fixa de $4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de PMZ, com todas as medidas realizadas em solução tampão McIlvaine em pH 5,0. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 7. Os valores dos parâmetros escolhidos foram determinados através de estudos anteriores. Para a realização deste estudo, um mesmo EPCV/AuNPs-GA foi empregado, realizando-se uma limpeza da superfície eletródica entre as medidas. Tal limpeza foi realizada lixando-se gentilmente a superfície do eletrodo em uma folha de papel sulfite limpa. Ressalta-se ainda que se seguiu uma ordem aleatória na realização de cada ensaio.

Tabela 7 – Coeficientes de contraste para o planejamento fatorial Box-Behnken empregado para a otimização dos parâmetros da VOQ. (ΔE_s : (-) = 6 mV , (0) = 8 mV , (+) = 10 mV ; a : (-) = 80 mV, (0) = 90 mV, (+) = 100 mV ; f : (-) = 80 Hz , (0) = 90 Hz , (+) = 100 Hz)

Ensaio	ΔE_s	a	f	I (μA)
1	-	-	0	387,97
2	+	-	0	457,34
3	-	+	0	424,45
4	+	+	0	490,69
5	-	0	-	340,50
6	+	0	-	414,69
7	-	0	+	445,31
8	+	0	+	496,67
9	0	-	-	357,76
10	0	+	-	388,19
11	0	-	+	450,35
12	0	+	+	499,09
13	0	0	0	627,15
14	0	0	0	628,40
15	0	0	0	630,42

A análise de variância (ANOVA) foi realizada a fim de se avaliar a significância do modelo quadrático gerado, bem como verificar se o mesmo apresenta um bom ajuste aos dados experimentais obtidos. A ANOVA (Tabela 8) do modelo matemático quadrático ao qual os dados experimentais foram ajustados evidenciou que a variância explicada pelo mesmo é bem próxima da máxima variância explicável ($R_{sq} = 0,99975$; $R_{adj} = 0,9993$) e que a falta de ajuste não foi significativa. Além disso, observou-se que os efeitos principais das variáveis estudadas, bem como os efeitos de interação de segunda ordem entre ΔE_s e f e a e f foram significativos para a obtenção de um maior valor de corrente a um nível de confiança de 95%. Portanto, confirma-se que o modelo quadrático proposto pode explicar satisfatoriamente os dados experimentais obtidos, sendo capaz de prever com uma confiabilidade de 99,93% o comportamento da variável dependente (no caso, a resposta I_{pa}) frente às variáveis independentes estudadas (ΔE_s , f e a).

Tabela 8 – ANOVA obtida no tratamento estatístico dado aos resultados

Fator	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado	p
ΔEs	41185,2	2	20592,61	7563,49	0,000132
a	35744,6	2	17872,29	6564,34	0,000152
f	61583,3	2	30791,66	11309,51	0,000088
$\Delta Es*f$	165,2	2	82,58	30,33	0,031917
$a*f$	83,8	1	83,81	30,78	0,030982
Falta de ajuste	58,4	3	19,47	7,15	0,125134
Puro erro	5,4	2	2,72	-	-
Total	126578,6	14	-	-	-

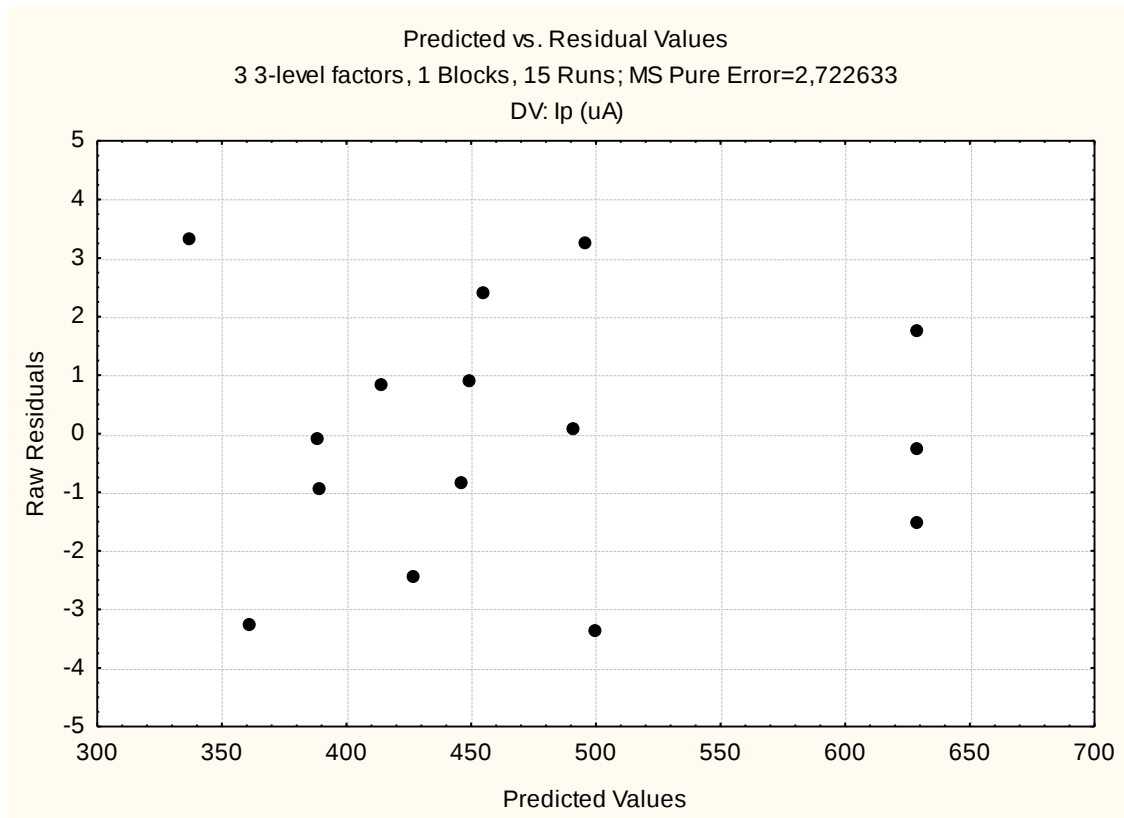
Pode-se observar também pela ANOVA que os efeitos principais (ΔEs , a e f) bem como as interações de segunda ordem ($\Delta Es*f$ e $a*f$) foram significativos. Portanto, para a obtenção de uma maior resposta de corrente, a interação entre as variáveis deve ser levada em consideração, e os demais efeitos não devem ser interpretados individualmente (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001). Observa-se também que o fator que possui o maior efeito na resposta de corrente é f . Isso corrobora com a literatura (SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003), uma vez que para sistemas reversíveis, o aumento da corrente é proporcional à raiz quadrada da frequência:

$$I_p = k_r f^{1/2}$$

O aumento da frequência de aplicação dos pulsos de potencial causa um aumento na resposta de corrente, com a conseqüente melhoria na sensibilidade da análise. Entretanto, este aumento na frequência deve ser observado, uma vez que reversibilidade da reação pode diminuir. (SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003).

A Figura 32 apresenta a distribuição aleatória dos resíduos, indicando que o modelo obtido não foi tendencioso.

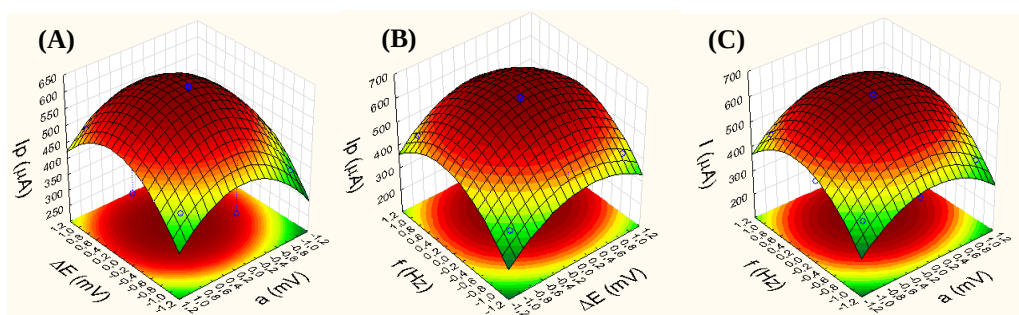
Figura 32 - Distribuição dos resíduos



Os resultados obtidos a partir deste planejamento foram ajustados a um modelo matemático quadrático. A resposta de interesse (I_{pa}) é representada em função das variáveis estudadas (a , f e ΔE). O modelo gerado é apresentado a seguir:

$$I_{pa} = 628,66 + 32,65 \times \Delta E_s + 18,63 \times a + 48,79 \times f - 94,05 \times \Delta E_s^2 - 94,50 \times a^2 - 110,31 \times f^2 - 0,7825 \times \Delta E_s \times a - 5,71 \times \Delta E_s \times f + 4,58 \times a \times f$$

As superfícies de resposta obtidas estão representadas na Figura 33.

Figura 33 – Superfícies de resposta em função das variáveis (A) ΔE e a , (B) f e ΔE e (C) f e a .

Analisando-se a Figura 21, verifica-se que, dentro do intervalo em que as variáveis ΔE_s , a e f foram avaliadas, o valor da I_{pa} passa por uma região de máximo (área vermelho-escura do gráfico de superfície de resposta), a qual corresponde à região experimental ótima para a determinação da PMZ empregando-se o EPCV/AuNPs-GA utilizando-se a VOQ. Além disso, pode-se observar no gráfico de curvas de nível que nesta região encontra-se o ponto central do planejamento. Portanto, tais condições foram adotadas como os valores ótimos, as quais são $a = 90 \text{ mV}$, $f = 100 \text{ Hz}$ e $\Delta E_s = 8 \text{ mV}$.

4.1.3.6 Obtenção de curvas analíticas

Após a otimização das variáveis experimentais (pH, tipo de eletrólito suporte e parâmetros da VOQ), curvas analíticas foram obtidas para a PMZ empregando-se o EPCV/AuNPs-GA por meio de VOQ, na faixa de concentração 3,98 a 15,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Escolheu-se esta faixa de concentração a fim de se verificar se o EPCV/AuNPs-GA era capaz de apresentar uma resposta linear de corrente em função de baixos valores de concentração de PMZ em amostras de padrão analítico e reais. Foi utilizada uma solução estoque do analito de concentração $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, com adições de alíquotas de 20 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/GA. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 34. As equações das retas obtidas pela regressão linear das três curvas analíticas bem como os respectivos coeficientes de correlação são mostradas na Tabela 8.

Uma vez que houve o aumento linear da I_{pa} com o aumento na concentração de PMZ possibilitou o cálculo dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para os eletrodos estudados. O LD pode ser definido como a mais baixa concentração de analito que pode ser detectada, porém não quantificada de modo que o sinal analítico produzido seja distinguível do ruído do equipamento. 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 confiança, consistindo em um valor maior que o LD. (ARMBRUSTER; PRY, 2008). O LD e o LQ para a determinação da PMZ foram calculados da maneira recomendada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2003), por meio das seguintes equações:

$$LD = \frac{3 \times dp}{b} \quad LQ = \frac{10 \times dp}{b} \quad (14)$$

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 também são apresentados na Tabela 9.

Figura 34 – (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos com o EPCV/AuNPs-GA na faixa de 3,98 a 15,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de PMZ, em tampão McIlvaine pH 5,0, com $a = 90 \text{ mV}$, $f = 100 \text{ Hz}$ e $\Delta E_s = 8 \text{ mV}$. (B) Curva analítica obtida para o EPCV/AuNPs-GA (média de três determinações).

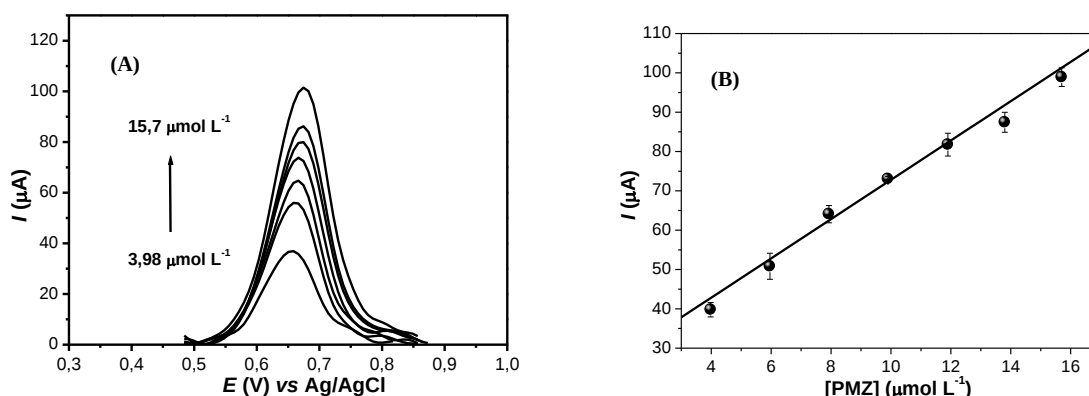


Tabela 9 – Parâmetros analíticos e valores de LD e LQ obtidos a partir da regressão linear das curvas para a determinação de PMZ com o EPCV não modificado, EPCV/GA e EPCV/AuNPs-GA

Parâmetro	Eletrodo		
	EPCV	EPCV/GA	EPCV/AuNPs-GA
Faixa linear estudada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	3,98 a 15,7	3,98 a 15,7	3,98 a 15,7
Equação da reta	$I (\mu\text{A}) = 3,30 [\text{PMZ}] - 3,11 \times 10^{-6}$	$I (\mu\text{A}) = 3,56 [\text{PMZ}] + 1,84 \times 10^{-5}$	$I (\mu\text{A}) = 4,99 [\text{PMZ}] + 2,28 \times 10^{-5}$
Coeficiente de correlação (R^2)	0,990	0,989	0,991
LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	5,67	2,32	1,09
LQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	10,71	7,72	3,62

As curvas analíticas indicaram um aumento linear do valor de I_{pa} com o aumento da concentração de PMZ dentro da faixa estudada para cada um dos eletrodos. Entretanto, observa-se que a inclinação obtida para a curva analítica do EPCV/AuNPs-GA (4,99) foi superior às

observadas para os demais eletrodos (3,30 e 3,56 para o EPCV e o EPCV/GA, respectivamente), evidenciando assim sua maior sensibilidade ao fármaco em estudo. Pode-se atribuir que o melhor desempenho analítico do EPCV/AuNPs-GA é uma consequência da inserção das AuNPs estabilizadas na GA sintetizadas, já citadas anteriormente.

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-GA, pois valores inferiores para os dois parâmetros foram encontrados para este eletrodo em comparação aos demais.

Na Tabela 10, estão mostrados alguns trabalhos descritos na literatura relacionados a determinação da PMZ. Pode ser observado que, apesar de alguns valores de LD e LQ apresentados serem menores que os obtidos empregando-se o EPCV/AuNPs-GA, ressalta-se a vantagem de confecção simples e rápida do sensor desenvolvido neste trabalho perante aos demais listados. Adicionalmente, dentre os sistemas de detecção os quais utilizam nanopartículas metálicas, este é um dos únicos baseados na síntese verde das mesmas. O LD e o LQ alcançados para o EPCV/AuNPs-GA podem ser considerados como satisfatórios para a determinação de PMZ em amostras de medicamentos.

Tabela 10 – Valores de LD e de LQ obtidos para a determinação de PMZ em diferentes trabalhos reportados na literatura.

Técnica	Eletrodo de trabalho	LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Referência
VPD ¹	p-ABSA/ZnO/ ECV ²	0,004	-	(CHEN, et al, 2014)
VPD ¹	FeMoNPs/ECV ³	0,010	-	(ARUMUGAM, et al, 2020)
VPD ¹	Au-NPs/EPC ⁴	0,648	-	(HONARMAND; MOTAGHEDIGAR D; GHAMARI, 2014)
VPD ¹	MPSI-Au SAM ⁵	0,246	-	(HONARMAND, et al, 2016)
VOQ	SiPy ⁺ Cl ⁻ /CuTsPc ⁶	0,009	0,093	(JESUS, et al, 2011)
AIS ⁷	-	2,180	7,170	(FENG, et al, 2007)
Fluorescência	CQDs-MIPs ⁸	0,500	-	(ENSAFI;NASR-ESFAHANI; REZAEI, 2017)
VOQ	EPCV/AuNPs-GA	1,090	3,620	Este trabalho

¹ VPD: Voltametria de pulso diferencial

² p-ABSA/ZnO/ECV: eletrodo de carbono vítreo modificado com ZnO

³ FeMoNPs/ECV: eletrodo de carbono vítreo modificado com nanoplaquetas de molibdato de ferro

⁴ Au-NPs/EPC: eletrodo de pasta de carbono modificado com nanopartículas de ouro

⁵ MPSI-Au SAM: eletrodo de ouro modificado com bis-N-(2-mercaptobenil) salicilaldimina (MPSI)

⁶ SiPy⁺Cl⁻/CuTsPc: filme de LBL com cloreto de silsesquioxano de 3-n-propilpiridínio e ftalocianina de cobre tetrasulfonada (II)

⁷ Análise por injeção sequencial

⁸ CQDs-MIPs: sensor óptico baseado em *quantum dots* de carbono revestidos com polímeros molecularmente impressos

4.1.3.7 Determinação de níveis de repetibilidade, reprodutibilidade e ensaios de determinação

A precisão do EPCV/AuNPs-GA para a determinação da PMZ 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 VOQ sucessivas, nas condições experimentais otimizadas e no mesmo dia, com o EPCV/AuNPs-PG na presença de $2,44 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de PMZ. A precisão intermediária, por sua vez, foi avaliada por meio da realização de cinco medidas ($n = 5$) com um mesmo EPCV/AuNPs-GA, em dias e em soluções diferentes, igualmente na presença de $2,44 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ do analito. Para a determinação da reprodutibilidade de preparação dos eletrodos, foram preparados cinco EPCV/AuNPs-GA, 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 equação:

$$\%DPR = \frac{s}{x} \times 100 \quad (15)$$

onde s é a estimativa do desvio padrão das I_{pa} obtidas em cada caso e x é a média aritmética simples das mesmas. Os resultados para os estudos de precisão são mostrados na Tabela 11.

Tabela 11 – Resultados para repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade de preparação do eletrodo para a determinação de PMZ com o EPCV/AuNPs-GA.

Parâmetro	% DPR
Repetibilidade	1,61%
Precisão intermediária	0,48%
Reprodutibilidade	2,47 %

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 PMZ com o EPCV/AuNPs-GA em relação a resposta gerada pelos eletrodos bem como quanto a sua preparação. Tais resultados sugerem uma boa potencialidade analítica para o sensor desenvolvido.

A seguir, ensaios de determinação da PMZ em eletrólito suporte puro (tampão McIlvaine em pH 5,0) foram realizados utilizando-se VOQ a fim de se verificar quanto da amostra de PMZ adicionada pode ser realmente quantificada pelo EPCV/AuNPs-GA. Tais estudos foram realizados utilizando-se a equação da reta da curva analítica obtida anteriormente

para o EPCV/AuNPs-GA, e seus resultados podem ser tomados como uma medida da viabilidade de utilização do sensor desenvolvido para a determinação do fármaco em amostras reais. Para tanto, adicionou-se alíquotas de 60, 100 e 140 μL de uma solução estoque de PMZ de concentração igual a $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, correspondendo as concentrações de PMZ de 5,96; 9,90 e 13,80 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Registrou-se o valor de corrente para cada adição e posteriormente, verificou-se se a concentração obtida através da equação da reta $I (\mu\text{A}) = 4,99 [\text{PMZ}] + 2,28 \times 10^{-5}$ era próxima ao valor adicionado. Tal análise foi realizada em triplicata e em 3 dias diferentes para cada uma das concentrações estudadas. Na Tabela 12 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-GA na determinação de PMZ em amostras reais.

Tabela 12 – Valores de recuperação obtidos com o EPCV/AuNPs-GA na determinação de PMZ

Adicionado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	(DPR%)	Recuperação (%)
Mesmo dia			
5,96	6,01 $\pm$ 0,09	1,50	100,92
9,90	9,91 $\pm$ 0,20	2,02	100,17
13,82	13,73 $\pm$ 0,35	2,55	99,51
Dias diferentes			
5,96	6,08 $\pm$ 0,01	0,15	101,00
9,90	9,95 $\pm$ 0,09	0,90	101,72
13,80	13,74 $\pm$ 0,05	0,36	99,13

4.1.3.8 Determinação em formulação farmacêutica comercial

A aplicação do EPCV/AuNPs-GA na determinação da PMZ em amostras de formulação farmacêutica comercial (em comprimido e em gotas) foi avaliada pela realização de ensaios de recuperação por VOQ, empregando-se amostras de quatro medicamentos. Novamente utilizou-se a equação da reta obtida anteriormente. Adicionou-se alíquotas de soluções estoque preparadas anteriormente das formulações comerciais estudadas, correspondendo a

concentração final de PMZ $9,90 \mu\text{mol L}^{-1}$. Registrou-se o valor de corrente para cada adição e posteriormente, verificou-se se a concentração obtida através da equação da reta $I (\mu\text{A}) = 4,99 [\text{PMZ}] + 2,28 \times 10^{-5}$ era próxima ao valor adicionado. Tal análise foi realizada em triplicata. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 13.

Tabela 13 – Resultados obtidos por VOQ para o estudo de recuperação em amostras de formulação farmacêutica comerciais empregando-se o EPCV/AuNPs-GA.

	Amostra A	Amostra B	Amostra C	Amostra D
Rotulado	25,0 mg/comprimido	5,0 mg/comprimido	25,0 mg/comprimido	5,0 mg//1,5 mL
Determinado	$25,67 \pm 0,15$ mg/comprimido	$4,83 \pm 0,09$ mg/comprimido	$24,32 \pm 0,6$ mg/comprimido	$4,77 \pm 0.05$ mg/comprimido/1,5 mL
Erro (%)	2,68	3,40	2,72	4,6
DPR (%)	0,58	1,86	2,47	1,05

Os resultados obtidos para a análise da formulação farmacêutica confirmaram a exatidão da metodologia voltamétrica desenvolvida. Verifica-se que os valores de dosagem determinados pelo método desenvolvido aproximaram-se dos valores rotulados para todas as formulações comerciais estudadas, com erros inferiores a 5%. Ressalta-se também o bom nível de precisão, uma vez que os desvios padrões relativos resultaram em valores abaixo de 5%. Destaca-se ainda a praticidade do método, uma vez que não foram necessárias etapas prévias de extração do princípio ativo a partir da amostra, conduzindo a análises mais rápidas. Assim, pode-se afirmar que o EPCV/AuNPs-GA, aliado à técnica de VOQ é uma alternativa viável para a determinação da PMZ em amostras reais de medicamentos.

4.1.4 Ensaios de hemocompatibilidade

Neste trabalho, investigou-se a hemocompatibilidade da suspensão de AuNPs-GA e da solução do extrato de GA, avaliando seus possíveis efeitos tóxicos em leucócitos e eritrócitos humanos. Este é um estudo importante para futuras aplicações biomédicas da AuNPs-GA sintetizadas, bem como para sua aplicação em biossensor, visando a detecção de analitos biologicamente relevantes em amostras de sangue.

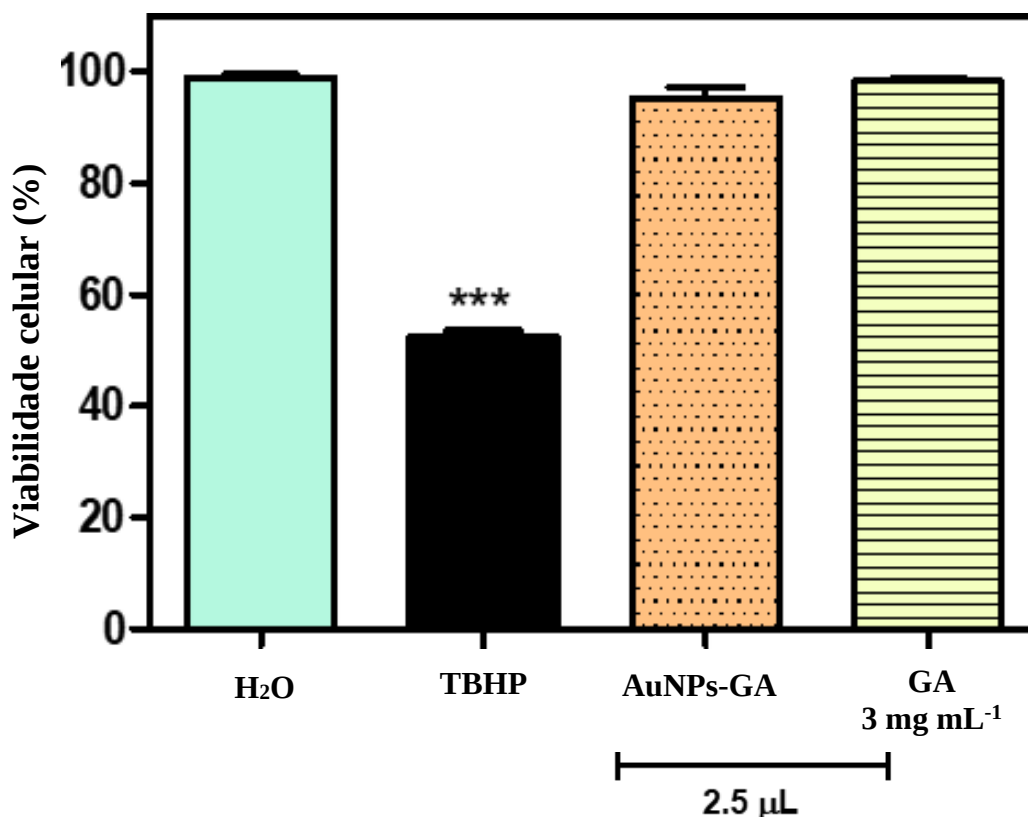
4.1.4.1 Ensaio de citotoxicidade em leucócitos humanos

A citotoxicidade para leucócitos foi avaliada usando o ensaio de exclusão por azul de Tripan, em que o número de células viáveis em uma suspensão previamente exposta aos materiais ou compostos em estudo é determinado, considerando que as células vivas possuem membranas plasmáticas intactas que podem excluir certos corantes (como o azul de Tripan). Por outro lado, as células mortas podem ser coradas com o corante mencionado devido à perda da integridade da membrana (HILLEGASS, et al, 2010).

O efeito dos AuNPs-GA e da GA nos leucócitos humanos é demonstrado na Figura 35. Como esperado, a água destilada não afetou a integridade da membrana (apresentando uma viabilidade celular em torno de 100%), enquanto apenas 50% das células foram viáveis após a incubação em presença de TBHP ($p < 0,05$). O TBHP é um peróxido orgânico que apresenta propriedades citotóxicas bem conhecidas. Os efeitos citotóxicos do TBHP são atribuídos a dois mecanismos principais: sua decomposição em radicais alcoxila e peroxila que podem induzir a produção de ERO (incluindo H_2O_2 e radical hidroxila) na presença de Fe^{2+} celular, que acelerará as reações em cadeia da peroxidação lipídica e danificará o DNA; e alteração no metabolismo da glutatona que leva a concentrações elevadas de cálcio citosólico e, finalmente, lesão da membrana (ALIA, et al, 2005; BARTOLI, et al, 1994).

Cerca de 98% de viabilidade celular foi observada após a exposição de leucócitos a AuNPs-GA ou GA, que foi estatisticamente equivalente ao controle negativo em ambos os casos ($p > 0,05$). Esse comportamento indica claramente que as nanopartículas e o polissacarídeo não romperam a membrana plasmática, mesmo após 3 horas de exposição. Assim, a ausência de efeitos tóxicos para a integridade da membrana plasmática dos leucócitos pode ser confirmada.

Figura 35 - Efeito de AuNPs-GA e GA em leucócitos humanos. Os resultados são expressos em porcentagem em relação ao controle negativo (água destilada). Os valores são a média de 3 experimentos independentes realizados em duplicata $\pm$ desvio padrão.



4.1.4.2 Ensaio de fragilidade osmótica em eritrócitos humanos

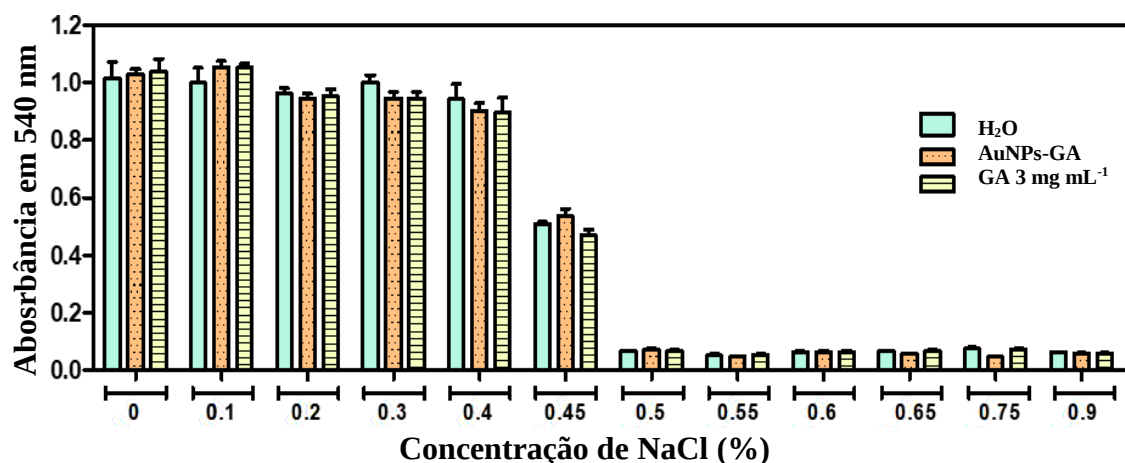
As propriedades hemocompatíveis da AuNPs-GA e da GA foram ainda avaliadas pela realização de ensaios de fragilidade osmótica em eritrócitos humanos. Este ensaio é um indicador útil para avaliar se a interação de nanopartículas com a membrana celular pode levar a efeitos de citotoxicidade *in vitro* e se baseia na resistência dos eritrócitos à ação de agentes hemolíticos (ANGELOVA; YORDANOV, 2017). Nas soluções salinas hipotônicas, os eritrócitos absorvem a água do ambiente externo e incham, com a consequente desintegração da membrana celular e liberação da hemoglobina intracelular (hemólise). Em soluções contendo NaCl em concentrações em torno de 0,5% ou mais, a membrana plasmática dos eritrócitos normalmente permanece estável e não ocorre hemólise detectável (KAUSHANSKY, et al, 2016; ROSSI et al, 2006). Se algum composto ou agente externo ao qual os eritrócitos estão expostos de alguma forma desestabilizam a membrana celular, espera-se que as células sofram hemólise em concentrações de sal superiores ao normal (ANGELOVA; YORDANOV,

2017). Nesse sentido, realizou-se esse ensaio para verificar a influência da AuNPs-GA e da GA na estabilidade da membrana plasmática de eritrócitos.

Como mostrado na Figura 36, um comportamento semelhante foi observado em relação à fragilidade dos eritrócitos após a incubação do sangue com AuNPs-GA, GA e água destilada (controle). Além disso, não observou-se diferença significativa entre os eritrócitos tratados em comparação com o respectivo controle (água destilada) ($p > 0,05$). Isso sugere que o tratamento dos eritrócitos com as amostras estudadas não desestabilizou sua membrana plasmática.

A ausência de efeitos tóxicos detectáveis nos glóbulos brancos e vermelhos evidencia a natureza hemocompatível da GA aliadas com as AuNPs, o que é um pré-requisito importante para estudos biomédicos futuros. O comportamento observado pode ser atribuído à biocompatibilidade exibida naturalmente pelos AuNPs e também à abordagem da síntese verde, que não utiliza reagentes potencialmente tóxicos para a produção de nanopartículas. Ressalta-se ainda que este estudo é importante para futuras aplicações do eletrodo modificado com as AuNPs-GA em sistemas de detecção em amostras sanguíneas.

Figura 36 - Efeito das AuNPs-GA e da GA na fragilidade osmótica de eritrócitos humanos (os valores médios de absorvância foram obtidos de três experimentos independentes realizadas em duplicata e são proporcionais às células lisadas e à hemoglobina liberada).



4.2 UM NOVO SENSOR ELETROQUÍMICO PARA O AGENTE ANTI-TUMORAL 5-FLUOROURACIL BASEADO EM UM ELETRODO DE PASTA DE CARBONO MODIFICADO COM AgNPs ESTABILIZADAS EM EXTRATO DE *Garcinia Cochinchinensis*

4.2.1 Síntese e Caracterização das AgNPs-GAR

Para realizar a síntese, adicionou-se uma alíquota da solução estoque de GAR (2 mg mL⁻¹) sobre um volume apropriado de AgNO₃ (10 mmol L⁻¹) e H₂O destilada, de modo que as concentrações finais na mistura reacional fossem de 0,1 mg mL⁻¹ de GAR e 0,5 mmol L⁻¹ para o AgNO₃. Tais concentrações foram baseadas em estudos prévios de otimização. Visualmente, a formação das AgNPs empregando-se o extrato de GAR foi indicada pela mudança na coloração da solução de incolor (característica da solução de AgNO₃) para amarelo, coloração característica das AgNPs em suspensão. A suspensão obtida está mostrada na Figura 37.

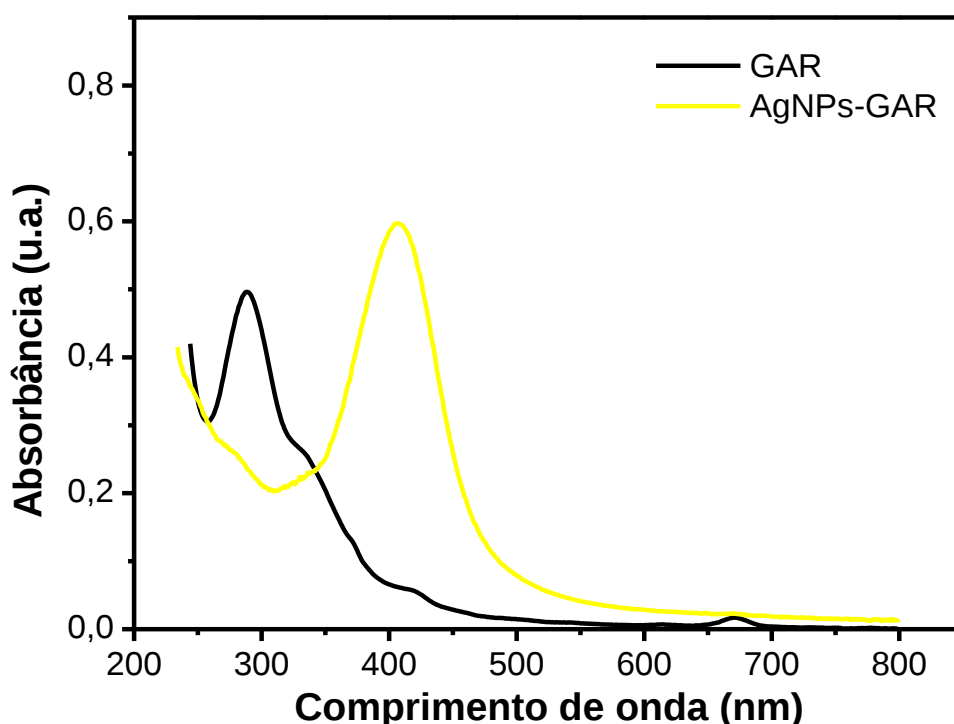
Figura 37 - Suspensão de AgNPs-GAR



Os espectros de absorção na região do UV-VIS das AgNPs-GAR sintetizadas e da solução de GAR são mostrados na Figura 38. A suspensão de AgNPs-GAR exibiu uma banda em 407,40 nm, a qual pode ser atribuída ao efeito de RPS das AgNPs (banda plasmon), sugerindo a presença das AgNPs. Também pode-se observar uma banda de absorção característica de flavonóides (TSIMOGIANNIS, et al, 2007; MARKHAM; MABRY, 1975),

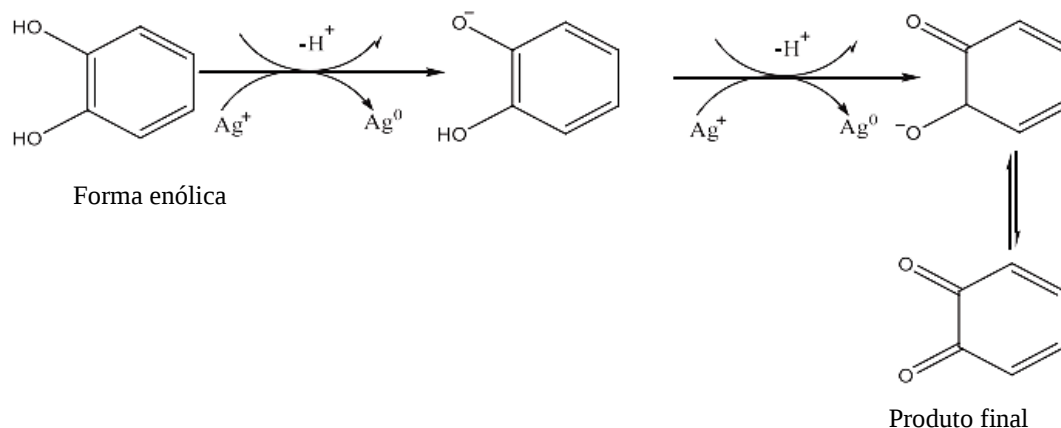
em 290 nm no espectro da solução de GAR (referente a transições eletrônica π - π^*), corroborando com a caracterização prévia do referido extrato. É possível observar um decréscimo desta banda com a formação das AgNPs. O espectro da solução de AgNO_3 não apresenta absorção nesta faixa de comprimento de onda (não mostrado).

Figura 38 – Espectros de absorção na região do UV-VIS da suspensão de AgNPs-GAR e da solução de GAR 0,25 mg mL^{-1} .



A GAR atua simultaneamente como agente redutor e estabilizante na síntese de nanopartículas de prata. A redução dos íons Ag^+ a Ag^0 (na forma de AgNPs) pela GAR ocorre uma vez que a GAR possui elevadas concentrações de benzofenonas poliisoprenadas e biflavonóides. Tais compostos possuem em sua estrutura grupos O-H, passíveis de sofrer oxidação e promover, assim, a redução da Ag^+ . O mecanismo apresentado na Figura 39 demonstra como a forma enólica, presente nos biflavonóides encontrados na estrutura do extrato de GAR, atua na redução dos íons Ag^+ . O produto final é um composto estábilizado por ressonância. O pH básico da síntese favorece o equilíbrio da reação no sentido da formação do produto final, por desprotonação da forma enólica.

Figura 39 – Mecanismo da oxidação da forma enólica presente na estrutura da GAR

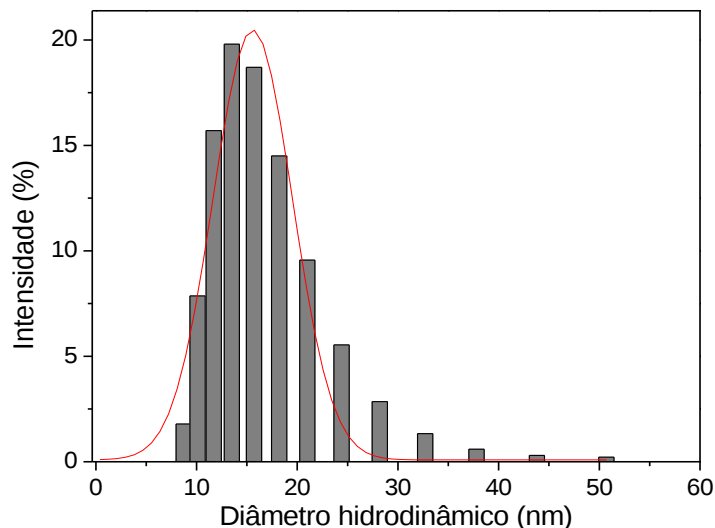


Fonte: Adaptado de Ravichandran et al, 2019

Uma vez formadas, pode-se assumir que as AgNPs são envolvidas e estabilizadas pelas moléculas orgânicas existentes na estrutura da GAR. Esta estabilização pode ser resultante, principalmente, de uma combinação de efeitos estéricos e eletrostáticos (estabilização eletrostérica). Os efeitos estéricos podem ser relacionados ao volume das moléculas orgânicas que envolvem cada partícula, ao passo que os efeitos eletrostáticos relacionam-se à repulsão existente entre os grupos COO^- formados a partir da redução da prata. Assim, a combinação destes dois efeitos permitiu que a estabilização das partículas recém-formadas fosse alcançada, o que impediu que as mesmas sofressem coalescência.

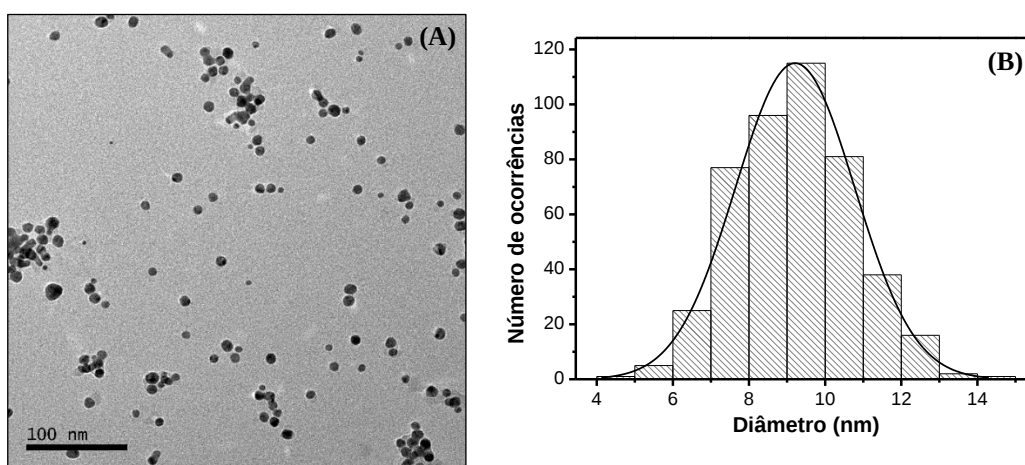
O perfil de distribuição de tamanho de partículas da suspensão de AgNps-GAR sintetizada obtido por DLS (Figura 40) revelou uma distribuição unimodal com um diâmetro hidrodinâmico médio de $17,09 \pm 2,80$ nm.

Figura 40 - Distribuição de tamanho de partículas obtida por DLS para as AgNPs-GAR



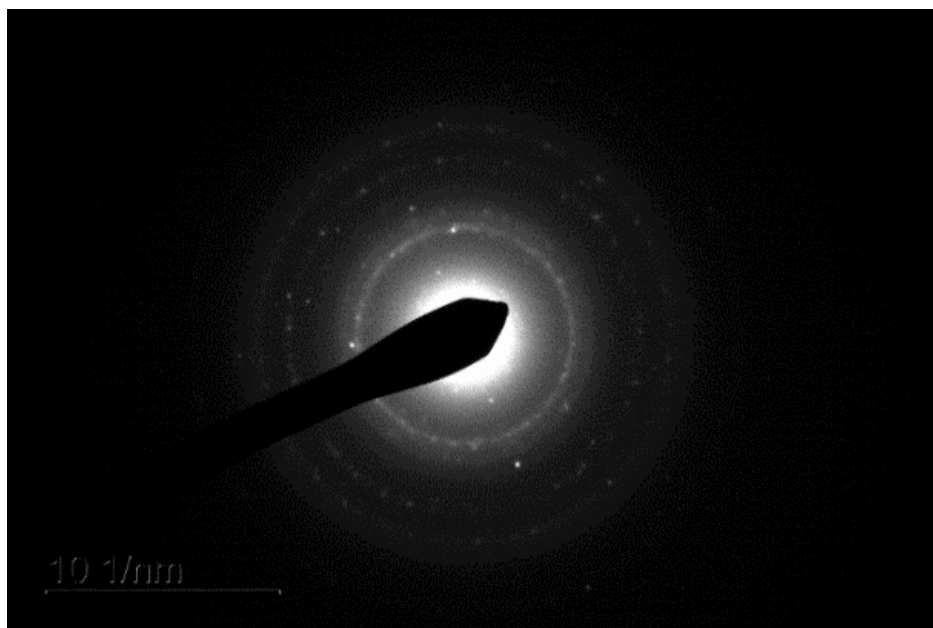
A morfologia e tamanho de partícula do AgNPs-GAR foram posteriormente determinados por análise de TEM (Figura 41 A). O histograma de distribuição de tamanho (obtido pela contagem de 450 partículas encontradas em áreas das micrografias arbitrariamente escolhidas, Figura 41 B) revelou que o tamanho das AgNPs-GAR sintetizadas variaram no intervalo de 4,0 – 15,0 nm, com um tamanho médio de partícula de $9,20 \pm 1,5$ nm.

Figura 41 – (A) Micrografias obtidas na análise de TEM para as AuNPs-GAR (B) Histograma de distribuição de diâmetro das AgNPs-GAR.



A área selecionada de difração de padrão de elétrons (SAED) revelou a presença de halos brilhantes, indicando a natureza cristalina dos AgNPs-GAR (Figura 42). Os halos podem ser atribuídos aos planos (111), (200), (220) e (311) da estrutura cristalina cúbica de face centrada da prata. (SINGH; SINGH; DU, 2017)

Figura 42 - A área selecionada de difração de padrão de elétrons das AgNPs-GAR



Para se estudar a existência de interações entre a GAR e as AgNPs, a espectroscopia de FTIR foi empregada. Os espectros de FTIR de filmes *cast* de uma solução de GAR 2 mg mL^{-1} e do nanocompósito AgNPs-GAR são mostrados na Figura 43, com as atribuições relativas listadas na Tabela 14.

Figura 43 – Espectros vibracionais na região do infravermelho de filmes *cast* de GAR 2 mg mL⁻¹ e das AgNPs-GAR sobre substratos de silício.

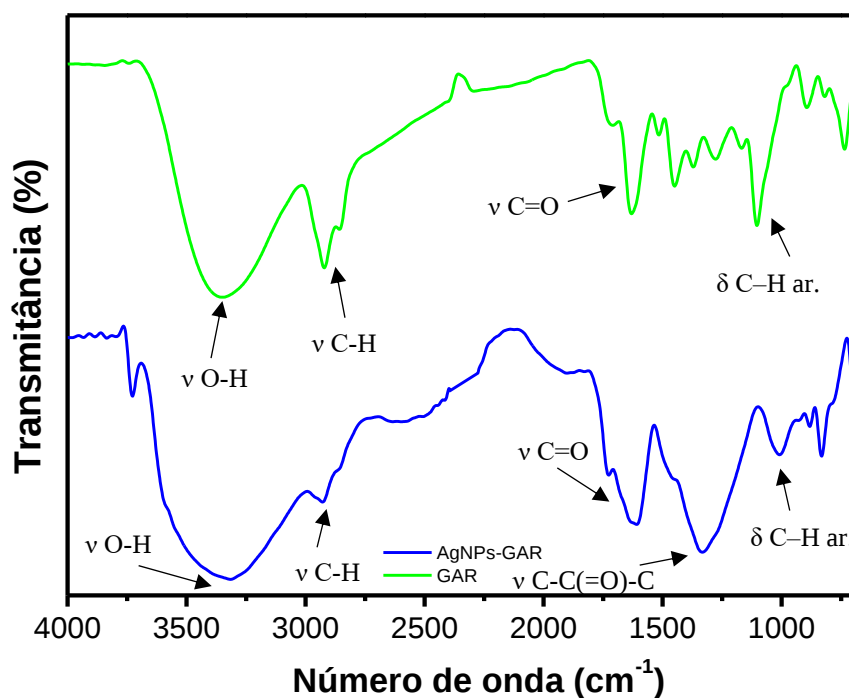


Tabela 14 – Principais bandas observadas no espectro de FTIR para filmes *cast* de GAR (2 mg mL⁻¹) e de AgNPs-GAR, com as respectivas atribuições.

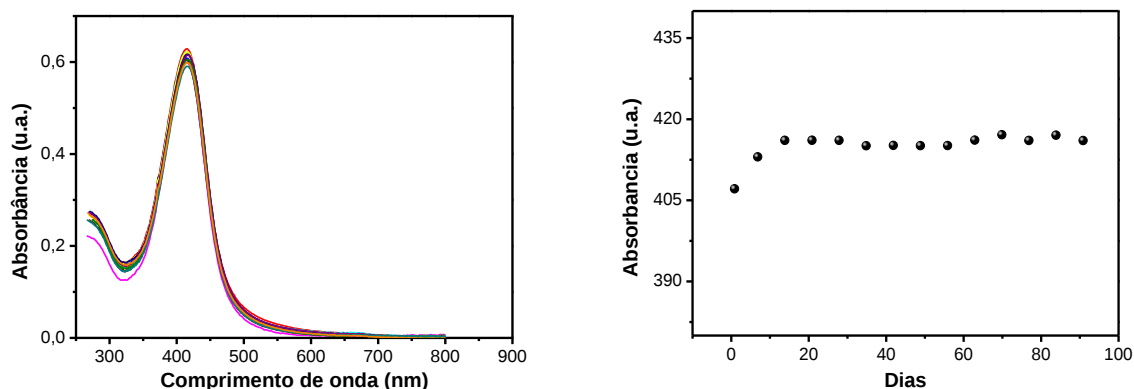
Número de onda (cm ⁻¹)		Modos
GAR	AgNPs-GAR	Vibracionais
(PRETSCH; BÜHLMANN; BADERTSCHER, 2009; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005),		
3352	3309	ν O-H
2929	2926	ν C-H
1633	1612	ν C=O
-	1348	ν C-C(=O)-C
1103	1008	δ C-H ar.

*ν: deformação axial; δ: deformação angular; as: assimétrica.

Verifica-se que as bandas apresentadas pelas AgNPs-GAR podem ser atribuídas às mesmas vibrações apresentadas pela estrutura da GAR. Entretanto, deslocamentos nos valores de frequência podem ser observados, evidenciando que existem interações entre a GAR e as AgNPs. (BALAVANDY et al., 2014; MAITY; SEM; ISLAM, 2012). Verificou-se um deslocamento relativamente grande para as bandas referentes aos grupos O-H, evidenciando que os mesmos podem estar envolvidos no processo de formação das AgNPs-GAR. (VENKATPURWAR; SHIRAS; POKHARKAR; 2011). Constatou-se também no espectro obtido para as AgNPs-GAR o surgimento de uma banda de alta intensidade em 1348 cm^{-1} , que pode ser atribuída à vibração de estiramento do grupo C-C(=O)-C de cetonas (PAVIA et al., 2009; PRETSCH; BÜHLMANN; BADERTSCHER, 2009; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005), que são produtos da reação de redução da Ag^+ a AgNPs, conforme foi apresentado anteriormente.

O potencial zeta de AgNPs-GAR foi igual a - 42,60 mV, o que indica que as nanopartículas foram adequadamente estabilizadas com a GAR, além de apresentarem carga negativa. A carga negativa deve-se a aderência de íons NO_3^- provenientes do precursor metálico utilizado para a síntese na superfície das AgNPs-GAR. A estabilidade a longo prazo das AgNPs-GAR foi avaliada por análise de espectroscopia UV-VIS, com medições periódicas sendo realizadas na mesma suspensão. Como pode ser observado nas Figuras 44A e 44B, não houveram variações significativas na forma da banda plasmon e nos valores de absorbância ao longo de três meses. Portanto, os resultados sugerem que as AgNPs-GAR, no período analisado, permaneceram estáveis em suspensão, corroborando com o resultado obtido na análise do potencial zeta. Assim, a eficiência do extrato de GAR como agente estabilizante das partículas sintetizadas foi confirmada.

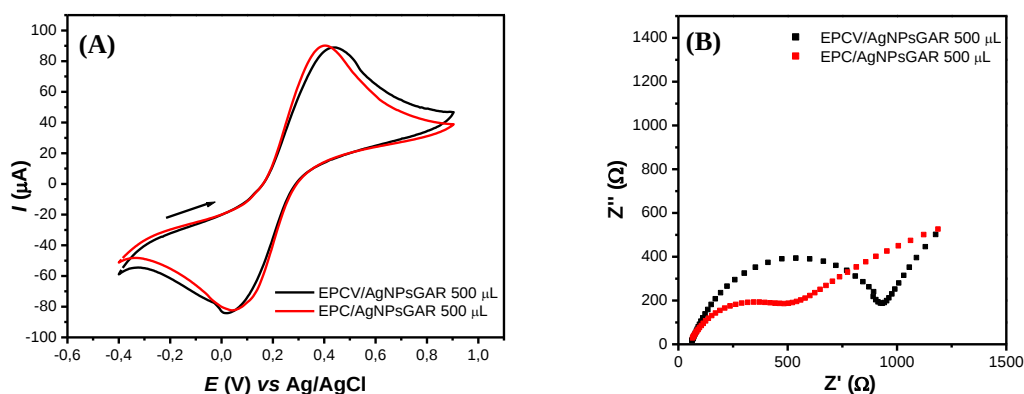
Figura 44 – (A) Espectros de absorção na região do UV-VIS da suspensão de AgNPs-GAR ao longo de 90 dias. (B) Correlação entre os máximos de absorbância e o número de dias.



4.2.2 Caracterização Eletroquímica do EPC Modificado com AgNPs-GAR (EPC/AgNPs-GAR)

Inicialmente, realizou-se um estudo comparativo 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), ambos modificados com 500 μL de AgNPs-GAR, utilizando-se VC e EIE, na presença da sonda eletroquímica $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 45.

Figura 45 – (A) Voltamogramas cíclicos e (B) espectros de impedância eletroquímica (diagramas de Nyquist) do EPC-grafite e do EPCV, ambos modificados com 500 μL de AgNPs-GAR, 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).



Pode-se verificar na Figura 45 que ambos os eletrodos apresentaram picos de corrente para o processo redox típico da sonda eletroquímica ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-} \rightleftharpoons \text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$). Apesar das diferenças nos valores de corrente não serem acentuadas comparando-se o EPCV e o EPC

modificados com as nanopartículas, o EPC/AgNPs-GAR apresentou um menor valor de separação entre os potenciais de pico (ΔE_p) em comparação ao observado para este último (Tabela 15), sugerindo que cinética de transferência eletrônica é mais efetiva no EPC/AgNPs-GAR, o que resultou em uma maior condutividade e também em uma maior reversibilidade para o processo (BRETT; BRETT, 1993). Verifica-se também que o diâmetro do semicírculo obtido para o EPC/AgNPs-GAR foi menor do que o obtido é para o EPCV/AgNPs-GAR, indicando que a resistência à transferência de carga para o grafite incorporado com o nanomaterial foi menor comparada ao observado para o carbono vítreo. Uma possível explicação para tal comportamento é que a suspensão de AgNPs-GAR foi capaz de melhorar as propriedades eletroquímicas da pasta de grafite, entretanto, aumentaram a resistência a transferência de carga do EPCV. O EPCV sem modificação já possuiu um desempenho eletroquímico satisfatório devido a elevada reatividade eletroquímica das esferas de carbono vítreo (WANG, J. et al., 2001). Provavelmente, as AgNPs-GAR não se incorporaram eficientemente à pasta de carbono vítreo e prejudicaram a resposta do eletrodo. Justifica-se, portanto, a utilização do grafite para a fabricação dos eletrodos no presente capítulo.

Tabela 15 – 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	R_{ct} (Ω)
EPC/AgNPs-GAR	81,30	67,82	400	633	233	718,99
EPCV/AgNPs-GAR	76,57	68,21	430	23	407	795,81

Realizou-se uma comparação por VC e EIE, na presença da sonda eletroquímica, entre o EPC/AgNPs-GAR, o EPC e um eletrodo modificado apenas com a solução de GAR (EPC/GAR). Os resultados encontram-se nas Figuras 46A e 46B, enquanto que os parâmetros eletroquímicos obtidos a partir dos gráficos de VC e EIE estão descritos na Tabela 16.

Figura 46 – (A) Voltamogramas cíclicos e (B) Espectros de impedância eletroquímica do EPC/AgNPs-GAR, EPC/GAR e EPC 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).

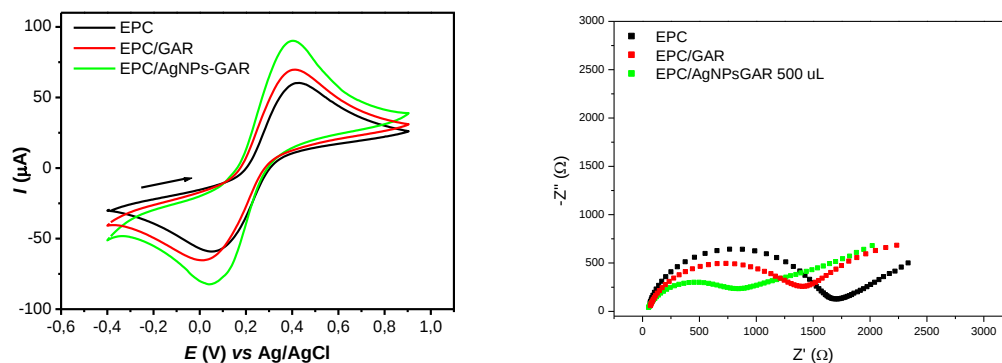


Tabela 16 – Valores de I_{pa} , I_{pc} , ΔE_p e R_{ct} obtidos para o EPC, para o EPC/GAR e para o EPC/AgNPs-GAR

Eletrodo	I_{pa} (μA)	$-I_{pc}$ (μA)	E_{pa} (mV)	E_{pc} (mV)	ΔE_p	R_{ct} (Ω)
EPC	54,59	48,30	420	582	162	1587,50
EPC/GAR	63,85	50,79	415	129	286	1344,00
EPC/AgNPs-GAR	81,30	67,82	400	633	233	718,99

Todos os eletrodos estudados apresentaram um processo quasi-reversível típico do $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$. O EPC/AgNPs-GAR apresentou maiores respostas de corrente, além de um menor valor de R_{ct} , em comparação ao comportamento observado para o EPC e para o EPC/GAR. Apesar do valor de ΔE_p apresentado pelo EPC/AgNPs-GAR ser maior que o valor apresentado pelo EPC não modificado, pode-se inferir que a incorporação das nanopartículas sintetizadas melhoram o desempenho eletroquímico do EPC uma vez que proporcionaram uma maior sensibilidade ao eletrodo (o que pode ser observado pelos maiores valores de corrente) bem como uma menor resistência a transferência de carga (verificado pelo menor valor de R_{ct}). Esse incremento na resposta eletroquímica do EPC após a incorporação das AgNPs-GAR na pasta de grafite pode ser atribuído às propriedades características dos AgNPs, como alta condutividade e alta área superficial, provenientes das nanopartículas. (FEKRY, 2017). Portanto, a modificação dos eletrodos com as nanopartículas sintetizadas é um procedimento vantajoso para a aplicação do mesmo como sensor eletroquímico. Pode-se observar também que somente a incorporação da GAR na pasta de grafite ocasionou em um ganho de corrente. Uma possível justificativa para este comportamento pode ser dada com base no fato de que a modificação da pasta com a GAR pode proporcionar ao material um maior caráter hidrofílico.

Conforme já foi dito anteriormente, o extrato da GAR foi caracterizado por possuir uma elevada quantidade de benzofenonas poliisoprenadas e biflavonóides e tais compostos apresentam em sua estrutura uma grande quantidade de hidroxilas. Assim como foi apresentado para a GA (cuja estrutura polissacarídica também exibe hidroxilas) a presença de tais grupos pode ter modificado as propriedades interfaciais da superfície do eletrodo, de modo a favorecer a aproximação da sonda eletroquímica, favorecendo o processo de transferência de elétrons. (RICE; GALUS; ADAMS, 1983).

Os resultados obtidos para a determinação aproximada das áreas eletroativas dos eletrodos estudados são apresentados na Tabela 17. As áreas eletroativas estimadas são apresentadas em cada caso como uma média obtida a partir de três replicatas.

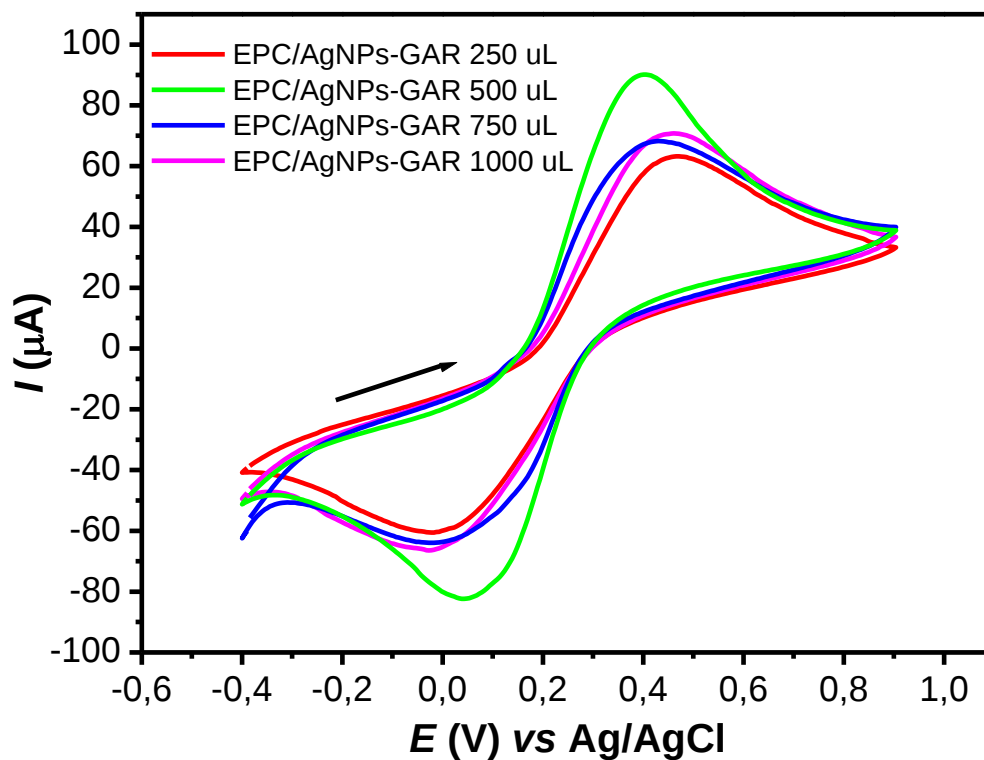
Tabela 17 – Valores médios da área eletroativa estimados do EPC não modificado, EPC/GAR e EPC/AgNPs-GAR (n = 3 para cada um dos eletrodos).

Eletrodo	- I_{pc} (μA)	Área eletroativa estimada (cm^2)
EPC não modificado	$43,22 \pm 1,27$	$0,052 \pm 1,30$
EPC/GAR	$45,48 \pm 0,57$	$0,054 \pm 0,60$
EPC/AgNPs-GAR	$47,91 \pm 0,33$	$0,057 \pm 0,33$

O valor da I_{pc} , e consequentemente o da área eletroativa, aumentou na ordem $EPC < EPC/GAR < EPC/AgNPs-GAR$. A maior área obtida para o EPC/GAR em comparação ao EPC pode ser uma consequência da superfície mais hidrofílica dos eletrodos modificados apenas com a GAR, a qual pode ter proporcionado um aumento na quantidade de sítios eletroativos em relação ao EPC, cuja superfície é apolar. Uma maior área foi observada para o EPC/AgNPs-GAR. Provavelmente, isso é devido ao efeito da presença das AgNPs na superfície eletródica. Apesar de ter sido observado um aumento na área, é possível afirmar que este não foi significativo e não é o responsável pela melhor resposta do EPC/AgNPs-GAR.

A fim estudar a influência que a quantidade de AgNPs-GAR presente exerce sobre a resposta do EPC, foi realizado um estudo com diferentes volumes de AgNPs-GAR (250, 500, 750 e 1000 μL) adicionados em uma massa fixa de 50,0 mg de grafite em pó. Os estudos foram realizados na presença de $10,0 \text{ mmol L}^{-1} [Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$, com solução tampão de $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ PBS como eletrólito de suporte. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 47.

Figura 47 – Voltamogramas cíclicos do EPC com diferentes volumes of AgNPs-GAR (250; 500; 750 e 1000 μL), na presença de tampão PBS 0,15 mol L^{-1} (pH 7,4) contendo 10,0 mmol L^{-1} $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ e $v = 50,0 \text{ mV s}^{-1}$)



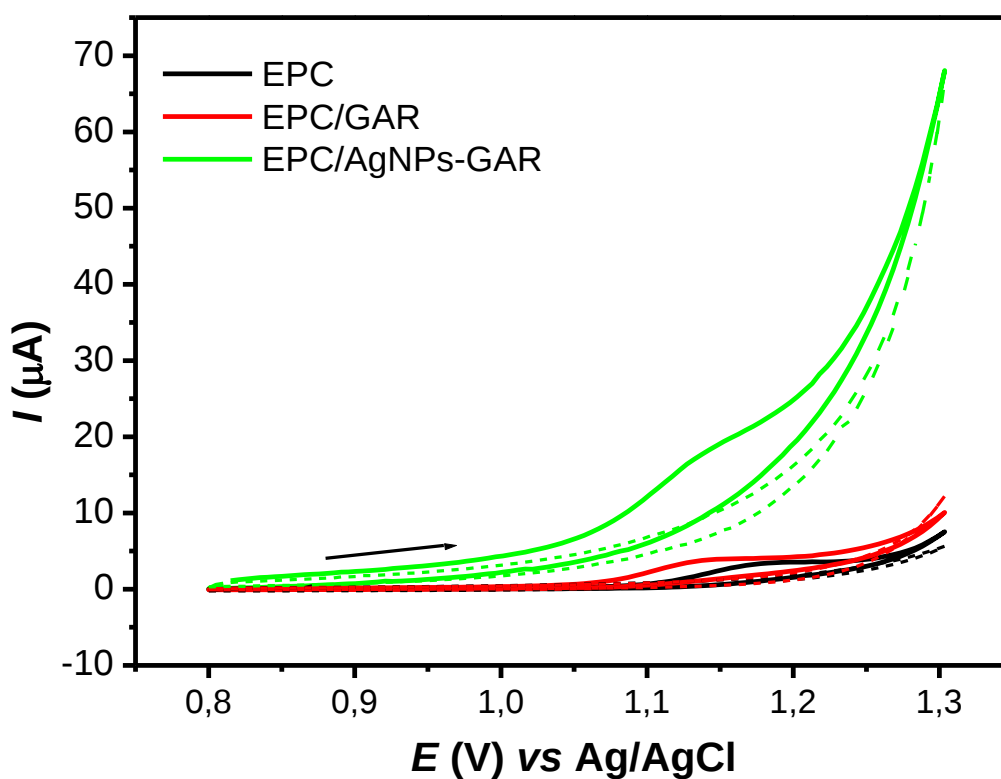
Como pode ser observado na Figura 47, a corrente de pico aumentou até 500 μL e, em seguida, foi observada uma diminuição acentuada da mesma. Conforme já foi observado anteriormente para o EPCV/AuNPs-GA, o aumento da quantidade de nanopartículas adicionadas pode ser prejudicial a performance do eletrodo, uma vez que pode ocorrer a agregação das mesmas na pasta. Consequentemente, as nanopartículas adicionadas perdem suas propriedades condutoras, além de diminuir a área superficial das mesmas. Assim, a corrente de pico também diminui. (OREN; ANIK, 2017; ÇUBUKÇU;TIMUR; ANIK,2007). Portanto, 500 μL de AgNPs-GAR foram empregados para a confecção dos eletrodos nos estudos subsequentes.

4.2.3 Determinação eletroanalítica do 5-Fluorouracil (5-FU)

4.2.3.1 Comportamento voltamétrico

A fim de se verificar a eletroatividade do analito 5-FU sobre os eletrodos, estudos foram conduzidos por VC, empregando uma concentração fixa de 5-FU igual a $4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, 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 48.

Figura 48 – Voltamogramas cíclicos do EPC, do EPC/GAR e do EPC/AgNPs-GAR na presença de $4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de 5-FU, em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 8,0. As linhas pontilhadas representam os voltamogramas dos mesmos eletrodos na ausência dos analitos ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$).

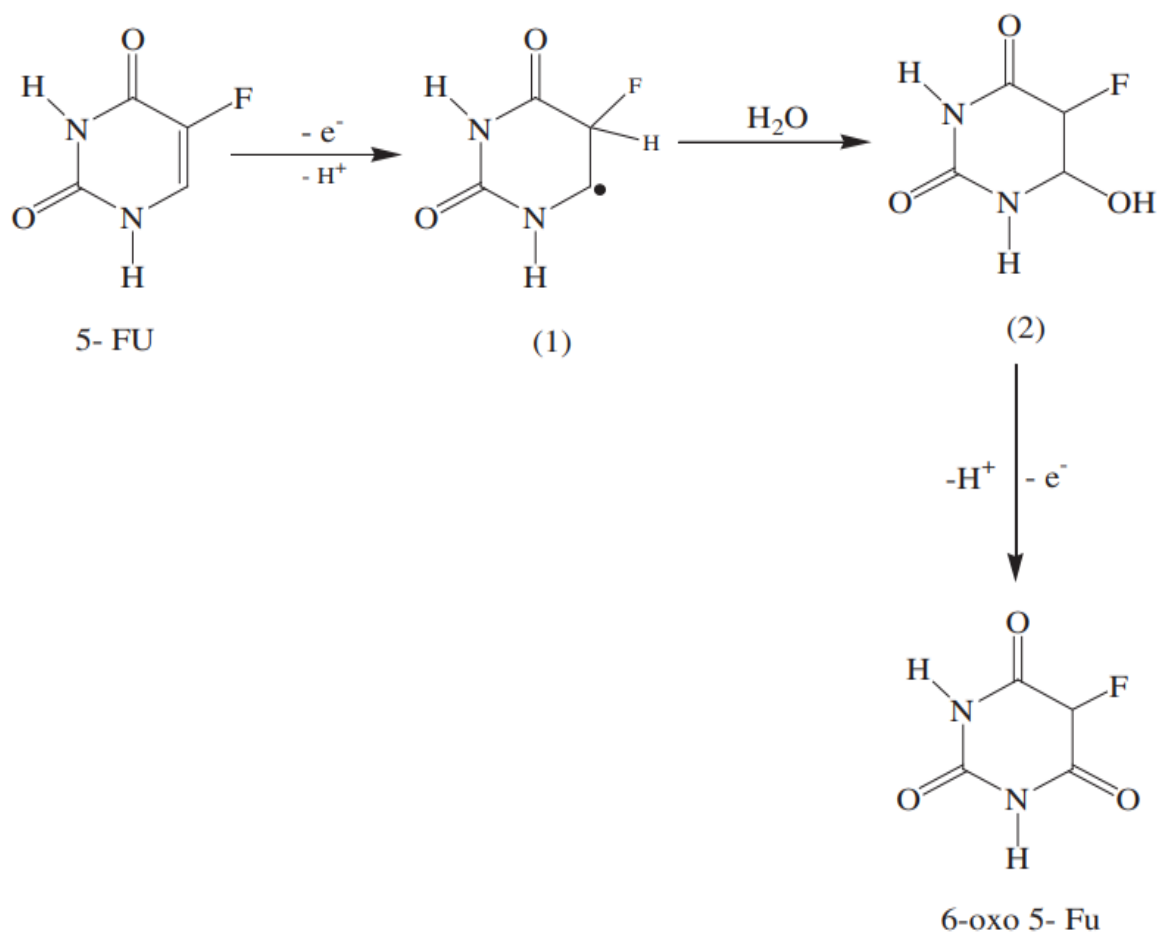


Na ausência do analito, não são observados picos de corrente para nenhum dos eletrodos estudados. Isto evidencia que os mesmos não apresentam resposta eletroquímica na faixa de potencial estudada, exibindo apenas corrente capacitiva. Na presença de 5-FU, um pico anódico foi observado para todos os eletrodos, correspondendo ao processo de oxidação do fármaco na superfície dos mesmos. Como nenhum processo catódico foi observado nas varreduras

voltamétricas reversas, pode-se considerar que a oxidação do 5-FU como um processo irreversível. Observou-se também que a oxidação do 5-FU ocorre em aproximadamente 1,15 V. 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).

O provável mecanismo para a oxidação eletroquímica do 5-FU é mostrado na Figura 49. De acordo com Bukkitgar e Shetti (2016), a eletrooxidação do 5-FU procede-se com a remoção de dois elétrons e dois prótons. Na primeira etapa, há a remoção de um elétron do anel, dando origem ao produto 1, que é instável e prontamente converte-se no produto 2 pelo ataque de moléculas de H_2O . Posteriormente, há a remoção de um elétron e um próton, dando origem ao produto final da reação.

Figura 49 – Mecanismo do processo de oxidação eletroquímica do 5-FU sobre os eletrodos estudados.



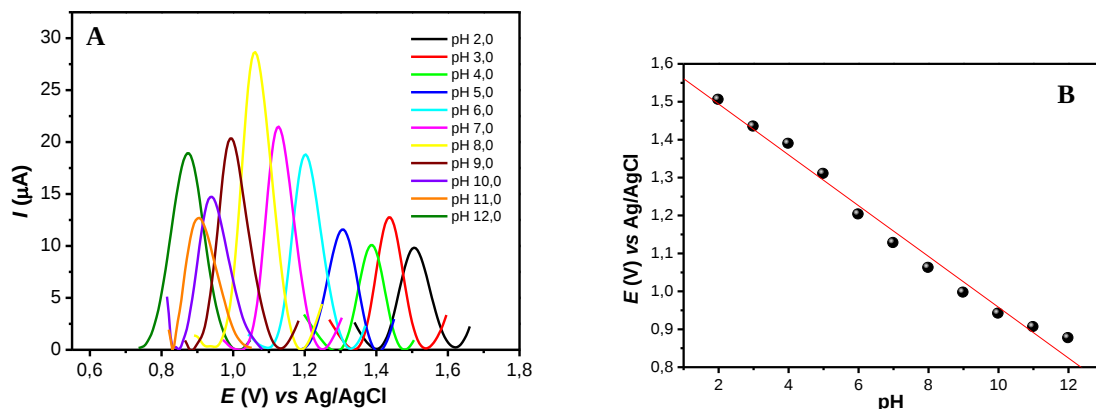
Fonte: Bukkitgar; Shetti, 2016.

Como pode ser verificado na Figura 48, o pico de corrente para a oxidação de 5-FU no EPC/AgNPs-GAR (11,77 μA) foi maior em comparação aos mostrados no EPC/GAR (3,02 μA) e no EPC não modificado (2,74 μA). Além disso, o potencial de pico anódico observado para EPC/AgNPs-GAR ($E_{\text{pa}} = 1,13\text{V}$) foi inferior aos valores correspondentes observados para EPC/GAR ($E_{\text{pa}} = 1,16\text{V}$) e para o EPC ($E_{\text{pa}} = 1,19\text{V}$). O aumento nos valores de corrente e a diminuição no potencial de oxidação são evidências do efeito eletrocatalítico causado pelas AgNPs-GAR, 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 AgNPs, aliada ao aumento na área eletroativa (valores que foram estimados previamente e calculados em 0,052, 0,054 e 0,057 cm^2 para o EPC, EPC/GAR E EPC/AgNPs-GAR, respectivamente) proporcionado pela incorporação de tais nanoestruturas aos eletrodos.

4.2.3.2 Influência do pH na resposta voltamétrica da 5-FU

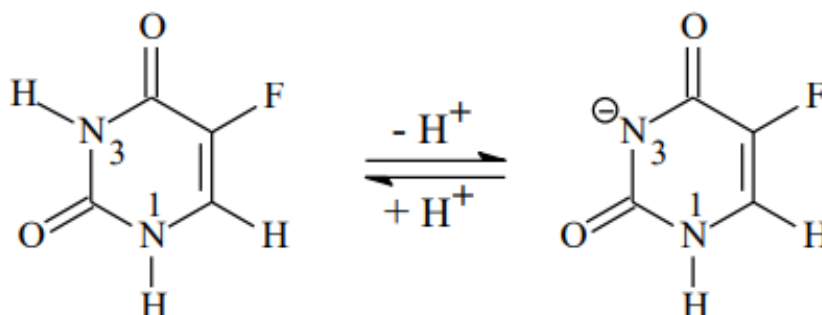
Uma vez que há prótons envolvidos no mecanismo de oxidação eletroquímica do 5-FU, é possível inferir que o pH do meio terá influência direta sobre a resposta do EPC/AuNPs-GAR na presença do analito. A fim de que esta influência fosse avaliada, e para que se encontrasse um valor de pH ótimo para as análises seguintes, estudos por meio de VOQ com o EPC/AgNPs-GAR foram realizados na presença de $4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de 5-FU utilizando-se o tampão BR 0,04 mol L^{-1} como eletrólito de suporte, variando o valor de pH na faixa de 2,0 a 12,0. Os voltamogramas obtidos, assim como a relação de E_{pa} em função do valor de pH são mostrados na Figura 40.

Figura 50 – (A) Voltamogramas de onda quadrada do EPC/AgNPs-GAR 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 12,0. (B) Relação de E_{pa} em função do pH obtidas a partir dos voltamogramas.



Pode-se observar na Figura 50A 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. Verificou-se que a corrente gerada pela oxidação do 5-FU sobre o EPC/AgNPs-GAR seguiu uma tendência de aumento do pH 4,0 até pH 8,0, onde atinge um valor máximo, e em seguida apresenta uma queda 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 51. A desprotonação em N_1 também pode ocorrer, sendo observada em valores de pH acima de 13,0. (PENDEKAL; TEGGINAMAT, 2012).

Figura 51 – Desprotonação do 5-FU



Fonte: Adaptado de JANG et al., 2001.

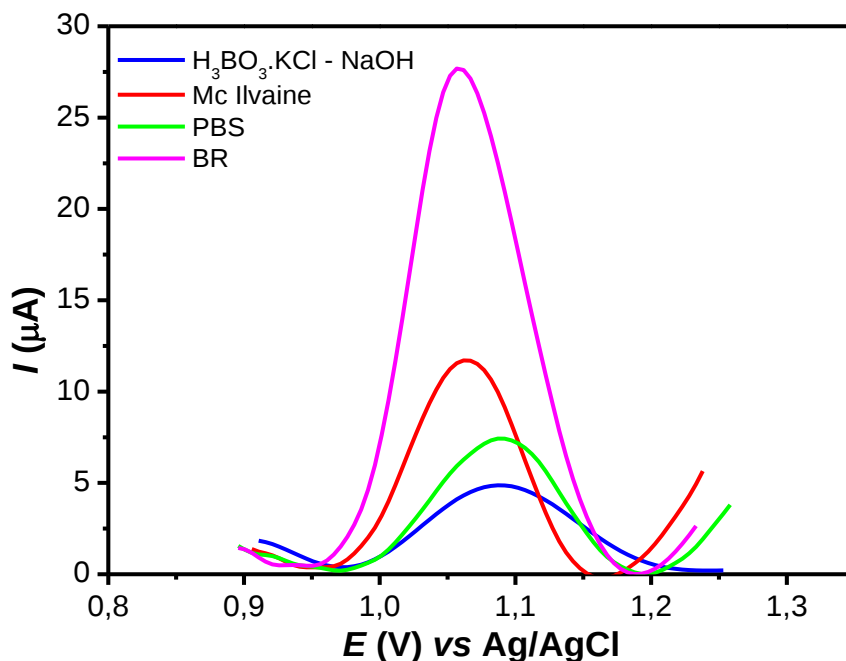
Verificou-se na Figura 50B que houve um deslocamento no valor de E_{pa} para valores menos positivos com o aumento do pH do eletrólito suporte. Este deslocamento pode ser justificado com base no fato de que prótons estão envolvidos na reação de oxidação do 5-FU. Segundo o mecanismo apresentado na Figura 49, a segunda etapa da oxidação ocorre com a remoção de 1 próton do intermediário designado como (2). Neste sentido, pode-se afirmar que em pHs mais básicos tal desprotonação ocorre mais facilmente, como consequência deste fato, o analito será oxidado em um potencial mais baixo. Em pHs ácidos um comportamento contrário é observado 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 $-66,0 \text{ mV pH}^{-1}$ ($E_{pa} \text{ (vs. Ag/AgCl)} = 1,63 - 0,066 \text{ pH}$, $R = -0,991$). 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. (KISSINGER; HEINEMAN, 1996).

4.2.3.3 Influência do eletrólito suporte

Como a reação de oxidação do 5-FU apresentou dependência em relação ao pH, foram escolhidos quatro meios tamponantes para serem testados, todos com pH ajustado para 8,0, os quais foram: tampão PBS $0,15 \text{ mol L}^{-1}$, tampão McIlvaine, tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, tampão $\text{H}_3\text{BO}_3\text{.KCl} - \text{NaOH}$ e tampão fosfato. Os voltamogramas cíclicos obtidos com o EPC/AgNPs para $4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de 5-FU são mostrados na Figura 52.

Figura 52 – Voltamogramas de onda quadrada do EPC/AgNPs-GAR na presença de $4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de 5-FU, em diferentes tipos de solução tampão, em pH 8,0



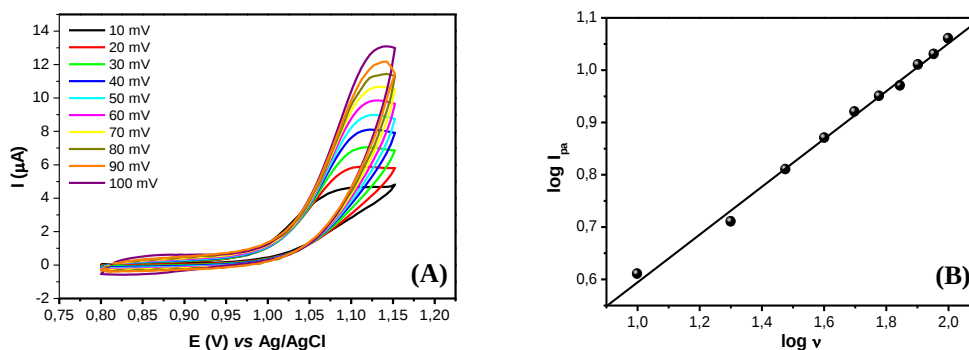
Uma vez que pequenos deslocamentos de potencial e diferenças na magnitude da I_{pa} foram observados comparando-se os diferentes eletrólitos testados, verificou-se pela Figura 39 que a natureza do eletrólito influenciou a resposta do EPC/AgNPs-GAR para o 5-FU. A partir deste estudo, observou-se que o tampão BR apresentou o melhor desempenho, uma vez que exibiu um maior valor de corrente frente aos demais eletrólitos testados (tampão McIlvaine = 11,70 µA; tampão H₃BO₃.KCl = 4,87 µA; tampão PBS = 7,42 µA; tampão BR = 27,70 µA). Além disso, o tampão BR apresentou um deslocamento de potencial para valores mais negativos. Assim, selecionou-se o tampão BR (em pH 8,0) para todas as análises subsequentes.

4.2.3.4 Influência da velocidade de varredura

Com a finalidade de se determinar a natureza do transporte de massa envolvido na reação de oxidação do 5-FU sobre o EPC/AgNPs-GAR, 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 mol L⁻¹ em pH 8,0. Conforme já discutido anteriormente no estudo de velocidade de varredura realizado para o EPCV/AuNPs-

GA na presença da PMZ, utilizou-se da relação do duplo logaritmo para se estimar o mecanismo de transporte de massa envolvido. Os voltamogramas obtidos bem como a relação do duplo logaritmo são apresentados na Figura 53.

Figura 53 – (A) – Voltamogramas cíclicos obtidos para o EPC/AgNPs-GAR na presença de $4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de 5-FU, em meio de tampão BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 8,0, com v variando de 10 a 100 mV s^{-1} . (B) 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: $\log(I_{pa}) = 0,137 + 0,456 \log(v)$; $R = 0,993$. Assim pode-se confirmar a natureza difusional do processo de oxidação do 5-FU sobre o EPC/AgNPs-GAR, uma vez que a inclinação da reta obtida pela regressão linear aproxima-se mais de 0,5 (valor característico para mecanismos difusionais) (BARD; FAULKNER, 2001; BRETT; BRETT, 1993), sendo este um fato favorável para a utilização deste eletrodo em aplicações quantitativas.

4.2.3.5 Otimização dos parâmetros da VOQ

Assim como foi realizado no estudo anterior para a otimização dos parâmetros da VOQ para a determinação da PMZ com o EPCV/AuNPs-GA, a fim de que uma maior intensidade de corrente fosse alcançada para a determinação da 5-FU com o EPC/AgNPs-GAR, os parâmetros instrumentais da VOQ foram otimizados por meio de um planejamento fatorial Box-Behnken com triplicata no ponto central. Empregou-se para a otimização uma concentração fixa de $4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de 5-FU, e as medidas realizadas em BR $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8,0. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 18. Os valores dos parâmetros escolhidos foram determinados a partir de estudos preliminares. Ressalta-se que entre cada medida realizou-se a limpeza da superfície do eletrodo e tais ensaios foram realizados de forma aleatória.

Tabela 18 – Coeficientes de contraste para o planejamento fatorial Box-Behnken empregado para a otimização dos parâmetros da VOQ (ΔE_s : (-) = 11 mV, (0) = 14 mV, (+) = 17 mV; a : (-) = 60 mV, (0) = 80 mV, (+) = 100 mV; f : (-) = 45 Hz, (0) = 65 Hz, (+) = 85Hz).

Ensaio	ΔE_s	a	f	I (μA)
1	-	-	0	56,38
2	+	-	0	68,26
3	-	+	0	54,44
4	+	+	0	62,50
5	-	0	-	43,47
6	+	0	-	53,70
7	-	0	+	63,55
8	+	0	+	75,36
9	0	-	-	49,60
10	0	+	-	45,74
11	0	-	+	67,81
12	0	+	+	62,86
13	0	0	0	59,62
14	0	0	0	58,72
15	0	0	0	59,27

A ANOVA (Tabela 19) do modelo matemático quadrático ao qual os dados experimentais foram ajustados evidenciou que a variância explicada pelo mesmo é bem próxima da máxima variância explicável ($R_{sqr} = 0,993980$; $R_{adj} = 0,999604$) e que a falta de ajuste não foi significativa. Os efeitos principais das variáveis estudadas foram significativos para a obtenção de um maior valor de corrente a um nível de confiança de 95%. Portanto, confirma-se que o modelo quadrático proposto pode explicar satisfatoriamente os dados experimentais obtidos, sendo capaz de prever com uma confiabilidade de 98,96% o comportamento da variável dependente (no caso, a resposta I_{pa}) frente às variáveis independentes estudadas (ΔE_s , f e a).

Tabela 19 – ANOVA obtida no tratamento estatístico dado aos resultados

Fator	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F calculado	p
ΔE_s	232,99	2	116,4948	565,967	0,001764
a	35,70	2	17,8476	86,709	0,011401
f	757,81	2	378,9038	1840,828	0,000543
Falta de ajuste	5,841	6	1,9471	9,460	0,097110
Puro erro	0,41	2	0,2058	-	-
Total	1039,60	14	-	-	-

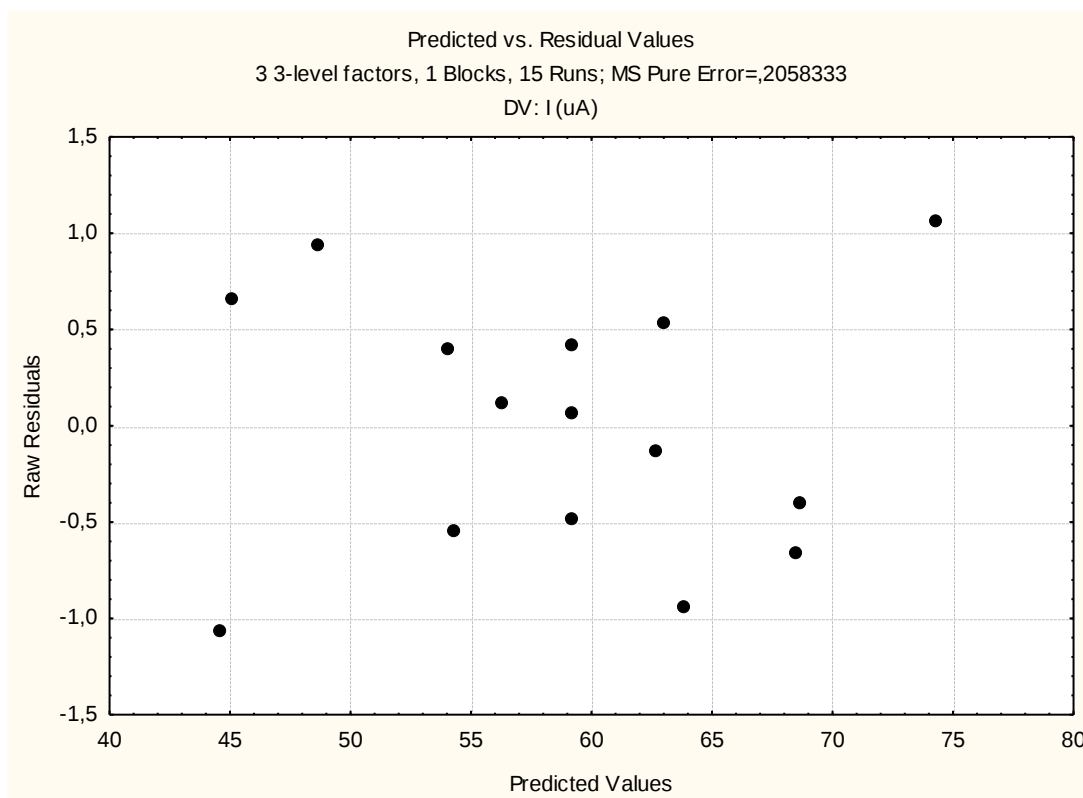
Observou-se também que o fator que possui o maior efeito na resposta de corrente é f . Tal comportamento corrobora com o encontrado na literatura, uma vez que para sistemas irreversíveis, como a eletrooxidação do 5-FU, o aumento da corrente é proporcional à frequência.

$$I_p = k_r f$$

O aumento da frequência de aplicação dos pulsos de potencial ocasiona em um aumento na resposta de corrente, com a conseqüente melhoria na sensibilidade da análise, o que pode ser um dos artifícios utilizados para se melhorar a resposta da VOQ. (SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003).

A Figura 54 apresenta a distribuição dos resíduos aleatória dos resíduos, indicando que o modelo obtido não foi tendencioso.

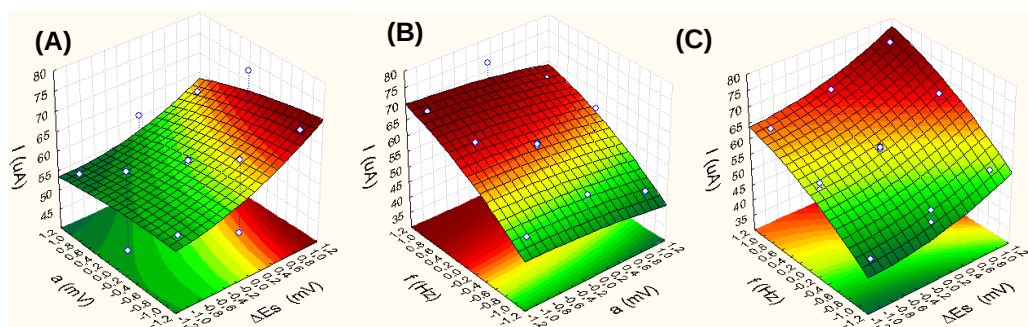
Figura 54 - Distribuição dos resíduos



O modelo matemático obtido é apresentado a seguir:

$$I (\mu A) = 59,20 + 5,25 \times \Delta E_s - 2,06 \times a + 9,63 f + 1,85 \times \Delta E_s^2 - 0,662 \times a^2 - 2,04 \times f^2 - 0,96 \times \Delta E_s \times a + 0,39 \times \Delta E_s \times f - 0,27 \times a \times f$$

As superfícies de resposta obtidas encontram-se representadas na Figura 55.

Figura 55 – Superfícies de resposta em função das variáveis (A) ΔE_s e a , (B) f e ΔE_s e (C) f e a .

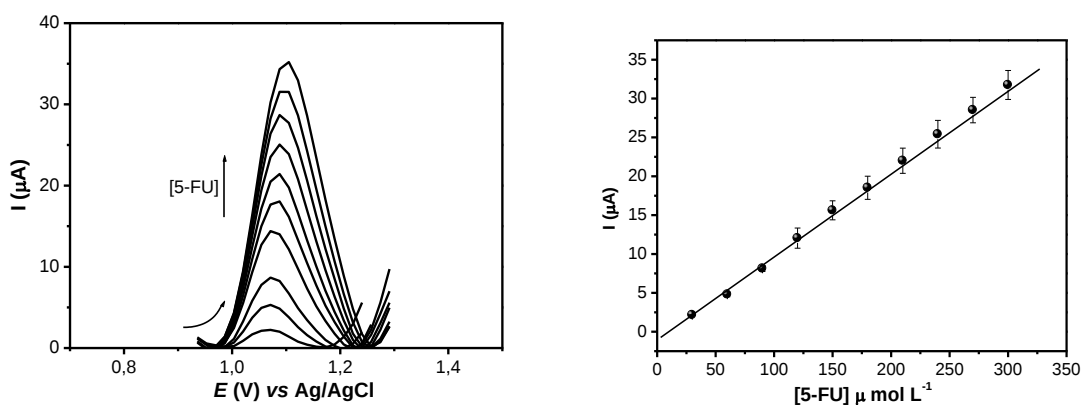
Verifica-se pela Figura 55 que, dentro do intervalo em que as variáveis ΔE_s , a e f foram avaliadas, o valor da I_{pa} passa por uma região vermelho-escuro, a qual corresponde à

região experimental de maior corrente para a determinação do 5-FU. Além disso, pode-se observar na superfície de resposta que esta região corresponde ao ensaio 8 do planejamento, o qual apresentou o maior valor de resposta de corrente (conforme pode ser observado na Tabela 14). Logo, tais condições foram adotadas como os valores ótimos, as quais são $a = 80$ mV, $f = 85$ Hz e $\Delta E_s = 17$ mV.

4.2.3.6 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 EPC/AgNps-GAR por meio de VOQ, na faixa de concentração $2,99 \times 10^{-5}$ a $2,34 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Escolheu-se esta faixa de concentração a fim de se verificar se o EPC/AgNPs-GAR era capaz de apresentar uma resposta linear de corrente em função de baixos valores de concentração do analito estudado. Foi utilizada uma solução estoque do analito de concentração $1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, com adições de alíquotas de 30 μ L à célula eletroquímica. Os resultados obtidos encontram-se mostrados na Figura 56. Para fins de comparação, curvas analíticas nas mesmas condições descritas foram construídas para o EPC não modificado e para o EPC/GAR (Tabela 20).

Figura 56 – (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos com o EPC/AgNPs-GAR 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. (B) Curva analítica obtida.



As equações das retas obtidas pela regressão linear das três curvas analíticas são mostradas na Tabela 20, juntamente com os respectivos coeficientes de correlação. 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. Os cálculos foram

realizados empregando-se a equação 14. Os resultados obtidos também se encontram na Tabela 20.

Tabela 20 – Parâmetros analíticos obtidos a partir da regressão linear das curvas analíticas para a determinação de 5-FU com o EPC não modificado, EPC/GAR e EPC/AgNPs-GAR.

Parâmetro	Eletrodo		
	EPC	EPC/GAR	EPC/AgNPs-GAR
Faixa linear estudada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	$2,99 \times 10^{-5}$ a $2,34 \times 10^{-4}$	$2,99 \times 10^{-5}$ a $2,34 \times 10^{-4}$	$2,99 \times 10^{-5}$ a $2,34 \times 10^{-4}$
Equação da reta	$I (\mu\text{A}) = -1,070 + 71996,180 [5\text{-FU}]$	$I (\mu\text{A}) = -1,192 + 74130,246 [5\text{-FU}]$	$I (\mu\text{A}) = -1,059 + 106632,08 [5\text{-FU}]$
Coefficiente de correlação (R)	0,999	0,998	0,998
LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	5,24	2,32	0,76
LQ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	15,33	7,09	2,53

A partir dos valores de LD e LQ obtidos para cada eletrodo, pode-se verificar novamente a maior sensibilidade e desempenho analítico superior do EPC/AgNPs-GAR, uma vez que valores inferiores para os dois parâmetros foram encontrados para este eletrodo frente aos demais.

Os valores de LD e LQ obtidos para o EPC/AgNPs-GAR são comparáveis aos obtidos em outros trabalhos reportados na literatura que utilizam outros métodos de análise para a determinação do 5-FU, conforme pode ser visualizado na Tabela 21. Apesar do bom desempenho analítico dos outros métodos analíticos apresentados na Tabela, 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 de alto custo de aquisição e manutenção. Em particular, as técnicas cromatográficas utilizam uma elevada quantidade de solventes orgânicos, que, se não forem corretamente descartados, podem ser prejudiciais ao meio ambiente.

Tabela 21 – Valores de LD e de LQ obtidos para a determinação de 5-FU por diferentes trabalhos reportados na literatura.

Método	Eletrodo de trabalho	LD $\mu\text{mol L}^{-1}$	LQ $\mu\text{mol L}^{-1}$	Referência
VPD ^a	GQDs-PANI/ZnONCs/GCE ^f	0,023	-	HATAMLUYI, et al, 2019
VPD	PANINTs@AgNPs PGE ^g	0,060	-	ZAHED, et al, 2018
VPD	ECV/P(BCP)/dsDNA ^h	2,38	-	ZEYBEK, et al, 2015
EC ^b	-	1,040	3,570	LIU, et al, 2018
EC	-	1,922	6,380	HURTADO- SANCHEZ, et al, 2015
HPLC ^c	-	-	7,688	SANSON, et al, 2011
HILIC ^d	-	0,0845	0,284	AMASYA, et al, 2018
LC-MS/MS ^e	-	-	0,788	LI, et al, 2018
VOQ	EPC/AgNPs-GAR	0,760	2,530	Este trabalho

^a VPD: voltametria de pulso diferencial^b EC: eletroforese capilar^c HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência^d HILIC: cromatografia líquida de interação hidrofílica^e LC-MS/MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas^f GQDs-PANI/ZnONCs/GCE: eletrodo de carbono vítreo modificado com nanocompósito de quantum dots-polianilina/óxido de zinco^g PANINTs@AgNPs PGE: eletrodo de grafite de lápis modificado com o nanocompósito AgNPs@PANINTs^h ECV/P(BCP)/dsDNA: eletrodo de carbono vítreo modificado com poly (bromocresol purple) e DNA.

2.4.3.7 Determinação de níveis de repetibilidade, reprodutibilidade e ensaios de determinação

Avaliou-se a precisão do EPC/AgNPs-GAR para a determinação do 5-FU por meio da determinação dos níveis de repetibilidade (precisão intra-corrida) e precisão intermediária (precisão inter-corrida) 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

VOQ sucessivas, nas condições experimentais otimizadas e no mesmo dia, com o EPC/AgNPs-GAR na presença de $4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de 5-FU. A precisão intermediária foi avaliada por meio da realização de cinco medidas ($n = 5$) com um mesmo EPC/AgNPs-GAR, em dias e em soluções diferentes, igualmente na presença de $4,76 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ do analito. Para a determinação da reprodutibilidade de preparação dos eletrodos, foram preparados cinco EPC/AgNPs-GAR, 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 equação 15, apresentada no capítulo 1 do presente trabalho. Os resultados para os estudos de precisão são mostrados na Tabela 22.

Tabela 22 – Resultados para repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade de preparação do eletrodo para a determinação do 5-FU com o EPC/AgNPs-GAR .

Parâmetro	% DPR
Repetibilidade	0,61%
Precisão intermediária	0,31%
Reprodutibilidade	1,02 %

Verifica-se que bons níveis de precisão foram encontrados para a determinação do 5-FU com o EPC/AgNPs-GAR em relação a resposta gerada pelos eletrodos bem como quanto a sua preparação, uma vez que os valores de DPR foram abaixo do limite aceitável máximo de 5%. (BRASIL, 2003). Tais resultados sugerem uma boa potencialidade analítica para o sensor desenvolvido.

Em seguida, ensaios de recuperação do 5-FU foram realizados utilizando-se VOQ. Empregou-se neste estudo a equação da reta da curva analítica obtida anteriormente para o EPC/AgNPs-GAR. Para tanto, foram adicionadas alíquotas consecutivas de 90, 180 e 270 μL uma solução estoque de 5-FU de concentração igual a $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, correspondendo as concentrações de 90, 180 e 270 $\mu\text{mol L}^{-1}$, na cela eletroquímica. Registrou-se o valor de corrente para cada adição e posteriormente, verificou-se a concentração obtida através da equação da reta $I (\mu\text{A}) = -1,059 + 106632,08 [5\text{-FU}]$ era próxima ao valor adicionado. Tal análise foi realizada em triplicata e em 3 dias diferentes para cada uma das concentrações estudadas. Na Tabela 23 a seguir são apresentados os valores de recuperação para cada replicata realizada,

bem como as médias obtidas nos três ensaios. Pode-se observar que os mesmos estão dentro dos padrões aceitáveis, uma vez que todos aproximaram-se do valor ideal de 100,0%, evidenciando a potencialidade de aplicação do EPC/AgNPs-GAR na determinação de 5-FU em amostras reais.

Tabela 23 – Valores de recuperação obtidos com o EPC/AgNPs-GAR na determinação do 5-FU

Adicionado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Precisão (DPR%)	Recuperação (%)
Mesmo dia			
90,00	90,20 $\pm$ 1,34	1,49	100,22
180,00	178,70 $\pm$ 0,95	0,53	99,26
270,00	270,10 $\pm$ 1,61	0,60	100,04
Dias diferentes			
90,00	93,90 $\pm$ 2,76	2,94	104,18
180,00	177,13 $\pm$ 1,62	0,91	98,40
270,00	269,86 $\pm$ 1,11	0,41	99,95

4.2.3.8 Determinação em formulação farmacêutica comercial

A aplicação do EPC/AgNPs-GAR na determinação da 5-FU em amostra de formulação farmacêutica comercial foi avaliada por meio da realização de ensaios de recuperação por VOQ empregando amostras do medicamento FAULDFLUOR® (5-fluorouracil 50 mg mL⁻¹), na forma de solução injetável. Novamente utilizou-se a equação da reta obtida anteriormente (Tabela 24). Para tanto, adicionou-se uma alíquota de uma solução estoque da formulação comercial estudada, correspondendo a concentração final de 5-FU 1,92 x10⁻⁴ mol L⁻¹. Registrou-se o valor de corrente para cada adição e posteriormente, verificou-se se a concentração obtida a partir da equação da reta $I (\mu\text{A}) = -1,059 + 106632,08 [5\text{-FU}]$ era próxima ao valor adicionado. Tal análise foi realizada em quintuplicata e os resultados obtidos encontram-se na Tabela 24.

Tabela 24 – Resultados obtidos por VOQ para o estudo de recuperação em amostra de formulação farmacêutica injetável de 5-FU empregando-se o EPC/AgNPs-GAR.

Rotulado (mg mL⁻¹)	Determinado (mg mL⁻¹)	Adicionado (mol L⁻¹) x10⁻⁴	Encontrado (mol L⁻¹) x10⁻⁴	Recuperação (%)
50,00	49,97	1,92	1,919	99,94
50,00	50,00	1,92	1,920	100,00
50,00	49,87	1,92	1,915	99,74
50,00	49,87	1,92	1,915	99,74
50,00	49,87	1,92	1,915	99,74
Média	49,87	-	1,917	99,83
DPR%	0,11	-	0,11	0,11

Uma recuperação média igual a 99,83%, com uma %DPR igual a 0,11%, foi obtida para a determinação de 5-FU na amostra analisada com o EPC/AgNPs-GAR empregando-se a técnica VOQ. Os valores de composição determinados para o medicamento a partir do 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 EPC/AuNPs-GAR 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 presente método desenvolvido constitui em uma potencial alternativa para a determinação do agente antitumoral estudado em amostras reais de medicamentos.

5 CONCLUSÕES

No presente trabalho, dois novos sensores eletroquímicos foram desenvolvidos, baseado na modificação de eletrodos de pasta de carbono com nanocompósitos constituído por nanopartículas de ouro e prata estabilizadas na goma do abacaxi e no extrato de *Garcinia cochinchinesis*, respectivamente.

A GA e a GAR foram eficientes agentes redutores (devido a presença de grupos funcionais C=O e O-H presentes nas estruturas da GA e da GAR) e estabilizantes para a formação das AuNPs e AgNPs, cujas suspensões permaneceram estáveis por mais de 60 dias, não demonstrando variações significativas da banda plasmônica durante o período estudado. A análise de TEM revelou que as AuNPs-GA e AgNPs-GAR apresentaram morfologia esférica e homogeneidade de tamanho, com diâmetros médios de partículas de $10,33 \pm 1,6$ e $9,2 \pm 1,5$ nm, respectivamente. A análise de potencial zeta revelou valores de -31 e -42,6 mV para as AuNPs-GA e AgNPs-GAR, respectivamente. Tais valores confirmaram a estabilidade de ambas as suspensões obtidas.

A modificação dos eletrodos de pasta com os nanocompósitos resultou em um incremento em suas propriedades eletroquímicas, gerando maiores valores de corrente bem como menores resistências a transferência de carga para o processo redox da sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, em comparação aos eletrodos sem modificação e aos modificados apenas com a GA ou a GAR. Este comportamento foi atribuído como consequência da combinação das propriedades proporcionadas pelas MNps (onde M=Au e Ag) aliadas aos polissacarídeos GA e GAR, como alta condutividade elétrica, elevada área superficial e mais fácil interação com as espécies redox no meio.

O EPCV/AuNPs-GA e o EPC/AgNPs-GAR foram aplicados na detecção do anti-histamínico PMZ e do antitumoral 5-Fluorouracil, respectivamente, pela técnica de VOQ. Os dois analitos estudados foram oxidados na superfície dos respectivos eletrodos segundo um mecanismo difusional e dependente do pH do meio. Os parâmetros instrumentais da técnica para a determinação dos mesmos foram otimizados por meio de um planejamento fatorial do tipo Box-Behnken com triplicata no ponto central. Para ambos os eletrodos, as ANOVAS dos modelos matemáticos quadráticos aos quais os dados experimentais obtidos nos planejamentos foram ajustados evidenciaram que, em ambos os casos, as variâncias explicadas pelo mesmo são bem próximas da máxima variância explicável. Além disso, a falta de ajuste não foi significativa nos dois planejamentos. Os eletrodos modificados com as nanopartículas metálicas estabilizadas pelos polissacarídeos (EPCV/AuNPs-GA e o EPC/AgNPs-GAR) apresentaram

maiores sensibilidades em relação aos analitos empregados quando comparados aos eletrodos modificados apenas com GA ou GAR (EPCV/GA e EPC/GAR) e os eletrodos de carbono não modificados (EPCV ou EPC). Os valores de LD e LQ calculados para os eletrodos desenvolvidos foram satisfatoriamente baixos (para PMZ: LD = 0,76 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e o LQ = 2,53 $\mu\text{mol L}^{-1}$; para 5-FU: LD = 0,76 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e o LQ = 2,53 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e comparáveis aos de outros métodos existentes na literatura para a determinação dos fármacos estudados. Estudos de determinação em formulações farmacêuticas comerciais, tanto da PMZ como do 5-FU, confirmaram os desempenhos analíticos promissores dos eletrodos desenvolvidos com porcentagens de determinação entre 94,89 a 99,83%, e DPR aceitáveis inferiores a 5%, evidenciando a exatidão e precisão apresentadas pelos eletrodos modificados para a determinação dos analitos em amostras reais.

As AuNPs-GA sintetizadas foram consideradas hemocompatíveis, uma vez que não apresentaram efeitos citotóxicos detectáveis em ambos os tipos de células sanguíneas *in vitro* estudadas. Tal resultado é importante para futuras aplicações biomédicas das AuNPs-GA bem como para a futura aplicação do eletrodo modificado em amostras sanguíneas.

Por fim, é possível afirmar que os extratos vegetais empregados nas sínteses verdes relatadas foram capazes de atuar simultaneamente como agentes redutores e estabilizantes, promovendo-se de forma simples e eficiente a síntese de nanopartículas de prata e de ouro. Os referidos extratos foram capazes de promover a obtenção das nanopartículas uma vez que possuem grupos passíveis para sofrer oxidação, promovendo-se assim a redução dos precursores metálicos na forma de nanopartículas. Ressalta-se que as sínteses empregando-se a GA e a GAR são inéditas. A aplicação dos nanomateriais sintetizados aliados com os extratos vegetais como modificadores químicos de eletrodos de pasta de carbono foi benéfica, melhorando as propriedades eletroquímicas dos dispositivos, sendo os dois sensores desenvolvidos de fácil confecção. Pode-se dizer ainda que ambos os eletrodos foram capazes de determinar concentrações dos analitos estudados em formulações farmacêuticas comerciais, apresentando níveis de recuperação próximos a 100%. Conclui-se que as rotas verdes inéditas de síntese foram eficientes e suas aplicações no desenvolvimento de dispositivos eletroquímicos proporcionaram resultados promissores, o que pode promover futuras aplicações destes materiais no desenvolvimento de biossensores.

6 PERSPECTIVAS

- I. Realizar o estudo de hemocompatibilidade com as AgNPs-GAR;
- II. Aplicação do EPC/AgNPs-GAR na determinação eletroanalítica de outros agentes antitumorais, como cisplatina, carboplatina, clorambucil, capecitabina e doxorrubicina;
- III. Utilizar as AuNPs-GA e as AgNPs-GAR como plataforma para imobilização de anticorpos e antígenos, a fim de se desenvolver imunossensores eletroquímicos para a detecção para a detecção de biomarcadores de câncer e de doenças infecciosas e neurológicas. Ressalta-se neste tópico a vantagem da utilização das nanopartículas obtidas pelas rotas verdes apresentadas no presente trabalho. Uma vez que apresentam uma maior biocompatibilidade, os presentes nanomateriais são interessantes plataformas de imobilização para biomoléculas como anticorpos e antígenos.

REFERÊNCIAS

- 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.
- AGRISUELAS, J.; SÁNCHEZ, M.I.G.; VALERO, E. Hydrogen peroxide sensor based on in situ grown Pt nanoparticles from waste screen-printed electrodes. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 249, p.499-505, 2017.
- AISHA, A.F.A.; ABU-SALAH, K.M.; MAJID, Z.I.A.M.S.A. In vitro and in vivo anti-colon cancer effects of *Garcinia mangostana* xanthonex extract. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, n.104, 2012.
- ALÍA, M.; RAMOS, S.; MATEOS, R.; BRAVO, L.; GOYA, L. Response of the antioxidant defense system to tert-butyl hydroperoxide and hydrogen peroxide in a human hepatoma cell line (HepG2), **J. Biochem. Mol. Toxicol**, v. 19, 2005
- ALIZADEH, T.; AKHOUNDIAN, M. Promethazine determination in plasma samples by using carbon paste electrode modified with molecularly imprinted polymer (MIP): Coupling of extraction, preconcentration and electrochemical determination. **Electrochimica Acta**. v. 55, p. 5867-5873, 2010.
- 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 ciclocelular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.
- ANGELOVA, N.; YORDANOV, G. Entrapment of β -FeO(OH) nanoparticles in human serum albumin: Preparation, characterization and hemocompatibility, **Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.** 516, p. 317–324, 2017.
- ANTALA, B.V.; PATEL, M.S.; BHUVA, S.V.; GUPTA, S.; RABADIYA, S.; LAHKAR, M. Protective effect of methanolic extract of *Garcinia indica* fruits in 6-OHDA rat model of Parkinson's disease. **Indian Journal of Pharmacology**, v.44, n.6, p.683-687, 2012
- ANTONY, J.J.; SIVALINGAM, P.; CHEN, B. Toxicological effects of Silver Nanoparticles. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 2015.
- ARMBRUSTER, D. A.; PRY, T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. **The Biochemical Reviews**, v. 29, p. S49-S50, 2008.
- ARÉVALO, F.J.; SÁNCHEZ, Y.O.; CORTÉS, J.S.; TOCCO, A.; GRANERO, A.M.; ROBLEDO, S.N.; ZON, M.A.; VETTORAZZI, N.R.; MARTÍNEZ, J.L.; SEGURA, E.P.; ILINÁ, A.; FERNÁNDEZ, H. Development of an electrochemical sensor for the determination of glycerol based on glassy carbon electrodes modified with a copper oxide nanoparticles/multiwalled carbon nanotubes/pectin composite. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 244, p. 949-957, 2017.
- ARUMUGAM, B.; MUTHUKUTTY, B.; CHEN, S.; RAMARAJ, S.K.; KUMAR, J.V.; NAGARAJAN, E.R. Ultrasonication-aided synthesis of nanoplates-like Iron molybdate: Fabricated over glassy carbon electrode as an modified electrode for the selective determination of first generation antihistamine drug promethazine hydrochloride. **Ultrasonics Sonochemistry**, 2020.

ARVAND, M.; ANSARI, R.; HEYDARI, L. Electrocatalytic oxidation and diferential pulse voltammetric determination of sulfamethoxazole using carbon nanotube paste electrode. **Materials Science and Engineering C**, v. 31, p. 1819-1825, set. 2011

ASHARANI, P.V.; MUN, G.L.K.; HANDE, M.P.; VALIYAVEETT, S. Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells. **ACSNano**, v.3, n.2, 2009

ASTUTO, Victor Basile. **Microscopia eletrônica: varredura e transmissão - MEV e MET**. Disponível em: http://ca.iq.usp.br/novo/paginas_view.php?idPagina=16. Acesso em: 05 mar. 2020.

AZIZ, A.N.S.; SHAHEEN, N.S.; NEKEETY, A.A.; WAHHAB, M.A.A. Antioxidant and antibacterial activity of silver nanoparticles biosynthesized using *Chenopodium murale* leaf extract. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, p.356-363, 2014.

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.

BALLOTTIN, D.; FULAZ, S.; CABRINI, F.; TSUKAMOTO, J.; DURÁN, N.; ALVES, O.L.; TASIC, L. Antimicrobial textiles: Biogenic silver nanoparticles against *Candida* and *Xanthomonas*. **Materials Science and Engineering C**, n.75, 582-589, 2017.

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

BARTOLI, G.M.; PICCIONI, E.; AGOSTARA, G. CALVIELLO, G.; PALOZZA, P. Explicação citotoxicidade TBHO 4.pdf, **Arch.Biochem.Biophys**, v.312, p.81-87, 1994.

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

BREITKREITZ, M. C.; SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para planejamento de experimentos: avaliação das condições experimentais na determinação espectrofotométrica de Fe(II) com o-fenantrolina: um tutorial, parte III. **Química Nova**, v. 37, p. 564-573, 2014.

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.

BUDAMA, L.; ÇAKIR, B.C.; TOPEL, O.; HODA, N. A new strategy for producing antibacterial textile surfaces using silver nanoparticles. **Chemical Engineering Journal**, n.228, 489-495, 2013.

BUKKITGAR, S.; SHETTI, N.P. Electrochemical behavior of an anticancer drug 5-fluorouracil at methylene blue modified carbon paste electrode. **Materials Science and Engineering C**, v. 65, p.262-268, 2016.

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.

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

CANUTO, Kirley Marques. **Aspectos Químicos do Estudo Interdisciplinar (Química-Agronomia-Farmacologia) de Amburana cearensis A.C. Smith**. Tese. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2007.

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.

CHAABANI, W.; PROUST, J.; MOVSESYAN, A.; BEAL, J.; BAUDRION, A.; ADAM, P.; CHEHAIDAR, A.; PLAIN, J. Large-Scale and Low-Cost Fabrication of Silicon Mie Resonators. **ACS Nano**, 2019

CHAUNDRY, Q.; CASTLE, L. Food applications of nanotechnologies: An overview of opportunities and challenges for developing countries. **Trends in Food Science & Technology**, n.11, v. 22, p.595-603, 2011.

CHELLAPANDIAN, C.; RAMKUMAR, B.; PUJA, P.; SHANMUGANATHAN, R.; PUGAZHENDHI, A.; KUMAR, P. Gold nanoparticles using red seaweed *Gracilaria verrucosa*: Green synthesis, characterization and biocompatibility studies. **Process Biochemistry**. n.80, p. 58-63, 2019.

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, H.; RICKEY, Y. Nanotechnologies in agriculture: New tools for sustainable development. **Trends in Food Science & Technology**, n. 11, v. 22, p. 585-594, 2011.

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

CHEN, S.; HAN, K.; LI, H.; CEN, J.; YANG, Y.; WU, H.; WEI, Q. Isogarcinol Extracted from *Garcinia mangostana* L. Ameliorates Imiquimod-induced Psoriasis-like Skin Lesions in Mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2017.

CHIEN, C.W.; CHEN, D.H. Facile green synthesis of gold nanoparticles with gum arabic as a stabilizing agent and reducing agent. **Gold Bulletin**, n.4, v. 42, p. 234- 240, 2010.

CHOI, Y.; CHOI, M.J.; CHA, S. H.; KIM, Y.S.; CHO, S.; PARK, Y. Catechin-capped gold nanoparticles: green synthesis, characterization, and catalytic activity toward 4- nitrophenol reduction. **Nanoscale Research Letters**, v.9, n.103, 2014.

CRIADO, P.R.; CRIADO, R.F.J.; MARUTA, C.W.; FILHO, C.A.M. Histamina, receptores de histamina e anti-histamínicos: novos conceitos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.85, n.2, 2010.

CRUZ, L.C.; SALAZAR, J.J.; GALLEGOS, E.R.; MATSUMARA, P.D.; BATINA, N. Increasing roughness of the human breast cancer cell membrane through incorporation of gold nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v.11, p. 5149-5161, 2016.

CUNHA, P.L.R.; PAULA, R.C.M.; FEITOSA, J.P.A. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. **Química Nova**, n.3, v.32, p.649-660, 2009.

DAKHIL, A.S. Biosynthesis of silver nanoparticle (AgNPs) using *Lactobacillus* and their effects on oxidative stress biomarkers in rats. **Journal of King Saud University – Science**, v. 29, p. 462-467, 2017.

DANIEL, D.; GUTZ, I.G.R. Flow injection spectroelectroanalytical method for determination of promethazine hydrochloride in pharmaceutical preparations. **Analytica Chimica Acta**. v. 494. p. 215,224, 2003.

DÁVILA, I.; SASTRE, J.; MULLOL, J.; MONTORO, J.; JÁUREGUI, I.; FERRER, M.; CUVILLO, A.; BARTRA, J.; VALERO, A. Effect of bilastine upon nasal obstruction. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v.21, n.3, p. 2-8, 2011.

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.

DEML, K.F.; BEERMANN, S.; NEUMANN, D.; STRASSER, A.; SEIFERT, R. Interactions of histamine H1- receptor agonists and antagonists with the human histamine H4-receptor. **Molecular Pharmacology**, v. 76, n. 5, 2009.

DESAI, M.O.; PATIL, R.V.; PAWAR, Q.D. Selective and sensitive colorimetric detection of platinum using *Pseudomonas stutzeri* mediated optimally synthesized antibacterial silver nanoparticles. **Biotechnology Reports**, v.25, 2020.

DHAR, S.; REDDY, E.M.; SHIRAS, A.; POKHARKAR, V.; PRASAD, B. L. V. Natural Gum Reduced/Stabilized Gold Nanoparticles for Drug Delivery Formulations. **Chemistry: A European Journal**, v. 14, p. 10224-10250, 2008.

DODEVSKA,T.; VASILEVA, I.; DENEV, P.; KARASHANOVA, D.; GEORGIEVA, B.; KOVACHEVA, D.; YANTCHEVA, N.; SLAVOV, A. Rosa damascena waste mediated synthesis of silver nanoparticles: Characteristics and application for an electrochemical sensing of hydrogen peroxide and vanillin. **Materials Chemistry and Physics**, v.231, p.335-343, 2019.

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

DURÁN, N.; ROLIMB, W.R.; DURÁN, M.; FÁVAROA, W.J.; SEABRA, A.B. Nanotoxicologia de nanopartículas de prata: toxicidade em animais e humanos. **Química Nova**, v.42, n.2, 2019.

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

ENSAFI, A.A.; NASR-ESFAHANI, P.; REZAEI, B. Synthesis of molecularly imprinted polymer on carbon quantum dots as an optical sensor for selective fluorescent determination of promethazine hydrochloride. **Sensors and Actuators B**, v.257, p. 889-896, 2018.

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.

FAN, Y.; YUAN, S.; HUO, M.; CHAUDHURI, A.S.; ZHAO, M.; WU, Z.; QI, X. Spatial controlled multistage nanocarriers through hybridization of dendrimers and gelatin nanoparticles for deep penetration and therapy into tumor tissue. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v.13, p.1399-1410, 2017.

FEKRY, A.M. A new simple electrochemical Moxifloxacin Hydrochloride sensor built on carbon paste modified with silver nanoparticles. **Biosensors and Bioelectronics**, v.87, 1065-1070, 2017

FENG, S.; LI, C.; FAN, J.; CHEN, X. Sequential injection technique for the determination of chlorpromazine hydrochloride in pure form and pharmaceutical formulations. *Journal Analytical Chemistry*. v. 62, p. 233-237, 2007.

FERNÁNDEZ, L. et al. Horseradish peroxidase modified electrode based on a film of Co–Al layered double hydroxide modified with sodium dodecylbenzenesulfonate for determination of 2-chlorophenol. **Sensors and Actuators B**, v. 182, p. 625-632, jun. 2013.

FERREIRA, S.L.C.; BRUNS, R.E.; FERREIRA, H.S.; MATOS, G.D.; DAVID, J.M.; BRANDÃO, G.C.; SILVA, E.G.P.; PORTUGUAL, L.A.; REIS, P.S.; SOUZA, A.S.; SANTOS, W.N.L. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**. v.597, p.179-186, 2007.

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.

FRITEA, L.; BANICA, F.; COSTEA, T.O.; MOLDOVAN, L.; IOVAN, C., CAVALU, S. A gold nanoparticles - Graphene based electrochemical sensor for sensitive determination of nitrazepam. **Journal of Electroanalytical Chemistry**. v. 830, p. 63-71, 2018.

GARCIA-LEIS, A.; RIVERA-ARREBA, I.; SANCHEZ-CORTES, S. Morphological tuning of plasmonic silver nanostars by controlling the nanoparticle growth mechanism: Application in the SERS detection of the amyloid marker Congo Red. **Colloids and Surfaces A**, v.535, p. 49-60, 2017

GIRÓN-VÁZQUEZ, N.G.; GÓMEZ-GUTIÉRREZ, C.M.; SOTO-ROBLES, C.A.; NAVA, O.; LUGO-MEDINA, E.; CASTREJÓN-SÁNCHEZ, V.H.; VILCHIS-NESTOR, A.R.; LUQUE, P.A. Study of the effect of Persea americana seed in the green synthesis of silver nanoparticles and their antimicrobial properties. **Results in Physics**, v.13, 2019.

GOMATHI, A.C.; RAJARATHINAM, S.R.X.; SADIQ, A.M.; RAJESHKUMAR, S. Anticancer activity of silver nanoparticles synthesized using aqueous fruit shell extract of Tamarindus indica on MCF-7 human breast cancer cell line. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 55, 2020.

GÓMEZ, M.A.M.; SAGRADO, S.; CAMANÃS, R.M.V.; HERNÁNDEZ, M.J.M. Enantioseparation of phenothiazines by affinity electrokinetic chromatography using human serum albumin as chiral selector application to enantiomeric quality control in pharmaceutical formulations. **Analytica Chimica Acta**. v.582, p.223-228, 2007.

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.

GHOSH, M.; SINHA, M.J.S.; CHAKRABORTY, A.; MALLICK, S.K.; BANDYOPADHYAY, M.; MUKHERJEE, A. In vitro and in vivo genotoxicity of silver nanoparticles, **Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.** v.749, p. 60–69, 2012.

GILPIN, R.K.; GILPIN, C.S. Pharmaceuticals and Related Drugs. **Analytical Chemistry**, v. 79, p. 4275-4294, 2007.

GÜZEL, R.; ERDAL, G. Synthesis of Silver Nanoparticles. **IntechOpen**, 2018

HAMEDI, S.; SHOJAOSADATI, S.A. Rapid and green synthesis of silver nanoparticles using Diospyros lotus extract: Evaluation of their biological and catalytic activities. **Polyhedron**, v.171, p. 172-180, 2019.

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

HASSAN, M.M. Enhanced colour, hydrophobicity, UV radiation absorption and antistatic properties of wool fabric multi-functionalised with silver nanoparticles. **Colloids and Surfaces A**, n. 55, 2019.

HASSANPOUR, S.; SAADATI, A.; HASANZADEH, M. pDNA conjugated with citrate capped silver nanoparticles towards ultrasensitive bio-assay of Haemophilus influenza in human biofluids. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 180, 2020.

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

HERNÁNDEZ-MORALES, L.; ESPINOZA-GÓMEZ, H.; FLORES-LÓPEZ, L.Z.; SOTELO-BARRERA, E.L.; NÚÑEZ-RIVERA, A.; CADENA-NAVA, R.D.; ALONSO-NÚÑEZ, G.; ESPINOZA, K.A. Study of the green synthesis of silver nanoparticles using a natural extract of dark or white *Salvia hispanica* L. seeds and their antibacterial application. **Applied Surface Science**, v. 489, p.952-961, 2019.

HILLEGASS, J.M.; SHUKLA, A.; LATHROP, S.A.; MACPHERSON, M.B.; FUKAGAWA, N.K.; MOSSMAN, B.T. Assessing nanotoxicity in cells in vitro, **WiREs: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 2, p. 219–231, 2010.

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

HONG, X.; ZHU, Y.; ZHANG, Y. Electrocatalytic response of poly(cobalto tetraaaminophthalocyanine)/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.

HONGBAO, M. H.; SHIEH, K.; QIAO, T.X. Study of Transmission Electron Microscopy (TEM) and Scanning Electron Microscopy (SEM). **Nature and Science**, v. 4, n. 3, 2006.

HONARMAND, E.; MOTAGHEDIFARD, M.H.; GHAMARI, M. Electroanalytical approach for determination of promethazine hydrochloride on gold nanoparticles-incorporated carbon paste electrode as a nanosensor. **RSC Advances**, v.4, p. 35511-35521, 2014.

HONARMAND, E.; MOTAGHEDIFARD, M.H.; HADI, M.; MOSTAANZADEH, H. Electro-oxidation study of promethazine hydrochloride at the surface of modified gold electrode using molecular self assembly of a novel bis-thio Schiff base from ethanol media. **Journal of Molecular Liquids**, v. 216, p. 429-439, 2016.

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.

HULIKERE, M. M.; JOSH, C.G. Characterization, antioxidant and antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized using marine endophytic fungus- *Cladosporium cladosporioides*. **Process Biochemistry**, v.82, p.199-204, 2019.

IBIAINA, C.C.; SARINHO, E.S.C.; CAMARGOS, P.A.M.; ANDRADE, C.R.; FILHO, A.A.S.C. Allergic Rhinitis: epidemiological aspects, diagnosis and treatment. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.34, n.4, p.230-240, 2008.

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.dez. 2019.

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.

JEOL 2100. **Operation Manual Transmission electron microscopy**. Japan, 2004.

JESUS, C.G.; FORTE, C.M.; WOHNATH, K.; PESSOA, C.A.; SOARES, J.E.S.S.; FUJIWARA, S.T.; NETO, P.L.; CORREIA, A.N. Electroanalytical Performance of (SiPy+Cl/CuTsPc)₅ LbL Film for Detecting Promethazine Hydrochloride. **Electroanalysis**, v. 33, n. 8, p. 1814-1820, 2011.

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

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.

JUNG, H.; SU, B.; KELLER, W.J.; MEHTA, R.J.; KINGHORN, A. D. Antioxidant Xanthonenes from the Pericarp of *Garcinia mangostana* (Mangosteen). **Journal of agricultural and food chemistry**, v.54, p.2077-2082, 2006.

KALANTARI, K.; AFIFI, A.B.M.; BAYAT, S.; SHAMELI, K.; YOUSEFI, S.; MOKHTAR, N.; KALANTARI, A. Heterogeneous catalysis in 4-nitrophenol degradation and antioxidant activities of silver nanoparticles embedded in Tapioca starch. **Arabian Journal of Chemistry**, 2017.

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

KALIMITHU, K.; CHA, B.S.; KIM, S.; PARK, K.S. Eco-friendly synthesis and biomedical applications of gold nanoparticles: A review. **Microchemical Journal**. n.152, 2020.

KAMEI, J.; HIRANO, S.; MIYATAS.; SAITOH, A.; ONODERA, K. Effects of First- and Second-Generation Histamine-H1-Receptor Antagonists on the Pentobarbital-Induced Loss of the Righting Reflex in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. **Journal of Pharmacological Sciences**, v.97, p. 266 – 272, 2005.

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

KAUSHANSKY, K.; LICHTMAN, M.A.; PRCHAL, J.T.; LEVI, M.M.; PRESS, O.W.; BURNS, L.J.; CALIGIURI, M.A. Williams Hematology, 9th editio, McGraw-Hill Education, New York, 2016.

KHALILZADEH, M.A.; BORZOO, M. Green synthesis of silver nanoparticles using onion extract and their application for the preparation of a modified electrode for determination of ascorbic acid. **Journal of food and drug analysis**, v.24, p. 796-803, 2016.

KHAN, T.; ULLAH, N.; KHAN, M.A.; MASHWANI, Z.R.; NADHMAN, Plant-based gold nanoparticles; a comprehensive review of the decade-long research on synthesis, mechanistic aspects and diverse applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, n.272, p. 1-10, 2019

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.

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.

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.

KOWSALYA, E.; MOSACHRISTAS, K.; BALASHANMUGAM, P.; TAMIL SELVI, A.; JAQULINE, C.R.I. Biocompatible silver nanoparticles/poly(vinyl alcohol) electrospun

nanofibers for potential antimicrobial food packaging applications. **Food Packaging and Shelf Life**, n.21.

KUMAR, M.; SWAMYA, B.E.K.; REDDY, S.; ZHAO, W.; CHETANA, S.; KUMAR, V.G. ZnO/functionalized MWCNT and Ag/functionalized MWCNT modified carbon paste electrodes for the determination of dopamine, paracetamol and folic acid. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 835, p. 96-105, 2019.

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

LI, C.; WU, Z.; YANG, H.; DENG, L.; CHEN, X. Reduced graphene oxide-cyclodextrin-chitosan electrochemical sensor: Effective and simultaneous determination of o- and p-nitrophenols. **Sensors and Actuators B: Chemical**. v.251, p. 446-454, 2017

LI, G.; THOMAS, S.; JOHNSON, J.J. Polyphenols from the mangosteen (*Garcinia mangostana*) fruit for breast and prostate cancer. **Frontiers in pharmacology**, v.4, 2013.

LI, J.; CHEN, Y.; ZHOU, P.; FAN, Q.; WANG, Q.; CHEN, X.; SU, Y.; DIAO, Y.; GUO, M.; AN, M.; LIU, H. Simultaneous determination of the novel anti-tumor candidate drug MDH-7 and 5-fluorouracil in rat plasma by LC-MS/MS: Application to pharmacokinetic interactions. **Journal of Chromatography B**, v. 1095, p. 235-240, 2018.

LI, J.; ZHAO, F.; ZENG, B. Characterization of a graphite powder-ionic liquid paste coated gold electrode, and a method for voltammetric determination of promethazine. **Microchimica Acta**. v. 157, p. 27-33, 2007.

LI, W.; LI, H.; ZHANG, M.; ZHONG, Y.; WANG, M.; CEN, J.; WU, H.; YANG, Y.; WEI, Q. Isogarcinol Extracted from *Garcinia mangostana* L. Ameliorates Systemic Lupus Erythematosus-like Disease in a Murine Model. **Journal of food and agricultural chemistry**, v. 63, p. 8452–8459, 2015

LI, Z; BARROS, A. L.; SOARES, D.C.F; MOSS, S.N; ALISARAIE, L. Functionalized single-walled carbon nanotubes: cellular uptake, biodistribution and applications in drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 524, p. 41-54, 2017

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.

LIM, J.; YEAP, S.; CHE, H. X.; LOW, S.C. Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering. **Nanoscale Research Letters**. v.8, n.381, 2013

LIMA, D.; CALAÇA, G.N.; VIANA, A.G.; PESSÔA, C.A. Porphyrin-capped gold nanoparticles modified carbon paste electrode: a simple and efficient electrochemical sensor for the sensitive determination of 5-fluorouracil. **Applied Surface Science**, v. 427, p.742-753, 2018.

LIUA, Y.; ZHUA, P.; HUANG, Z.; ZHOU, L.; SHI, P. Simultaneous detection of 5-fluorocytosine and 5-fluorouracil in human cells carrying CD/5-FC suicide gene system by using capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography B**, v. 1076, p.1-7, 2018.

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.

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.

MAJEED, S.; ARIPINA, F.H.B.; SHOEBA, N.S.B.; DANISH, M.; IBRAHIMC, M.N.M.; HASHIMD, R. Bioengineered silver nanoparticles capped with bovine serum albumin and its anticancer and apoptotic activity against breast, bone and intestinal colon cancer cell lines. **Materials Science & Engineering C**, v. 102, p.254-263, 2019.

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.

MANIKANDAKRISHNAN, M.; SUBRAMANIAN, P.; MANOHARAN, V.; BASKARAN, K.; SONAIMUTHU, M.; MANIKANDAN, R.; TABARSA, M.; YOU, S.; MARIMUTHU, P.N. Facile green route synthesis of gold nanoparticles using *Caulerpa racemosa* for biomedical applications. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, 2019

MARCO, J.P.; BORGES, K.B.; TARLEY, C.R.T.; RIBEIRO, E.S.; PEREIRA, A.C. Development of a simple, rapid and validated square wave voltametric method for determination of promethazine in raw material and pharmaceutical formulation using DNA modified multiwall carbon nanotube paste electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**. v. 177, p. 251-259, 2013.

MARKHAM, K.R.; MABRY, T.J. Ultraviolet-Visible and Proton Magnetic Resonance Spectroscopy of Flavonoids, 1975.

MENG, X. et al. 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, jun. 2012.

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.

MOURA, M.R.; MATTOSO, L.H.C.; ZUCOLOTTI, V. Development of cellulose-based bactericidal nanocomposites containing silver nanoparticles and their use as active food packaging. **Journal of Food Engineering**, n. 109, p. 520-524, 2012.

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.

NANDA, A.; NAYAK, B.K.; MOORTHY, K. Antimicrobial properties of biogenic silver nanoparticles synthesized from phylloplane fungus, *Aspergillus tamarii*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2019.

NANOCOMPOSIX: Silver Nanoparticles: Optical Properties. Disponível em <https://nanocomposix.com/pages/silver-nanoparticles-optical-properties#aggregation>. Acesso em 26 dez 2019.

NELSON, D. L.; COX, M. Lehninger Princípios de Bioquímica. 3ª edição. São Paulo: Sarvier, 2002.

- NEZHADALI, A.; BONAKDAR, G.A. Multivariate optimization of mebeverine analysis using molecularly imprinted polymer electrochemical sensor based on silver nanoparticles. **Journal of Food and Drug Analysis**. v. 27, p. 305-314, 2019
- NGUYEN, H. D.; TRINH, B. T. D.; NGUYEN, L. H. D. Guttiferones Q-S, cytotoxic polyisoprenylated benzophenones from the pericarp of *Garcinia cochinchinensis*. **Phytochem Lett**, v.4, p. 129–133, 2011
- NI, Y.; WANG, L.; KOKOT, S. Voltammetric determination of chlorpromethazine hydrochloride and promethazine hydrochloride with the use of multivariate calibration. **Analytica Chimica Acta**. v. 439, p. 159-168, 2001.
- 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.
- NUNES, C.C..I. Novos anti-histamínicos: uma visão crítica. **Jornal de Pediatria**. v.82, n. 5, p.173-180, 2006.
- NUNES C.; LADEIRA, S. Prevalence of allergic diseases in children and adolescents — ISAAC in Algarve region. **Revista Portuguesa de Imunoalergologia**, v. 13, n.1, p. 47-67, 2005
- OLIVEIRA, F. C. M.; SERRANO, S. H. P. Electrochemically active L-cysteine gold modified electrodes. **Electrochimica Acta**, v. 125, p. 566-572, 2014.
- OLORUNSOLA, E.O.; BHATIA, P.G.; TYTLER, B.A.; ADIKWU, M.U. Thermochemical Properties of Hydrophilic Polymers from Cashew and Khaya Exudates and Their Implications on Drug Delivery. **Journal of Drug Delivery**, 2016.
- OREN, T.; ANIK, U. Voltammetric determination of caffeine by using gold nanoparticle-glassy carbon paste composite electrode. **Measurement**, v. 106, p. 26- 30, 2017.
- ÖZTÜRK KÜP, F.; ÇOŞKUNÇAYb, S.; DUMAN, F. Biosynthesis of silver nanoparticles using leaf extract of *Aesculus hippocastanum* (horse chestnut): Evaluation of their antibacterial, antioxidant and drug release system activities. **Materials Science & Engineering C**, n. 107, 2020.
- PADMAVATHY, N.; JAIDEV, L.R.; BOSE, S.; CHATTERJEE, K. Oligomer-grafted graphene in a soft nanocomposite augments mechanical properties and biological activity. **Materials & Design**, v. 126, p. 238-249, 2017.
- PANDA, H.; ASHAR, S.; SRINATH, s. Antioxidant and hepatoprotective effect of *Garcinia indica* fruit rind in ethanolinduced hepatic damage in rodents. **Interdisciplinary toxicology**, v.5, n. 4, 2012.
- 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.
- PARAMELLE, D.; SADOVOY, A.; GORELIK, S.; FREE, P.; HOBLEY, J.; FERNIG, D.G. Rapid method to estimate the concentration of citrate capped silver nanoparticles from UV-visible light spectra. **Analyst**, v.19, 2014.

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.

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-polycarboxophil 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, P.F.; MARRA, M.C.; CUNHA, R.R.; SILVA, W.; MUNOZ, R.A.A.; RICHTER, E.M. Two simple and fast electrochemical methods for simultaneous determination of promethazine and codeine. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 713, p.32-38, 2014

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, jan. 2002.

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

PING YAO, P.; ZHANG, J.; XING, T.; CHEN, G.; TAO, R.; CHOO, K. Green synthesis of silver nanoparticles using grape seed extract and their application for reductive catalysis of Direct Orange 26. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v.58, p.74-79, 2018.

PHULL, A.R.; ABBAS, Q.; ALI, A.; RAZA, H.; KIM, S.J.; ZIA, M.; HAQ, I. Antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activities of green synthesized silver nanoparticles from crude extract of *Bergenia ciliata*. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.2, p.31-36, 2016.

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.

POOJA, D.; PANYARAM, S.; KULHARI, H.; REDDY, B.; RACHAMALLA, S. S.; SISTLA, R. Natural polysaccharide functionalized gold nanoparticles as biocompatible drug delivery carrier. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 80, p. 48- 56, 2015.

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.

PRAPPAKAR, R.A.; JEYARAJ, M.; AHMED, M.; KUMAR, S.S.; RAJAN, M. Silver Nanoparticle Functionalized CS-g-(CA-MA-PZA) Carrier for Sustainable Anti-tuberculosis Drug Delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, 1627-1638, 2018.

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

PRIMO, E.N.; OVIEDO, M.B.; SÁNCHEZ, C.G.; RUBIANES, M.D.; RIVAS, G.A. Bioelectrochemical Sensing of Promethazine with Bamboo-Type Multiwalled Carbon Nanotubes Dispersed in Calf-Thymus Double Stranded DNA. **Bioelectrochemistry**, 2014.

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

RAHIMI-NASRABADI, M.; AHMADI, F.; BEIGIZADEH, H.; KARIMI, M.S.; SOBHANI-NASAB, A.; JOSEPH, Y.; EHRLICH, H.; GANJALI, M.R. A modified sensitive carbon paste electrode for 5-fluorouracil based using a composite of praseodymium erbium tungstate. **Microchemical Journal**, 2020.

RAJAWATA, S.; MALIK, M.M. Anticancer Activity of Green Silver Nanoparticles against He-La Cervical Cancer Cell Lines. **Materials Today: Proceedings**, v.18, p. 841–847, 2019.

RAMA, M.J.R.; MEDINA, A.R.; DÍAZ, A. Bead injection spectroscopy-flow injection analysis (BIS-FIA): an interesting tool applicable to pharmaceutical analysis determination of promethazine and trifluoperazine. **Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 35, p. 1027- 1034, 2004.

RATTANA, N.; Klaynongsruang, S.; Leelayuwat, C.; Limpai boon, T.; Lulitanond, A.; Boonsiri, P.; Srichan, C.S.; Soontaranon, S.; Rugmai, S.; Daduang, J. Gallic acid conjugated with gold nanoparticles: antibacterial activity and mechanism of action on foodborne pathogens. **International Journal of Nanomedicine**, v.11, p.3347-3356, 2016.

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.

RAVICHANDRAN, V.; VASANTHIB, S.; SHALINIC, S.; SHAHD, S.A.A.; TRIPATHY, M.; PALIWAL, N. Green synthesis, characterization, antibacterial, antioxidant and photocatalytic activity of Parkia speciosa leaves extract mediated silver nanoparticles. **Results in Physics**, v. 15, 2019

RIBEIRO, F.W.P.; CARDOSO, A.S.; PORTELA, R.R.; LIMA, J.E.S.; MACHADO, S.A.S.; LIMA-NETO, P.; SOUZA, D.de.; CORREIA, A.N. Electroanalytical determination of promethazine hydrochloride in pharmaceutical formulations on highly boron-doped diamond electrodes using square-wave adsorptive voltammetry. **Electroanalysis**. v. 20, p. 2031-2039, 2008.

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

ROSSI, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A.; DALLE-DONNE, I. Membrane skeletal protein S-glutathionylation and hemolysis in human red blood cells, **Blood Cells, Mol. Dis**, v.37, p. 180–187, 2006.

ROUIS, A. et al. 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 Hg^{2+} ions. **Synthetic Metals**, v. 164, p. 78-87, jan. 2013.

RUNDLE, A.; ROBERTSON, A.B.; BLAY, A.M.; BUTLER, K.M.A.; CALLAGHAN, N.I.; DIENI, C.A.; MACCORMACK, T.J. Cerium oxide nanoparticles exhibit minimal cardiac and cytotoxicity in the freshwater fish *Catostomus commersonii*, **Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol.** p. 181–182, 2016.

SABOGAL-GUÁQUETAA, A.N.; CARRILLO-HORMAZA, L.; OSORIO, E.; Cardona-Gómez, g.p. Effects of biflavonoids from *Garcinia madruno* on a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **Pharmacological Research**, 2017

SACRAMENTO, C. K.; COELHO JUNIOR, E.; CARVALHO, J. E. U.; MÜLLER, C. H.; NASCIMENTO, W. M. O. Cultivo do mangostão no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, n. 1, p. 195-202, 2007.

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.

SANCHEZ, M.C.H.; VALENZUELA, M.I.; DURAN-MERÁS, I. RODRÍGUEZ-CACERES, M.I. 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, n.11, 2015

SANCHEZ, M.V.; VILCHIS, A.R.N. Green synthesis of noble metal (Au, Ag, Pt) nanoparticles, assisted by plant-extracts. **Noble Metals**, p. 391–408, 2012.

SANDRINO, B. et al. 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, fev. 2013.

SANSON, A.L.; SILVA, S.C.R.; MARTINS, M.C.G.; GIUSTI-PAIVA, A.; MAIA, P.P.; MARTINS, P. 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, 2011

SANTA-CECÍLIA, F.V.; VILELA, F.F.; ROCHA, C.Q.; DIAS, D.F.; CAVALCANTE, G.P.; FREITAS, L.A.S.; SANTOS, M.H.; GIUSTI-PAIVA, A. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Garcinia brasiliensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 467-473, 2011.

SANTOS, V. et al. Platinum nanoparticles incorporated in silsesquioxane for use in LbL films for the simultaneous detection of dopamine and ascorbic acid. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 14, p. 1-11, ago. 2012.

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.

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.

SCHARTL, W. **Light scattering from polymer solutions and nanoparticle dispersions**. Ed Springer. 2007

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

SERUJII, N.M.U.; KHONG, H.I.; KUTOI, C.J. Antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activities of *Garcinia nervosa* (Clusiaceae). **Journal of chemistry**, 2013.

SIDDIQUEE, M.A.; PARRAY, M.; MEHDI, S.H.; ALZAHIRANI, K.; ALSHEHRI, A.A.; MALIK, M.A.; PATEL, R. Green synthesis of silver nanoparticles from *Delonix regia* leaf extracts: In-vitro cytotoxicity and interaction studies with bovine serum albumin. **Materials Chemistry and Physics**, v.242, 2019

SEO, Y.S.; AHN, E.Y.; PARK, J.; KIM, T.Y.; HONG, J.E.; KIM, K.; PARK, Y.; PARL, Y. Catalytic reduction of 4-nitrophenol with gold nanoparticles synthesized by caffeic acid. **Nanoescale Research Letters**, v.12, n.7, 2017.

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.

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, A.G; RODRIGUES, J.F.; PAULA, R.C.M. Composição e Propriedades Reológicas da Goma do Angico (*Anadenanthera Macrocarpa* Benth). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, p. 34-40, 1998.

SINGH, H.; SINGH, P.; DU, J. Ecofriendly synthesis of silver and gold nanoparticles by *Euphrasia officinalis* leaf extract and its biomedical applications. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, 2017.

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.

SHANTHI, S.; JAYASEELAN, B.D.; VELUSAMY, P.; VIJAYAKUMAR, S.; CHIH, C.T.; VASEEHARAN, B. Biosynthesis of silver nanoparticles using a probiotic *Bacillus licheniformis* Dab1 and their antibiofilm activity and toxicity effects in *Ceriodaphnia cornuta*. **Microbial Pathogenesis**, 2016.

SHARMA, A.; JOSEPH, G.S.; SINGH, R.P. Antioxidant and antiplatelet aggregation properties of bark extracts of *Garcinia pedunculata* and *Garcinia cowa*. **Journal of Food Science and Technology**, v. 58, n. 8, p. 1626-1631, 2014.

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.

SHI, C.; ZHU, N.; C, Y.; WU, P. Biosynthesis of gold nanoparticles assisted by the intracellular protein extract of *Pycnoporus sanguineus* and its catalysis in degradation of 4-nitroaniline. **Nanoscale Research Letter**, v.10, n. 140, 2015.

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

SHIVAKUMAR, M.; NAGASHREE, K.L.; MANJAPPA, S.; DHARMAPRAKASH, M.S. Electrochemical detection of nitrite using glassy carbon electrode modified with silver nanospheres (AgNS) obtained by green synthesis using pre-hydrolysed liquor. **Electroanalysis**, v. 29, p.1-10, 2017.

SOUZA, C.D.; NOGUEIRA. B.R.; ROSTELATO, M.E.C.M. Review of the methodologies used in the synthesis gold nanoparticles by chemical reduction. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 798, p.714-740, 2019.

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.

STEPHEN, A. M.; PHILIPIS, G. O.; WILLIAMS, P. A., eds.; **Food Polysaccharides and their applications**, 2nd ed., CRC Press : Florida, 2006, Cap. 13

SU, Y.; ZHAO, L.; MENG, F.; WANG, Q.; YAO, Y.; LUO, J. Silver nanoparticles decorated lipase-sensitive polyurethane micelles for on-demand release of silver nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.152, p.238-244, 2017.

SUN, J.; GUO, F.; SHI, Q.; WU, H.; SUN, Y.; CHEN, M.; DIAO, G. Electrochemical detection of paraquat based on silver nanoparticles/watersoluble pillar[5]arene functionalized graphene oxide modified glassy carbon electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 847, 2019.

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.

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

TAIB, S.H.M.; SHAMELI, K.; NIA, P.M.; ETESAMI, M.; MIYAKE, M.; RASIT ALI, R.R.; EBRAHIM ABOUZARI-LOTF, E.; IZADIYAN, Z. Electrooxidation of nitrite based on green synthesis of gold nanoparticles using Hibiscus sabdariffa leaves. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 95, p. 616-626, 2019.

TANG, J.; HUANG, R.; ZHENG, S.; JIANG, S.; YU, H.; LI, Z.; WANG, J. A sensitive and selective electrochemical sensor based on graphene quantum dots/gold nanoparticles nanocomposite modified electrode for the determination of luteolin in peanut hulls. **Microchemical Journal**. v.145, p. 899-907, 2019.

TAO, A.R., HABAS, S., YANG, P. Shape control of colloidal metal nanocrystals. **Small**, v. 4, n. 3, p. 310–325, 2008.

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.

THANGAMANI, N.; BHUVANESHWARI, N. Green synthesis of gold nanoparticles using Simarouba glauca leaf extract and their biological activity of micro-organism. **Chemical Physics Letters**, v.732, 2019

THUNKHAMRAKA, C.; CHUNTIB,P.; OUNNUNKAD, K.; BANET, P.; AUBERT, P.; SAIANAND, G.; GOPALAN, A.; JAKMUNEE, J. Highly sensitive voltammetric immunosensor for the detection of prostate specific antigen based on silver nanoprobe assisted graphene oxide modified screen printed carbon electrode. **Talanta**, v.208, 2020.

TOSIN, F. F. S; BARRAZA, R.R.; FERREIRA, D.M; WERNER, M.F.P; BAGGIO, C.H; WAGNER, R.; SMIDERLE, F.R.; CARBONERO, E.R; SASSAKI, G.L; IACOMINI, M; GORIN, P.A.J. Glucuronoarabinoxylan from coconut palm gum exudate: Chemical structure and gastroprotective effect. **Carbohydrate Polymers**, v. 107, p.65-71, 2014.

TOSIN, F. F. S; SOUZA, L.M.; WAGNER, R.; PEREIRA, G.C.Z.; BARRAZA, R.R.; WENDEL, C.F.; SASSAKI, G.L; IACOMINI, M; GORIN, P.A.J. Structural characterization of a glucuronoarabinoxylan from pineapple (Ananas comosus (L.) Merrill) gum exudate. **Carbohydrate Polymers**, v.94, p.704-711, 2013.

TSIMOGIANNIS, D.; SAMIOTAKI,M.; PANAYOTOU, G.; OREOPOULOU, V. Characterization of Flavonoid Subgroups and Hydroxy Substitution by HPLC-MS/MS. **Molecules**, v. 12, p. 593-606, 2007.

TURUNC, E.; GUMUS, I.; ARSLAN, H. Redox active Co(II) complex modified carbon paste electrode for the determination of dopamine. **Materials Chemistry and Physics**, v. 243, 2019.

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.

UCHIYAMA, M.K.; DEDA, D.K.; DE PAULA RODRIGUES, S.F.; DREWES, C.C.; BOLONHEIS, S.M.; KIYOHARA, P.K.; DE TOLEDO, S.P.; COLLI, W.; ARAKI, K.; FARSKY, S.H.P. In vivo and In vitro toxicity and anti-inflammatory properties of gold nanoparticle bioconjugates to the vascular system, **Toxicol. Sci.** v. 142, p. 497–507, 2014.

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

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.

VERBEKEN, D.; DIERCKX,S.; DEWETTINCK, K. Exudate gums: occurrence, production, and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n. 1, v.63, p.10-21, 2003.

VIJAYARAGHAVAN, K.; T., ASHOKKUMAR. Plant-mediated biosynthesis of metallic nanoparticles: A review of literature, factors affecting synthesis, characterization techniques and applications. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 5, p.4866-4883, 2017.

VILLALONGA, R. et al. Layer-by-layer supramolecular architecture of cyclodextrinmodified PAMAM dendrimers and adamantane-modified peroxidase on gold surface for electrochemical biosensing. **Electrochimica Acta**, v. 76, p. 249-255, ago. 2012.

VINOD, V.T.P.; SARAVANAN, P.; SREEDHAR, B.; DEVI, K. D.; SASHIDHAR, R.B. A facile synthesis and characterization of Ag, Au and Pt nanoparticles using a natural hydrocolloid

gum kondagogu (*Cochlospermum gossypium*). **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 83, p.291-298, 2011

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

WANG, C; MATHIYALAGAN, R.; KIM, Y.J.; ACEITUNO, V.C.; SINGH, P.; AHN, S.; WANG, D.; YANG, D.C. Rapid green synthesis of silver and gold nanoparticles using *Dendropanax morbifera* leaf extract and their anticancer activities. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p.3691-3701, 2016.

WANG, G.; SHI, G.; CHEN, X.; YAO, R.; CHEN, F. A glassy carbon electrode modified with graphene quantum dots and silver nanoparticles for simultaneous 102 determination of guanine and adenine. **Microchimica Acta**, v. 182, p. 315-322, 2015.

WANG, H.; LIU, Y.; YAO, S.; HU, G. Fabrication of super pure single-walled carbon nanotube electrochemical sensor and its application for picomole detection of olaquinox. **Analytica Chimica Acta**. v. 1049, p. 82-90, 2019

WANG, J.J.; SHI, Q.H.; ZHANG, W.; SANDERSON, B.J.S. Anti-skin cancer properties of phenolic-rich extract from the pericarp of mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn.). **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 3004-3013, 2012.

WANG, K.; DONG, Y.; LI, B.; LI, D.; ZHANG, S.; WU, Y. Differentiation of proteins and cancer cells using metal oxide and metal nanoparticles-quantum dots sensor array. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 250, p. 69-75, 2017.

WANG, M.; XIE, Y.; ZHONG, Y.; CEN, J.; WANG, L.; LIU, Y.; ZHU, Y.; TONG, L.; WEI, Q. Amelioration of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Isogarcinol Extracted from *Garcinia mangostana* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2016.

WANG, S.; LI, Q.; JING, M.; ALBA, E.; YANG, X.; SABATE, R.; HAN, Y.; PI, R.; LAN, W.; YANG, X.; CHEN, J. Natural Xanthenes from *Garcinia mangostana* with Multifunctional Activities for the Therapy of Alzheimer's Disease. **Neurochemical Research**, 2016

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.

WILLIAMS, D.; CARTER, C.B.; **Transmission electron microscopy**. Second edition. Springer Edition. New York, 2009.

WILLETS, K.A.; VAN DUYNE, R.P. Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing. **Annual Review of Physical Chemistry**, v.58, p. 267- 297, 2007.

WOJCIAK-KOSIOR, M.; SKALSKA, A.; MATYSIK, A. Determination of phenothiazine derivatives by high performance thin-layer chromatography combined with densitometry. **Journal Pharmaceutical and Biomedic Analysis**. v.41, p. 286-289, 2006

WU, C.C.; CHEN, D.H. Facile green synthesis of gold nanoparticles with gum arabic as a stabilizing agent and reducing agent. **Gold Bulletin**, v. 43, n. 4, p. 234-240, 2010.

WU, F.; CHEN, L.; CHEN, L.; MEI, J.; WEI, X. Determination of Promethazine in Pharmaceutical Samples by Using Graphene Modified Electrode. **Asian Journal of Chemistry**, v. 26, n. 11, p.3171-3174, 2014.

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

YESHCENKO, 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.

YU, J.Y.; BISCEGLIA, K.J.; BOUWER, E.J.; ROBERTS, A.L.; COELHAN, M. Determination of pharmaceuticals and antiseptics in water by solid-phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry: analysis via pentafluorobenzoylation and stable isotope dilution. **Anal Bioanal Chem**, v. 403, p.583–591, 2012.

YU, Z.; WANG, W.; KONG, F.; LIN, M.; MUSTAPHA, A. Cellulose nanofibril/silver nanoparticle composite as an active food packaging system and its toxicity to human colon cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, n. 129, p.887-894, 2019.

XIAO, P.; WU, W.; YU, J.; ZHAO, F. Voltammetric sensing of promethazine on a multi-walled carbon nanotubes coated gold electrode. **International Journal of Electrochemical Science**, v.2, p. 149-157, 2007.

ZAMPA, M. F. et al. Development of a novel biosensor using cationic antimicrobial peptide and nickel phthalocyanine ultrathin films for electrochemical detection of dopamine. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2012, p. 1-7, 2012.

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.

ZOU, J.; CHEN, X.Q.; ZHAO, G.Q.; JIANG, X.Y.; JIAO, F.P.; YU, J.G. A novel electrochemical chiral interface based on the synergistic effect of polysaccharides for the recognition of tyrosine enantiomers. **Talanta**, v. 195, p. 628-637, 2019

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

ZHANG, J.; LI, R.; YAO, L.; WANG, Z.; LV, W.; KONG, F.; WANG, W. Highly sensitive determination of piroxicam using a glassy carbon electrode modified with silver nanoparticles dotted single walled carbon nanotubes-reduced graphene oxide nanocomposite. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v.823, p. 1-8, 2018.

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.