



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ-UFPI
CAMPUS UNIVERSITÁRIO MINISTRO PETRÔNIO PORTELLA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – CCS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

FILMES NANOESTRUTURADOS À BASE DE MATÉRIAS-PRIMAS REGIONAIS
COMO PLATAFORMAS PARA SENSORES DE FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS

HANDERSON RODRIGUES SILVA LIMA

TERESINA-PIAUÍ

2017

HANDERSON RODRIGUES SILVA LIMA

**FILMES NANOESTRUTURADOS À BASE DE MATÉRIAS-PRIMAS REGIONAIS
COMO PLATAFORMAS PARA SENSORES DE FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS**

Trabalho submetido ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Piauí como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes

Co-orientadora: Profa. Dra Carla Eiras

TERESINA-PIAUI

2017

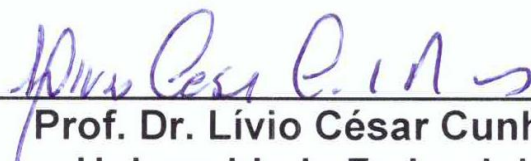
HANDERSON RODRIGUES SILVA LIMA

**FILMES NANOESTRUTURADOS À BASE DE MATÉRIAS-PRIMAS REGIONAIS
COMO PLATAFORMAS PARA SENSORES DE FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS**

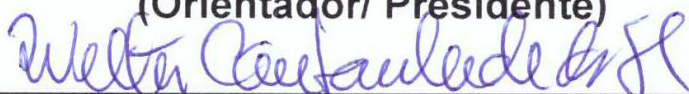
Trabalho submetido ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Piauí como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes
Universidade Federal do Piauí
(Orientador/ Presidente)



Prof. Dr. Welter Cantanhêde da Silva
Universidade Federal do Piauí
(Examinador Externo)



Prof. Dr. Hernane da Silva Barud
Universidade de Araraquara
(Examinador Externo)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José de Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITOR

Profa. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Pedro Vilarinho Castelo Branco

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Helder Nunes da Cunha

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Profa. Dra. Regina Ferraz Mendes

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dra. Marcília Pinheiro da Costa

AGRADECIMENTOS

A Deus

Por todas as bênçãos concedidas, pela força de enfrentar novos desafios e por permitir que cada passo dado seja combustível para o próximo.

Aos meus pais e irmãos

Agradeço por nunca medirem esforços por mim, por sonharem os meus sonhos e compartilharem comigo os momentos tristes e felizes. Amo vocês!

A minha família

Por toda confiança, palavras de fé e torcida! Em especial à minha avó Moça, à minhas tias e aos primos e primas, que tanto torceram e se esforçaram para me proporcionar sempre o melhor.

Ao professores e orientadores Lívio Nunes e Carla Eiras

Por todos os ensinamentos, por sua cumplicidade e por sempre acreditar em mim. Tudo fica mais fácil quando se tem confiança. Agradeço de coração por tudo.

Aos meus amigos

Pela presença constante ao longo dessa jornada e por todo o apoio oferecido, por terem as palavras certas e por sempre estarem ao meu lado, por poder contar sempre com vocês!

Aos demais colaboradores

Por dedicarem tempo grandioso para realização desta pesquisa.

A Universidade Federal do Piauí

Pela possibilidade de concretização de mais um desafio.

Filmes nanoestruturados à base de matérias-primas regionais como plataformas para sensores de fármacos antineoplásicos. HANDERSON RODRIGUES SILVA LIMA. Orientador: Dr. Lívio César Cunha Nunes. 106p. Dissertação de Mestrado. Programa de PósGraduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, 2017.

RESUMO

O câncer está entre as principais causas de morte no mundo atual e o seu tratamento muitas vezes consiste no uso de medicamentos citotóxicos e/ou citostáticos com potencial para causar contaminação ambiental ou ainda causar efeitos patológicos em indivíduos que trabalham com esses tipos de fármacos. Assim, a necessidade de métodos analíticos para a determinação de antineoplásicos torna-se de extrema importância, sendo os sensores e biossensores eletroquímicos interessantes candidatos para esta finalidade. Com isso, realizou-se uma revisão bibliográfica que traz um resumo dos principais sensores e biossensores eletroquímicos até então desenvolvidos para a análise de fármacos antineoplásicos, bem como uma prospecção tecnológica a respeito do desenvolvimento e do emprego de sensores e biossensores eletroquímicos na quantificação desses fármacos. Foram descritos diferentes sensores e biossensores já desenvolvidos para a análise de antineoplásicos, contudo, não foram encontradas patentes com esse tema. O estudo objetivou ainda estudar a resposta eletroquímica do quimioterápico metotrexato em eletrodos de ITO e desenvolver filmes nanoestruturados utilizando matérias-primas regionais do Nordeste do Brasil que possam ser utilizados como camada ativa para melhorar a resposta observada para esse fármaco. Observou-se que, dentre os meios estudados, a utilização do meio eletrolítico à base de tampão acetato de amônio pH 3.5 apresentou os melhores resultados e a utilização do filme *LbL* do polieletrólito PVS e mesocarpo de babaçu pôde intensificar o sinal obtido para a resposta eletroquímica do fármaco estudado, fato que provavelmente está relacionado à maior superfície de contato adquirida pelo eletrodo após a deposição do filme, conforme observado em Microscopia de Força Atômica. Utilizando-se a técnica de Voltametria de Onda Quadrada, foi possível ainda otimizar parâmetros para a determinação do fármaco e construir uma curva de calibração para o mesmo empregando-se o filme desenvolvido. O sensor mostrou um intervalo linear de quantificação variando entre $1,5 \times 10^{-6}$ e $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, com um limite de detecção (LD) de $5,95 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. A sensibilidade analítica para a detecção do metotrexato foi melhorada de $2,49 \mu\text{A}/\mu\text{mol L}^{-1}$ (ITO) para $5,55 \mu\text{A}/\mu\text{mol L}^{-1}$ (ITO/PVS/MB). O estudo demonstrou a possibilidade de quantificação de mtx a partir de técnicas eletroquímicas utilizando-se materiais de ampla disponibilidade regional, o que pode trazer grandes vantagens financeiras e para a saúde de forma geral.

Palavras-chave: sensor eletroquímico, quantificação, quimioterápico, antineoplásico.

Nanostructured Films based on regional raw materials as platforms for antineoplastic drugs sensors. HANDERSON RODRIGUES SILVA LIMA. Advisor: Dr. Livio Cunha César Nunes. 106p. Masters Dissertation. Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Piauí, 2017

ABSTRACT

The cancer is among the leading causes of death in the world in the actuality and its treatment often consists in the use of cytotoxic and cytostatic medicines that have potential to cause environmental contamination or cause pathological effects on individuals who work with these types of drugs. Thus, the need for analytical methods for the determination of these drugs becomes of extreme importance, being the electrochemical sensors and biosensors interesting candidates for this activity. Therefore, a literature review was realized, how far out studied, for the first time in the literature, a summary of the main electrochemical sensors and biosensors hitherto developed for the analysis of anticancer drugs, as well as a technological prospection about the development and employment of electrochemical sensors and biosensors in the quantification of anticancer drugs. There were described different sensors and biosensors already developed for the analysis of these drugs, however, no patents with that theme were found. This study aimed to study the electrochemical response of the antineoplastic methotrexate in ITO electrodes and developing nanostructured films using regional raw materials of northeastern Brazil that could be used as active layer to improve the response observed for this drug. It was observed, that the use of electrolytic media based in ammonium acetate pH 3.5 buffer solution presented the best results, among the studied medias, and the use of the LbL film of PVS and babassu mesocarp might intensify the signal obtained for the electrochemical response of the drug studied, which probably is related to the larger contact surface acquired by electrode after the deposition of the film as observed in Atomic force microscopy. Using the Square Wave Voltammetry technique, it was possible to still optimize parameters for the determination of the drug and construct a calibration curve for the same using the developed film. The sensor showed a linear range of quantification ranging from 1.5×10^{-6} and 5.0×10^{-5} mol L⁻¹, with a limit of detection (LD) of 5.95×10^{-7} mol L⁻¹. The analytical sensitivity for detection of MTX was improved from 2.49 $\mu\text{A}/\mu\text{mol L}^{-1}$ (ITO) to 5.55 $\mu\text{A}/\mu\text{mol L}^{-1}$ (ITO/PVS/MB). The study demonstrated the possibility of quantification of metrotexato with the utilization of electrochemical techniques using materials with large regional availability, the who can bring great financial and health advantages in general.

Keywords: electrochemical sensor, quantification, chemotherapy, antineoplastic.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Palmeira e fruto do babaçu (<i>Orbignya phalerata</i>).	24
Figura 2. Polissacarídeos formados a partir da glicose.	25
Figura 3. <i>Adenantha colubrina</i>	25
Figura 4. Estrutura geral das galactomananas.	26
Figura 5. <i>Adenantha pavonina</i> L. (a) e suas sementes (b).	27
Figura 6: Esquema ilustrativo de (a) um sensor e (b) um biosensor eletroquímico.	28
Figura 7: Estrutura Molecular do Metotrexato.....	31

CAPÍTULO I

Figura 8: Esquema de um sensor eletroquímico.	43
Figura 9. Representação esquemática de um eletrodo do tipo MIP.	52
Figura 10. Esquema simplificado de funcionamento de um biossensor.	57
Figura 11. Esquema simplificado da transferência eletrônica em biossensores enzimáticos com a ajuda ou não de mediadores redox.	61

CAPÍTULO II

Figura 12: Esquema de produção do filme de ITO/PVS/BM usado como sensor de MTX.....	82
Figura 13: Voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo de ITO na ausência e na presença de $5 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$ de MTX, e após limpeza e reutilização do eletrodo. Eletrólito: tampão acetato de amônio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3.5, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$	86
Figura 14: Mecanismo de oxidação do MTX.	87
Figura 15: Voltamogramas cíclicos na presença de $5.0 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$ de MTX em eletrodos de ITO A) em diferentes meios eletrolíticos; B) voltamogramas registrados em $\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2$ em diferentes pHs (b) C) voltamogramas registrados em $\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2$ em diferentes concentrações.....	89
Figura 16. Voltamogramas cíclicos obtidos para o MTX sob diferentes velocidades de varredura (a) correlação linear observada para os valores de corrente em função	

das velocidades estudadas (b). Todas as medidas foram realizadas em tampão acetato de amônio ($0,2 \text{ molL}^{-1}$, pH 3.5)90

Figura 17: Voltamogramas cíclicos obtidos para os eletrodos de ITO modificados com: A) Filmes de GA, GM ou MB; B) Filmes de PVS ou PAH. C) Filmes bicamadas de ITO/PVS/BM ou ITO/PAH/BM em comparação com a resposta da monocamada de BM. D) Filmes ITO/PVS/BM contendo uma e duas bicamadas.....92

Figura 18. Voltamogramas de Onda Quadrada para os eletrodos de ITO na presença de $5 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$ de MTX em varreduras consecutivas: A) sem agitação entre as leituras e B) com agitação mecânica entre as leituras (Tampão $\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2$ $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 3.5; Amp 20 mV; Freq 20 Hz)..... 95

Figura 19. Voltamogramas de onda quadrada para eletrodos de ITO na presença de $6,25 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de MTX variando-se os parâmetros: A) Amplitude de potencial, B) Frequência de potencial, C) Tempo de deposição, D) Potencial de deposição e E) parâmetros definidos. (Tampão $\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2$ $0,2 \text{ molL}^{-1}$, pH 3.5).....96

Figura 20. Voltamogramas de onda quadrada na presença de MTX (mol L^{-1}) em eletrodos de ITO/PVS/MB (Meio eletrolítico – Tampão $\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2$ $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3,5; Amp 75 mV, Freq 20 Hz) (a) e respectiva curva de calibração (b).....97

Figura 21: Curva de calibração do MTX por espectrofotometria UV-Vis..... 99

Figura 22: Microscopia de Força Atômica de eletrodos de ITO e ITO modificado com PVS e mesocarpo de babaçu101

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Sensores eletroquímicos para detecção de antineoplásicos.	45
Tabela 2. Biossensores eletroquímicos para detecção de antineoplásicos.....	58
Tabela 3 – Número de patentes depositadas por base de dados envolvendo sensores e biossensores eletroquímicos e sua correlação com quantificação de antineoplásicos.....	69

CAPÍTULO II

Tabela 4. Potencial zeta dos materiais utilizados na produção dos filmes.	93
Tabela 5- Métodos para quantificação de MTX neste trabalho.....	99

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

μA	Micro Ampere
μL	Microlitros
μM	Micromolar
2,7-BF	2,7-bis(ferrocenil etil)fluoren-9-ona
Abs	Absorbância
<i>AFM</i>	<i>Atomic Force Microscopy</i> (do inglês)
Ag	Prata
CD	Ciclodextrina
CL	Cardiolipina
cm^2	Centímetro quadrado
CMO	Carbono mesoporoso ordenado
CYP450	Citocromo P450.
ds-DNA	DNA de dupla fita
E	Potencial
ECS	Eletrodo de calomelano saturado
ECV	Eletrodo de carbono vítreo
ED	Etilenodiamina
EGP	Eletrodo de grafite pirolítico
EO	Eletrodo de ouro
EOMM	Estrutura organometálica microporosa
EPC	Eletrodo de pasta de carbono
ES	Eletrodo serigrafado
FM	Filme de mercúrio
g	Gramas
g/mol	Gramas por mol
GA	Goma de Angico
GF	Grafeno
GM	Galactomanana
GST	Glutathione-S-transferase
<i>HRP</i>	<i>Horse Radish Peroxidase</i> (do inglês)
i	Corrente

ITO	Eletrodo de vidro coberto com óxido de estanho e índio
L	Litros
<i>LbL</i>	<i>Layer by layer</i> (do inglês)
MB	Mesocarpo de babaçu
mg	Miligramas
mM	Milimolar
NP	Nanopartículas
NPM	Nanopartícula magnética
NPO	Nanopartículas de ouro
NTCM	Nanotubos de carbono multicamadas
NTCMF	Nanotubos de carbono multicamadas funcionalizados
PAG	Poli (ácido glutâmico)
PANI	Polianilina
<i>PGE</i>	do inglês <i>Pencil graphite electrodes</i>
PLL	Poli (L-lisina)
PPO	Polipirrol oxidado
Pt	Platina
PVC	Cloreto de polivinila carboxilada
PVS	Ácido polivinilsulfônico
s	Segundos
<i>SAMs</i>	<i>Self Assembled Monolayers</i> (do inglês)
TT	Polímero tertiofeno
UV-VIS	Ultravioleta-Visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 Nanotecnologia	17
3.2 Filmes Finos Nanoestruturados	17
3.3 Técnicas de formação de monocamadas automontadas (<i>Self Assembled Monolayer- SAM</i>) e <i>Layer-by-Layer</i>	19
3.4 Técnicas eletroanalíticas na análise de amostras	20
3.4.1 Voltametria Cíclica.	21
3.4.2 Voltametria de Onda Quadrada	22
3.5 Microscopia de Força Atômica	22
3.6 Materiais empregados na produção de filmes para sensores ,, ,, ,, ,, ,, ,,	23
3.6.1 Mesocarpo de babaçu	24
3.6.2 Goma de Angico	25
3.6.3 Galactomananas	26
3.7 Sensores e biossensores eletroquímicos	27
3.8 Análise de Fármacos Antineoplásicos	28
3.8.1 Importância	28
3.8.2 O antineoplásico Metotrexato	30
REFERÊNCIAS	32
4 CAPÍTULO I: Sensores e biossensores eletroquímicos na análise de fármacos antineoplásicos: uma revisão	38
4.1 Introdução	41
4.2 Sensores eletroquímicos para análise de fármacos antineoplásicos	42
4.2.1 Sensores eletroquímicos que empregam materiais nanométricos.....	48
4.2.2 Sensores de impressão molecular.....	51
4.2.3 Sensores eletroquímicos que utilizam polímeros como camada ativa.....	54
4.2.4 Outros sensores eletroquímicos	55
4.3 Biossensores eletroquímicos para análise de fármacos antineoplásicos.....	56
4.3.1 Biossensores enzimáticos	61
4.3.2 Biossensores que utilizam <i>DNA</i>	63

4.4	Prospecção tecnológica	68
4.5	Conclusão	70
	REFERÊNCIAS	71
5	CAPÍTULO II: Desenvolvimento e aplicação de filmes nanoestruturados em sensores eletroquímicos para determinação de metotrexato	75
5.1	Introdução.....	77
5.2	Metodologia.....	80
5.2.1	Materiais e reagentes	80
5.2.2	Obtenção dos materiais para produção dos filmes	80
5.2.3	Limpeza dos substratos.....	81
5.2.4	Preparo das soluções tampão e leitura de pH	81
5.2.5	Preparo das dispersões para deposição dos Filmes.....	81
5.2.6	Preparo dos filmes <i>Layer-by-Layer</i>	81
5.2.7	Estudos eletroquímicos	82
5.2.7.1	Estudos da resposta eletroquímica do MTX pela técnica de VC.....	83
5.2.7.2	Estudo da resposta eletroquímica do MTX por VOQ	83
5.2.8	Curva de calibração do MTX por espectrofotometria UV-VIS	83
5.2.9	Análise da Morfologia dos eletrodos por Microscopia de Força atômica	84
5.2.10	Análise de Potencial Zeta	84
5.2.11	Análise estatística	84
5.3	Resultados e Discussão	86
5.3.1	– Estudo da eletrooxidação do MTX em eletrodos de ITO por VC	86
5.3.2	– Escolha do meio eletrolítico, influência do pH e concentração molar.....	87
5.3.3	– Estudo da velocidade de varredura na resposta eletroquímica do MTX....	90
5.3.4	– Proposta de utilização de filmes nanoestruturados para otimização da resposta eletroquímica para o MTX.	91
5.3.5	– Estudos quantitativos do MTX por Voltametria de Onda Quadrada.....	94
5.3.6	– Comparação entre as técnicas de espectrofotometria UV-VIS e SWV usando-se eletrodos ITO/PVS/MB	98
5.3.7	- Estudo da morfologia e rugosidade do sensor	99
5.4	Conclusão	100
	REFERÊNCIAS	101

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a nanotecnologia tem evoluído muito rapidamente como um campo científico multidisciplinar (CHENG et al., 2011). Essa ciência aplicada à estruturação de filmes finos em camadas tem se tornado um dos métodos mais promissores para a construção e investigação de dispositivos nanoestruturados, tais como os sensores e biossensores (HOLDER et al., 2005).

Os sensores químicos são dispositivos que possibilitam a obtenção de informações com manipulação mínima do sistema onde estão inseridos gerando resultados que podem ser analisados e correlacionados com outros parâmetros do ambiente, onde a obtenção da informação analítica depende essencialmente da capacidade da membrana, usualmente posicionada na extremidade do dispositivo, em reconhecer a espécie de interesse.(LOWINSOHN; BERTOTTI, 2006).Já os biossensores consistem em sensores modificados com algum tipo de material biológico (MARQUES; YAMANAKA, 2008).

A literatura descreve uma gama de materiais empregados na fabricação de filmes nanoestruturados atuando como camada ativa em sensores específicos (WU et al, 2010; JAMES et al, 2012) e estudos recentes apontam o crescente uso de materiais obtidos de fontes naturais na formação de filmes finos, tendo como destaque os polímeros naturais, que podem ser definidos como polímeros formados a partir de organismos vivos, no interior das células por complexos processos metabólicos durante o ciclo de crescimento do referido organismo (RAO et al 2014).

Para Florea et al. (2015) o desenvolvimento de sensores e biossensores eletroquímicos tem atraído grande interesse para mensurar a concentração de antineoplásicos em amostras, devido a sua alta sensibilidade, baixo custo e curto tempo para análise, já que, entre as técnicas utilizadas para a análise desses fármacos, muitas apresentam altos custos, necessitam de um pré-tratamento das amostras entre outras desvantagens (NUSSBAUMER et al., 2011).

Assim o desenvolvimento de novas tecnologias para análise dessa classe de fármacos se mostra de grande relevância, pois os antineoplásicos são uma das classes de produtos farmacêuticos com maior potencial para causar efeitos prejudiciais ao meio ambiente e aos seres vivos (ZAMPIERI, 2013), onde diversos estudos comprovam que alguns desses fármacos, em determinados níveis de

exposição ocupacional, podem ocasionar danos à saúde dos trabalhadores, sendo considerados potencialmente mutagênicos (MAIA; BRITO, 2011).

Assim, o monitoramento de medicamentos antineoplásicos ainda se depara com grandes dificuldades tanto de ordem técnica quanto analítica, não existindo um padrão adequado em relação ao tipo de amostragem ou ao método de análise que permita uma avaliação do risco promovido pela exposição aos mesmos (MARTIN; ROSA, 2004).

Com isso, a necessidade de métodos analíticos para determinar fármacos antineoplásicos torna-se de extrema importância (NUSSBAUMER et al., 2011) e, a possibilidade de se utilizar matérias primas abundantes no estado do Piauí, na construção de biosensores para análise de fármacos antineoplásicos surge como nova uma aplicabilidade capaz de agregar valor a estes produtos.

O desenvolvimento deste trabalho poderá mostrar materiais capazes de serem utilizados como sensores que futuramente possam vir a ser utilizados no monitoramento ocupacional de profissionais que trabalham com esses medicamentos, na dosagem plasmática de fármacos, em controle de qualidade e de contaminantes ambientais, entre outras finalidades.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolver filmes automontados, do inglês *Self Assembled Monolayers* (SAM), ou filmes *Layer by Layer* (LbL) à base de matérias-primas regionais e avaliar o potencial desses filmes para o sensoriamento do fármaco antineoplásico metotrexato usando técnicas eletroquímicas.

2.2 Objetivos específicos

- 1) Agregar valor a matérias-primas regionais através do emprego desses materiais durante o preparo de filmes SAM ou *Layer-by-Layer* para aplicações em sensores;
- 2) Intercalar produtos naturais com polieletrólitos já descritos na literatura, na busca de sistemas capazes de detectar drogas antineoplásicas;
- 3) Otimizar os parâmetros envolvidos no processo (meio eletrolítico, pH, composição e número de camadas do filme, entre outras);
- 4) Caracterizar a morfologia dos filmes SAM ou LbL obtidos por Microscopia de Força Atômica, do inglês *Atomic Force Microscopy*(AFM).
- 5) Estudar a viabilidade do emprego desses filmes na detecção do antineoplásico Metotrexato.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Nanotecnologia

Emerich e Thanos (2003) conceituam a nanotecnologia como a ciência envolvida na concepção, síntese, caracterização e aplicação de materiais e dispositivos, cuja organização funcional, em pelo menos uma dimensão, esteja na escala nanométrica (um bilionésimo de metro), onde podem ocorrer fenômenos únicos que permitem novas aplicações (ADAMS; BARBANTE, 2013).

Muitos aspectos da nanotecnologia baseiam-se no fato de que o mundo em nanoescala é diferente do mundo macroscópico – cujos conceitos e aplicações já são adaptados a vida cotidiana. Em nível microscópico ou acima deste, os materiais têm massa convencional e propriedades que obedecem às leis da ciência clássica (ISLAM; MIYAZAKI, 2009), enquanto os materiais e dispositivos submicroscópicos (situados na escala entre 1 micrometro e 100 nm ou menos) têm suas propriedades afetadas por flutuações e estão sujeitos a leis imprevisíveis da mecânica quântica. Por este motivo, novas ferramentas e funcionalidades interessantes estão sendo descobertas neste novo campo científico (ADAMS; BARBANTE, 2013).

Assim, a ocorrência de interações em nível submicroscópico, torna capaz o surgimento de propriedades super-funcionais em diferentes materiais quando os mesmos se encontram em escala nanométrica (BRESNAHAN; TAJTENBERG, 1995).

Em outras palavras, é provável que a nanotecnologia seja a base para a obtenção de grandes avanços, incluindo a criação de dispositivos eletrônicos cada vez mais “inteligentes”, assim como melhoria na saúde através de métodos diagnósticos e terapêuticos cada vez mais sofisticados, além de avanços na agricultura e desenvolvimento de fontes mais limpas de energia (ISLAM; MIYAZAKI, 2009)

3.2 Filmes finos nanoestruturados

Chama-se “filme” a matéria condensada disposta em camadas imobilizadas em uma superfície sólida, conhecida como substrato. Quanto a sua espessura, os

chamados “filmes finos” podem ser classificados em nanométricos, micrométricos e milimétricos referindo-se às faixas de 0,1 – 100 nm, 0,1 – 100 μm e 0,1 – 100 mm, respectivamente (GALEMBECK, 1998).

Normalmente as propriedades de um material, na forma de filme, diferem substancialmente daquelas encontradas em sua forma natural, devido à influência da superfície. Por outro lado, as propriedades finais dos filmes são altamente dependentes do processo de deposição empregado e das interações existentes entre os materiais conjugados na formação do filme (FARIAS et al., 2014).

A necessidade de se compreender o comportamento de filmes finos ultrapassa as fronteiras do conhecimento científico e se estende para a área tecnológica, pois estes tipos de materiais estão sendo cada vez mais utilizados na fabricação de dispositivos de micro e nanoeletrônica, como sensores, transistores, células fotovoltaicas, diodos e diodos emissores de luz, o que leva a uma necessidade tecnológica em se conhecer suas propriedades eletrônicas (HOLDER et al., 2005).

A preferência pelo uso de filmes finos engloba não só as facilidades de processamento e de redução dos custos de fabricação, mas também a possibilidade de controle e otimização de suas propriedades elétricas e ópticas. Tais propriedades podem ser asseguradas com a variação, sobretudo, da espessura e da natureza dos materiais utilizados como eletrodos, o que influencia diretamente nas respostas do sistema, como é o caso da corrente elétrica, que pode ser amplificada mesmo sob aplicação de campos elétricos baixos ($< 10^3$ V/m) (BLYTHE et al., 2002).

Os filmes finos podem ser produzidos por diferentes métodos dentre os quais podemos citar: Deposição Química e Física à Vapor (BRINKER, 1990), Sol-gel (BRINKER, 1990), Langmuir-Blodgett (LB) (GUIMARÃES, 2009), *Casting, spin coating* (NASSAR et al., 2003), *dip coating* (CARVALHO e VARELA, 2001) além do método de *automontagem* do tipo camada-por-camada (do inglês *Layer-by-Layer-LbL*) (DECHER, 1997).

3.3 Técnicas de formação de monocamadas automontadas (*Self Assembled Monolayer*) e *Layer-by-Layer*

Modificar as propriedades de eletrodos, ancorando entidades orgânicas na sua superfície tem atraído interesse considerável em estudos eletroquímicos, uma vez que a modulação eficaz e racional dos processos eletroquímicos requer uma organização molecular bem definida da camada orgânica. Assim, a aplicação de monocamadas orgânicas altamente organizadas constitui uma abordagem promissora para a modificação de eletrodos (SABATANI et al., 1987).

Devido ao aumento do uso de moléculas orgânicas, a técnica de automontagem tem sido amplamente empregada na produção de filmes ultrafinos para potenciais aplicações em sensores e biossensores (GAMBINOSSI et al., 2007).

As monocamadas automontadas, do inglês *Self-Assembled Monolayers* (*SAMs*), são definidas como filmes de espessura monomolecular, constituídos por moléculas orgânicas que se organizam espontaneamente sobre uma superfície normalmente sólida (ULMAN, 1996), não sendo adequada para montagem de filmes multicamadas (ARIGA et al., 2006).

As *SAMs* exibem uma alta organização e são formadas espontaneamente como consequência da imersão de uma superfície sólida em solução constituída de moléculas que possam interagir com a superfície do substrato, devido à afinidade de seus grupos funcionais (MANDLER et al, 1996).

Nas monocamadas automontadas uma extremidade da molécula é projetada para ter uma interação favorável e específica com a superfície sólida de interesse (o substrato). Isso resulta na formação de um filme monocamada estável que permanece intacto, e devido a interação entre moléculas e o substrato, a adsorção pode frequentemente ser realizada em uma variedade de solventes polares e apolares, permitindo maior flexibilidade no design molecular e, portanto, nos tipos de propriedades de superfície que podem ser modificados e controlados (SCHWARTZ et al., 2001).

A automontagem ganhou atenção especial devido a vantagens tais como fácil manipulação, baixo custo operacional, reprodutibilidade, versatilidade dos materiais utilizados e elevado controle da arquitetura molecular (SANTOS et al., 2010).

Dentre as diferentes técnicas desenvolvidas para a fabricação de filmes finos, pode-se destacar ainda a técnica de automontagem *layer-by-layer* (*LbL*), que tem se mostrado promissora devido à capacidade de produzir filmes ultrafinos, utilizando-se diferentes tipos de materiais, de maneira simples e economicamente viável, proporcionando ainda a possibilidade de se conseguir estruturas organizadas em nível nanométrico (PATERNO et al., 2001; DURAN et al., 2006).

A formação desses filmes envolve a deposição de camadas através de interações eletrostáticas entre soluções de cargas contrárias envolvendo diferentes processos de adsorção (EIRAS et al., 2007).

Contudo, a interação eletrostática entre os materiais envolvidos não é exclusiva e nem tampouco um pré-requisito para a formação de um filme *LbL*, onde, a depender dos materiais escolhidos, outras forças podem orientar o mecanismo de formação dos filmes, como ligações covalentes, ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals, entre outras, diversificando ainda mais a versatilidade dessa técnica (DE OLIVEIRA et al., 2015).

Essa técnica, permite o controle de parâmetros como a espessura e o empacotamento molecular, uma vez que possibilita “organizar” moléculas individuais em arquiteturas altamente ordenadas, propiciando ainda o planejamento das propriedades finais dos filmes obtidos (ULMAN, 1991).

Outra vantagem inerente da técnica *LbL* é a possibilidade de combinação das propriedades de diversos tipos de materiais, tais como, compostos inorgânicos carregados (LU; HSIEH, 2010), nanopartículas, nanotubos, argilas, complexos organo-metálicos, polímeros (THERÉZIO et al., 2011), biomateriais como, polissacarídeos naturais, proteínas e enzimas, (EIRAS et al., 2010; CRESPILO et al., 2009), e uma infinidade de outros materiais e compostos químicos, o que tem ampliado o campo de estudo e a aplicabilidade desta técnica.

3.4 Técnicas eletroanalíticas em análise de amostras

Um conjunto de técnicas voltamétricas de análises, conhecidas como técnicas eletroanalíticas, está sendo cada vez mais utilizado em diversas áreas do conhecimento com o objetivo de se obter informações fundamentais sobre propriedades intrínsecas das substâncias. Estudos de processos de oxidação e

redução em vários meios, de adsorção em superfícies e de mecanismo de transferência de elétrons, inclusive com a utilização de eletrodos modificados, exemplificam algumas das suas numerosas aplicações (DE SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003).

Entre as vantagens dessas técnicas podem ser destacadas o curto tempo na realização das análises, o baixo custo da instrumentação e dos materiais utilizados, se comparados às técnicas cromatográficas e espectroscópicas, e à baixa sensibilidade que as técnicas eletroanalíticas apresentam em relação à presença de interferentes. Além disso, permitem que a medida possa ser realizada diretamente na amostra, sem necessidade de etapas de pré-purificações ou de separações prévias, tornando possível ainda a análise de materiais coloridos ou amostras contendo partículas sólidas dispersas (DE SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003).

3.4.1 Voltametria Cíclica

A voltametria é uma técnica eletroquímica em que as respostas qualitativas e quantitativas de uma espécie eletroativa são obtidas em função do registro da curva corrente *versus* potencial aplicado (ALEIXO, 2003; HARRIS, 2003).

Para a análise exploratória de espécies eletroativas, a técnica de Voltametria Cíclica (VC) tem sido utilizada frequentemente, com o objetivo de se obter informações qualitativas sobre as espécies de interesse. A versatilidade da VC, combinada com a facilidade na realização de medidas resultou em sua ampla aplicação nos campos da Eletroquímica, Química Inorgânica, Química Orgânica e Bioquímica (SKOOG et al., 2006; HOLLER et al., 2009).

Na técnica de VC o potencial do eletrodo de trabalho é controlado pelo eletrodo de referência, sendo os mais usuais os de calomelano Saturado (SCE) e de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl). O potencial de controle é aplicado entre dois eletrodos, produzindo um sinal de excitação caracterizado por uma varredura linear de potencial em forma de onda triangular (SKOOG et al., 2006; HOLLER et al., 2009).

Devido a sua natureza exploratória, a VC tem sido empregada na caracterização de diversos tipos de materiais. Um destaque especial pode ser dado aos filmes finos produzidos pela técnica *LbL*.

3.4.2 Voltametria de Onda Quadrada

Assim como a VC, a voltametria de onda quadrada, do inglês “*SquareWaveVoltammetry*” (SWV), tem sido amplamente utilizada, sendo uma das técnicas voltamétricas de pulso mais rápidas e sensíveis, onde os limites de detecção podem ser comparados às técnicas cromatográficas e espectroscópicas (DE SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003).

Do ponto de vista prático, a SWV possibilita a obtenção de correntes de pico bem definidas em experimentos executados em alta velocidade de varredura, melhorando, assim, a sensibilidade da técnica e, por tratar-se de uma técnica de pulso, a corrente faradaica pode ser coletada sem grande interferência da corrente capacitiva. Uma outra vantagem apresentada pela SWV é a redução no ruído de fundo por meio de varreduras repetitivas e a possibilidade de se obter informações análogas às aquelas obtidas utilizando-se a VC, porém com uma sensibilidade maior devido à minimização da contribuição da corrente capacitiva (DE SOUZA, MACHADO e AVACA, 2003).

3.5 Microscopia de Força Atômica

A microscopia de força atômica, *AFM* (do inglês, *Atomic Force Microscopy*), foi desenvolvida por Binnig, Quate e Gerber, em 1986, partindo-se das técnicas desenvolvidas e utilizadas na Microscopia de Tunelamento de Elétrons (TEM, do inglês, *Tunneling Electron Microscopy*). A *AFM* possibilita uma resolução tridimensional similar a *TEM*, mas pode ser utilizada diretamente em amostras de materiais eletricamente isolantes ou condutores (BINNIG e QUATE, 1986).

As vantagens práticas da utilização da *AFM* consistem em não haver necessidade de preparo prévio das amostras, desde que suas dimensões estejam dentro das especificações do equipamento. É uma técnica muito atraente para estudar a superfície de materiais biológicos pelo fato de poder analisar a amostra diretamente sem a necessidade de secagem, desidratação ou a deposição de outros materiais, a fim de tornar a superfície da amostra condutora, como exige a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (CHERNY et al., 1998).

A técnica consiste na varredura da superfície por uma ponta de prova ou cantilever que oscila de acordo com a interação entre a mesma e o material da superfície. As imagens obtidas permitem identificar o recobrimento da superfície de substratos por filmes, bem como a espessura e homogeneidade dos mesmos por meio da formação de agregados (MARLETTA et al., 2010).

3.6. Materiais empregados na produção de filmes como camada ativa para sensores.

A literatura descreve uma gama de materiais empregados na fabricação de filmes *LbL*, sejam eles conjugados em camadas alternadas originando os chamados nanocompósitos (MANTHA et al., 2010) ou ainda imobilizados individualmente (EGAWA et al., 2011) atuando como camada ativa em sensores específicos (WU et al., 2010; JAMES et al., 2012).

Alguns polissacarídeos obtidos de fontes naturais têm sido amplamente estudados em relação às suas propriedades e aplicações, onde características como biodegradabilidade, abundância na natureza e versatilidade, além de serem geralmente atóxicos, têm despertado interesse, em especial na produção de filmes finos de polissacarídeos sobre superfícies sólidas podendo ser aplicados na produção de sensores ou biossensores (EIRAS et al., 2007).

Os polissacarídeos apresentam uso consagrado na indústria alimentícia e farmacêutica atuando como agentes filmógenos, espessantes, emulsionantes, estabilizantes, entre outras propriedades, em especial devido a suas características biodegradáveis (WHISTLER; BEMILLER, 1997)

Esses polissacarídeos têm sido usados particularmente como substitutos de polímeros sintéticos, por apresentarem várias vantagens, tais como baixo custo, baixa toxicidade, disponibilidade na natureza e biodegradabilidade (VALENGA, 2012).

Alguns materiais obtidos de fontes naturais têm tido atenção em estudos de produção de filmes finos, tendo como destaque os biopolímeros, também conhecidos como polímeros naturais, que podem ser definidos como polímeros formados a partir de organismos vivos, no interior das células por complexos

processos metabólicos durante o ciclo de crescimento do referido organismo (RAO et al 2014).

3.6.1 Mesocarpo de babaçu

Uma fonte para a produção de biopolímeros são os materiais lignocelulósicos, formados por estruturas rígidas e fibrosas compostas de três componentes majoritários: a celulose (50 %), as hemiceluloses (25 %) e a lignina (25 %), onde a celulose e hemicelulose, encontram-se entremeados por lignina (LEE, 1997; BASTOS, 2007).

Dentre os materiais lignocelulósicos a serem utilizados na obtenção de biopolímeros, destaca-se o mesocarpo do coco babaçu (*Orbignya phalerata* Mart) (MB). O coco do babaçu é constituído de 03 (três) camadas; uma externa, fibrosa (epicarpo); uma intermediária, fibrosa-amilácea (mesocarpo) e uma interna, lenhosa (endocarpo), na qual estão inseridas as amêndoas (NASCIMENTO, 2004).

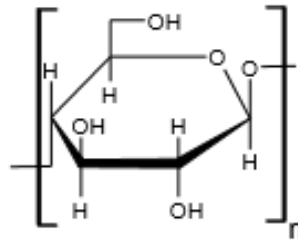
O MB é extraído do coco encontrado na palmeira do babaçu (*Orbignya sp*), apresentado na Figura 1, sendo essa palmeira encontrada em países como Bolívia, Suriname e Brasil, neste último, encontra-se a região conhecida como “mata dos cocais”, uma área de alta densidade dessa palmeira, especialmente nos Estados do Maranhão, Tocantins e Piauí (LORENZI, 2010).

Figura 1. Palmeira e fruto do babaçu (*Orbignya phalerata*)



A farinha do mesocarpo de babaçu é composta por um conjunto de componentes como materiais graxos, compostos nitrogenados, celulose, açúcares, dextranas e majoritariamente, amido (PEIXOTO, 1973), estes últimos sendo polissacarídeos originados a partir da glicose (Figura 2).

Figura 2. Polissacarídeos formados a partir da glicose.



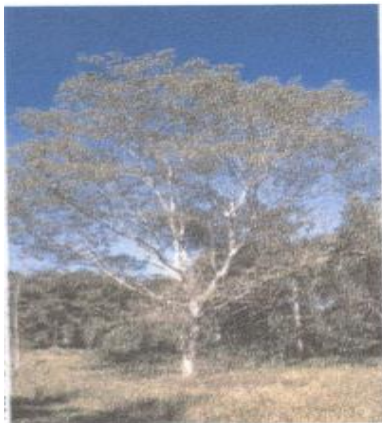
O MB é um subproduto agrícola com grande quantidade de materiais lignocelulósicos. É um material não-tóxico, renovável e passível de modificação com grande potencial a ser utilizado na área industrial (VIEIRA et al, 2009).

3.6.2 Goma de Angico

As gomas naturais são polissacarídeos obtidos de exsudatos de tronco de árvore, sementes, algas ou por fermentação microbológica (EIRAS et al., 2007).

A árvore angico (*Anadenanthera macrocarpa* Benth), apresentada na Figura 3, pertence à família das leguminosas e exsuda uma goma com as mesmas características das gomas arábica (*Acacia senegal*) e do cajueiro (*Anacardium occidentale*). Essa goma do angico trata-se de um heteropolissacarídeo que contém arabinose (67,8%), galactose (24,1%), ácido urônico (5,9%) e traços de ramnose, além de apresentar baixa viscosidade, semelhante às gomas do cajueiro e arábica (EIRAS et al., 2007).

Figura 3. *Adenanthera colubrina*.



Fonte: Carvalho (2002).

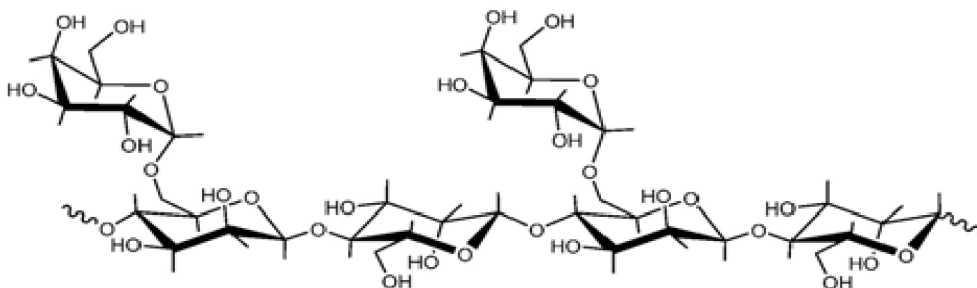
A goma de angico foi utilizada como biomaterial modificador de camada em filme de ftalocianina tetrasulfonada de níquel, onde os filmes apresentaram boa estabilidade e puderam ser utilizados na detecção de neurotransmissores, sendo constatado que a utilização das gomas nos filmes possibilitou um incremento na resposta eletroquímica observada (EIRAS; SANTOS; ZAMPA, 2010). Assim, essa goma apresenta-se como um material promissor para a realização de estudos no desenvolvimento de sensores eletroquímicos.

3.6.3 Galactomananas

As galactomananas são heteropolissacarídeos com uma estrutura básica composta de uma cadeia linear de resíduos de manose unidas por ligações glicosídicas $\beta(1-4)$, a qual os resíduos de galactose estão unidos por ligações do tipo $\alpha(1-6)$ (Figura 4), onde a distribuição de galactose na cadeia principal varia de acordo com a espécie botânica e controla as propriedades tais como a viscosidade, solubilidade e estabilidade das soluções desse polissacarídeo (VALENGA, 2012).

A goma da árvore Carolina (*Adenantha pavonina* L.) (Figura 5), apresenta a composição clássica das galactomananas, sendo constituída por uma cadeia principal formada por unidades de D-manopiranosose unidas por ligações $\beta(1\rightarrow4)$ apresentando ramificações de unidades D-galactopiranosose unidas por ligações $\alpha(1\rightarrow6)$, com relação manose:galactose (man:gal) 1,8:1 (NOBRE, 2012).

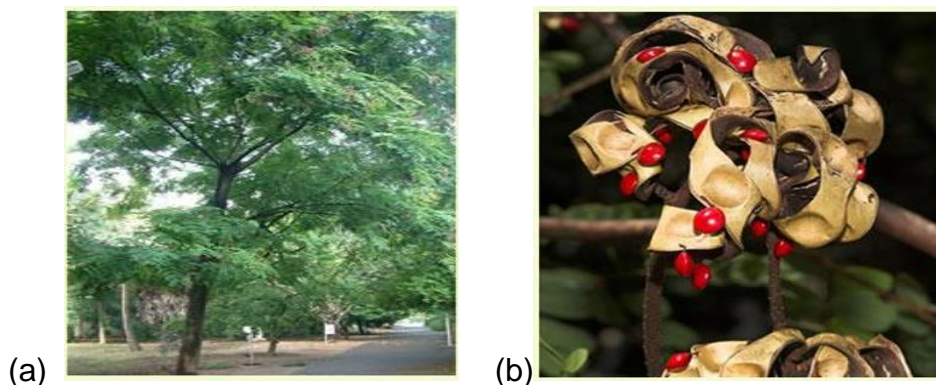
Figura 4. Estrutura geral das galactomananas.



Fonte: Nobre (2012).

As galactomananas dão origem a soluções aquosas de alta viscosidade mesmo a baixas concentrações (0,5 a 1%) o que as torna comercialmente úteis principalmente como agentes espessantes na indústria alimentícia e farmacêutica (NOBRE, 2012). Assim, os filmes de galactomananas vêm sendo usados para diversas finalidades (EIRAS et al., 2007) sendo que esses polissacarídeos têm sido usados na fabricação de filmes finos para a imobilização de biomoléculas e no desenvolvimento de biossensores (VALENGA, 2012).

Figura 5. *Adenanthera pavonina* L. (a) e suas sementes (b).



Fonte: Nobre (2012).

3.7 Sensores e biossensores eletroquímicos

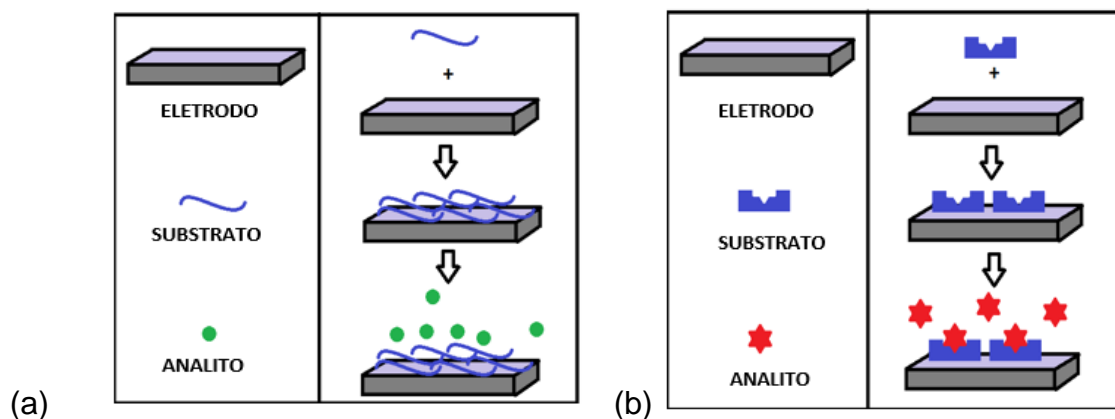
Os sensores químicos são dispositivos que possibilitam a obtenção de informações com manipulação mínima do sistema onde estão inseridos gerando resultados que podem ser analisados e correlacionados com outros parâmetros do ambiente, onde a obtenção da informação analítica depende essencialmente da capacidade da membrana, usualmente posicionada na extremidade do dispositivo, em reconhecer a espécie de interesse. (LOWINSOHN; BERTOTTI, 2006).

Os sensores químicos são dispositivos de grande uso no campo da instrumentação analítica devido ao fato de possuírem características peculiares que os distinguem de outros métodos instrumentais. Além disso, os sensores eletroquímicos são dispositivos simples (TUNER et al., 1987) os quais veem se destacando por serem precisos, sensíveis e seletivos, além de permitirem a

obtenção de informações *in situ* e em tempo real. Outras características vantajosas do uso de sensores eletroquímicos referem-se à sua portabilidade, facilidade de automação, possibilidade de miniaturização e baixo custo (LOWINSOHN et al., 2006).

Quando em um dispositivo sensor, o elemento de reconhecimento for uma substância de natureza biológica (enzimas, células, anticorpos, proteínas), teremos um biossensor, ou seja, o biorreceptor consiste em uma biomolécula capaz de reconhecer um analito específico através da sua bioafinidade. O biorreceptor ao interagir com o analito produz um sinal químico (por exemplo, uma reação redox), que ao ser enviado para o transdutor, é convertido em um sinal mensurável (como corrente elétrica, por exemplo) (YAMANAKA et al., 2009). A Figura 6 apresenta o esquema ilustrativo de (a) um sensor eletroquímico (b) um biossensor eletroquímico.

Figura 6: Esquema ilustrativo de (a) um sensor e (b) um biossensor eletroquímico.



Fonte: Arquivo próprio

3.8 Análise de Fármacos Antineoplásicos

3.8.1 Importância

Para Zampieri(2013) os antineoplásicos são uma das classes de produtos farmacêuticos com maior potencial para causar efeitos prejudiciais ao meio ambiente e aos seres vivos. Entre os grupos que estão sob risco considerável de exposição a esses fármacos, podemos citar os próprios pacientes, os trabalhadores das indústrias farmacêuticas, os trabalhadores que preparam e administram fármacos,

os profissionais de saúde que cuidam dos pacientes, o pessoal relacionado à limpeza, os familiares dos pacientes e os pesquisadores (MARTINS; ROSA, 2004).

Como exemplos de fármacos utilizados para o tratamento do câncer podem ser citados o metotrexato (WEY et al, 2014), a ciclofosfamida e a ifosfamida (HASSAN et al, 1998), flutamida (BRAHMAN et al, 2012), entre outros.

Estudos comprovam que alguns quimioterápicos antineoplásicos em determinados níveis de exposição ocupacional podem ocasionar danos à saúde dos trabalhadores. Os efeitos promovidos podem ser imediatos (dermatite, hiperpigmentação da pele e outros) ou tardios (alopecia parcial, anormalidades cromossômicas e aumento do risco de desenvolver câncer) (MAIA; BRITO, 2011).

Além disso, os quimioterápicos são considerados potencialmente mutagênicos, carcinogênicos, teratogênicos, fetotóxico e esterilizantes sendo os efeitos carcinogênicos difíceis de demonstrar, uma vez que os cânceres, na maioria dos casos se manifestam clinicamente a partir dos 20 a 30 anos após a primeira exposição química (MAIA; BRITO, 2011).

A partir da possibilidade de contato com esses fármacos, não há conhecimento de um nível de exposição que seja considerado seguro, ao qual não se evidenciem efeitos tóxicos, sendo, portanto, necessário que essa exposição seja mantida dentro dos níveis mais baixos possíveis (MARTINS; ROSA, 2004).

Desta forma, o monitoramento de medicamentos antineoplásicos apesar de ser de grande interesse ainda se depara com grandes dificuldades tanto de ordem técnica quanto analítica, não existindo um padrão adequado em relação ao tipo de amostragem ou ao método de análise que permita uma avaliação do risco promovido pela exposição aos mesmos (MARTIN; ROSA, 2004).

Outro fator importante no monitoramento da concentração de drogas antineoplásicas é a possibilidade de otimização da terapia utilizada e o melhor manejo de efeitos colaterais nos pacientes (FLOREA et al., 2015).

Para FLOREA et al., 2015, o desenvolvimento de sistemas de sensoriamento eletroquímico para a detecção de drogas antineoplásicas tem atraído grande interesse pela possibilidade de mensurar a concentração desses fármacos em amostras com alta sensibilidade, baixo custo e curto tempo de análise.

Assim, a literatura já descreve o desenvolvimento e caracterização de alguns sensores eletroquímicos para a análise de fármacos antineoplásicos onde podem

ser citados a modificação de eletrodos de pasta de carbono com polímero de ácido glutâmico para determinação de flutamida (BRAHMAN et al, 2012); um sensor eletroquímico à base de um eletrodo de carbono vítreo modificado com poli (L-lisina) para detecção de metotrexato (WEY et. al, 2014); um sensor à base de PVC carboxilado para detecção de ciclofosfamida e ifosfamida em amostras farmacêuticas (HASSAN et al, 1998), entre outros.

Esses sensores podem vir a ser de extrema utilidade no controle de exposição ocupacional e ambiental, á medida que são capazes de detectar agentes antineoplásicos em baixíssimas concentrações, a sua utilização para monitoramento das concentrações plasmáticas dos fármacos em pacientes em tratamento também se mostra como uma alternativa promissora para o uso desses sistemas.

3.8.2 O antineoplásico Metotrexato

O Metotrexato (MTX) é um quimioterápico antineoplásico com ação metabólica bloqueadora da síntese de ácido desoxirribonucléico, do inglês *Desoxiribonucleic Acid (DNA)*, e análogo ao ácido fólico (ALMEIDA et al., 2005). É utilizado no tratamento de diversos tumores. No entanto, pode provocar efeitos colaterais tóxicos para as células normais, bem como vários efeitos adversos (ex. hepatotoxicidade, colite ulcerativa, nefrotoxicidade), devido a sua característica mutagênica (FERREIRA et al., 2015).

Entre os efeitos adversos mais comuns podemos citar ainda náuseas, vômitos, anemia, neutropenia, diarreia, depressão da medula óssea, mucosite, entre outros (KHAN et al., 2012). Além de ser utilizado como antineoplásico, o MTX tem sido utilizado no tratamento da psoríase, de doenças reumatológicas e até mesmo na interrupção medicamentosa da gravidez (KHAN et al., 2012) e como tratamento para gravidez ectópica (FARIAS-FILHO et al., 2014).

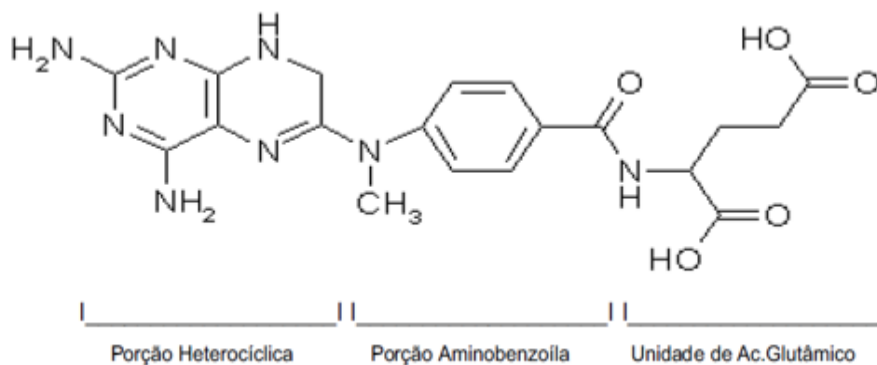
A molécula é constituída de uma porção heterocíclica (anel pteridínico 2-4 diamino substituído) ligado a uma porção aminobenzoíla que se liga a uma unidade de ácido glutâmico por uma ligação amida (Figura 7) (LELES, 2008).

O MTX age principalmente pelo bloqueio competitivo da enzima dihidrofolato redutase, responsável pela conversão do ácido dihidrofólico a ácido tetrahidrofólico. A falha na produção do ácido tetrahidrofólico leva a falhas na síntese protéica,

inibindo ainda a produção de timidina e interferindo assim na mitose celular (KHAN et al., 2012).

Por tratar-se de um fármaco de baixo índice terapêutico, com potencial para promover toxicidade, existe a necessidade de acompanhamentos criteriosos em decorrência da sua utilização terapêutica, onde apesar de existir uma relação dose-efeito bem definida, situações clínicas como nefropatias, hepatopatias, entre outras, ou ainda grupos específicos como idosos, gestantes, neonatos, fumantes, imunodeprimidos, entre outros, justificam um controle ainda mais rigoroso de suas concentrações plasmáticas (LELES, 2008).

Figura 7: Estrutura Molecular do Metotrexato



Fonte: Leles (2008).

Além disso, o MTX é um composto altamente polar com bioacumulação negligenciável e sorção em matéria orgânica, no qual até 90% do fármaco inalterado pode ser excretada pela urina e fezes (LUTTERBECK et al., 2015).

O MTX é ainda exemplo de um antineoplásico que já foi encontrado na urina de funcionários e nas superfícies de centros oncológicos, em águas residuais e em ambientes marinhos em concentrações de até ng/L (AGUIRRE-MARTÍNEZ et al., 2016; FLORIDIA et al., 1999; IDDER et al., 2013)

Assim, o desenvolvimento de metodologias analíticas rápidas, práticas e baratas para análise desse fármaco podem trazer grandes vantagens em diferentes campos da ciência, uma vez que podem vir a ser utilizados na análise de produtos farmacêuticos, na análise de contaminação ambiental, para controle de exposição ocupacional e até mesmo para a otimização da terapia utilizada e o melhor manejo de efeitos colaterais em pacientes.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, F. C.; BARBANTE C. Nanoscience, nanotechnology and spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 86, p.3-13, 2013.
- AGUIRRE-MARTÍNEZ, G. V. et al. Is the step-wise tiered approach for ERA of pharmaceuticals useful for the assessment of cancer therapeutic drugs present in marine environment? **Environmental Research**, v. 144, 2015.
- ALEIXO, L. M. Voltametria: conceitos e técnicas, **Chemkeys**, 2003.
- ALMEIDA, V. L. et al. Cancer and cell-cycle specific anti-neoplastic agents and non-cell cycle specific that interact with *DNA*: An Introduction (in Portuguese). **Química Nova**, v. 28, p. 118-129, 2005.
- ARIGA, K.; NAKANISHI, T.; MICHINOBU, T. Immobilization of biomaterials to nanoassembled films (self-assembled monolayers, Langmuir-Blodgett films, and layer-by-layer assemblies) and their related functions. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v.6, n. 8, p. 2278-2301, 2006.
- BASELT, D. R.; BALDESCHWIELER, J. D. Cantilever Atomic Force Microscope. **Rev. Sci. Instr.**, v. 64, p. 908-911, 1993.
- BASTOS, V. D. **Etnol, Alcoolquímica e Biorrefinarias**. BNDES Setorial. Rio de Janeiro, n. 25, p. 5-38, 2007.
- BINNING, G.; QUATE, C. F. Atomic Force Microscope. **Phys. Rev. Lett**, v. 930, p. 56, 1986.
- BLYTHE, T.; BLOOR, D. In *Electrical properties of polymers*. 2nd Ed. Cambridge University press, 2002
- BRESNAHAN, T. F.; TAJTENBERG, M. General purpose technologies: engines of growth. **J. Econom.**, v. 65, p. 83-108, 1995.
- BRINKER, C. J.; SCHERER, G. W. *Sol-gel science the physical and chemistry of Processing*. **Academic Press**, Boston, 1990.
- CARVALHO, P. E.R. Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento, Circular Técnica, EMBRAPA, Angico-branco, 2002
- CARVALHO, C. L.; VARELA, J. A. Construção e caracterização de um equipamento para deposição de filmes pela técnica de dip-coating. **Revista de Física Aplicada e Instrumentação**, v.14, n. 4, p.115-119, 2001.
- CHENG, M. M. et al. **Nanopartículas De Ouro Estabilizadas Em Matriz De Quitosana: Preparação, Caracterização E Imobilização Em Filmes Multicamadas** - Dissertação (Mestrado), UFPI, Teresina, PI, 2011.

CHERNY, D. I. et al. Analysis of various sequence-specific triplexes by electron and atomic force microscopies, **Biophys**, v. 74, p. 1015, 1998.

CRESPILHO, F. N. et al. Enzyme immobilization on Ag nanoparticles/polyaniline nanocomposites. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, p. 3073-3077, 2009.

DECHER, G. Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites. **Science**, v. 277, p. 1232-1237, 1997.

DE OLIVEIRA, R. F.; XAVIER, A. C. F.; DE BARROS, A.; FERREIRA, M. Filmes nanoestruturados: técnicas de Langmuir Blodgett (LB) e Layer-by-layer (LBL). **Nanoestruturas**, v.1, p. 123-145, 2015.

DE SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: Aspectos teóricos. **Quim. Nova**, v. 26, N. 1, p. 81-89, 2003.

DURAN, N.; MATOSSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação. **Artliber**, p. 13-68, 2006.

EGAWA, Y. et al. Electrochemical and optical sugar sensors based on phenylboronic acid and its derivatives. **Materials Science and Engineering: C**, v. 31, n. 31, p. 1257-1264, 2011.

EIRAS, C. et al. Nanocompósitos eletroativos de poli-o-metoxianilina e polissacarídeos naturais. **Quím. Nova**, v. 30, n.5, 2007.

EIRAS, C.; SANTOS, A. C.; ZAMPA, M. F.; et al. Natural polysaccharides as active biomaterials in nanostructured films for sensing. **J. Biomater. Science**. v. 21, p. 1533-1544, 2010.

EMERICH, D. F.; THANOS, C. G. Nanotechnology and medicine. **Expert Opin Biol Ther**, v. 3, p. 655-663, 2003.

FARIAS, E. A. O. et al. Development and characterization of multilayer films of polyaniline, titanium dioxide and CTAB for potential antimicrobial applications. **Materials Science & Engineering. C, Biomimetic Materials. Sensors and Systems (Print)**, v. 35, p. 449-454, 2014.

FARIAS-FILHO, F. A. et al. Metotrexato no tratamento da gravidez ectópica: análise retrospectiva de riscos em protocolo terapêutico. **Rev. Bras. Farm. Hosp. Serv. Saúde São Paulo**, v. 5, n. 1, p. 48-53, 2014.

FERREIRA, M. et al. Optimization of nanostructured lipid carriers loaded with methotrexate: A tool for inflammatory and cancer therapy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 492(1-2), p. 65-72, 2015.

FLOREA, A. et al. Anticancer drug detection using a highly sensitive molecularly imprinted electrochemical sensor based on an electropolymerized microporous metal organic framework. **Talanta**, v. 138, p. 71-76, 2015.

FLORIDIA, L. et al. High-performance liquid chromatography of methotrexate for environmental monitoring of surface contamination in hospital departments and assessment of occupational exposure. **Journal of Chromatography B**, v. 726(1-2), 1999.

GALEMBECK, A. **Aplicação Da Técnica De Decomposição Dos Precursores Metalôrgânicos (Mod) À Obtenção De Filmes Finos De Óxidos E Heteroestruturas Planares Óxido/Polímero Condutor** - Tese (Doutorado), UNICAMP, Campinas, SP, 1998.

GAMBINOSSI, F.; BAGLIONI, P.; CAMINATI, G. Hybrid LbL/LB films as molecular OLEDs: an acoustic shear wave attenuation and Brewster angle microscopy study. **Materials Science and Engineering C**, v. 27, n.5–8, p.1056–1060, 2007.

GAO, L. et al. Anodic voltammetric behaviors of methotrexate at a glassy carbon electrode and its determination in spiked human urine. **Journal of Electroanalytical Chemistry**. v. 610, p. 131–136, 2007.

GUIMARÃES, J. A. Estudo de filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett visando o desenvolvimento de biossensor de Colesterol, UFRJ-COPPE, Rio de Janeiro, 2009.

HARRIS, D. C. Análise Química Quantitativa. Livros Técnicos e Científicos, Editora S.A, Rio de Janeiro, 2003.

HOLDER, E.; LANGEVELD, B. M. W.; SCHUBERT, U. S. New trends in the use of transition metal-ligand complexes for applications in electroluminescent devices. **Advanced Materials**, v. 17, p. 1109-1121, 2005.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. Princípios de Análise Instrumental, 6ª ed, Editora Bookman, 2009.

IDDER, S. et al. Quantitative on-line preconcentration-liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry method for the determination of pharmaceutical compounds in water. **Analytica Chimica Acta**, v. 805, p. 107-115, 2013.

ISLAM, N.; MIYAZAKI, K. Nanotechnology innovation system: Understanding hidden dynamics of nanoscience fusion trajectories. **Technological Forecasting and Social Change**, v. 76, p. 128-140, 2009.

JAMES, J. Z.; LUCAS, D.; KOSHLAND, C. P. Gold Nanoparticle Films As Sensitive and Reusable Elemental Mercury. **Sensors Environ. Sci. Technol**, v.46, n. 17, p. 9557–9562, 2012.

KHAN, Z. A. et al. Methotrexate: a detailed review on drug delivery and clinical aspects. **Expert Opinion. Drug Deliv.** v.9, n.2, p. 151-164. 2012.

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, v. 56, p. 1-24, 1997.

LELES, R. N. **Monitorização terapêutica do metotrexato sob altas doses, em pacientes portadores de leucemia finfoblástica aguda**. 72f. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Farmácia Da Universidade Federal De Goiás, 2008.

LORENZI, H. Flora brasileira: Arecaceae (palmeiras). 1 ed. São Paulo: Nova Odessa, 2010, 367p.

LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos. **Quím. Nova**, v. 29, n. 6, p.1318-1325, 2006.

LU, P.; HSIEH Y. Layer-by-layer self-assembly of Cibacron Blue F3GA and lipase on ultra-fine cellulose fibrous membrane. **Journal of Membrane Science**, v. 348, p. 21–27, 2010.

LUTTERBECK, C. A. et al. Removal of the anti-cancer drug methotrexate from water by advanced oxidation processes: Aerobic biodegradation and toxicity studies after treatment. **Chemosphere**, v. 141, p. 290-296, 2015.

MAIA, P. G.; DE BRITO, J. C. Riscos relacionados à exposição de trabalhadores a quimioterápicos antineoplásicos: uma análise crítica da produção científica brasileira. **Revista Tempus Actas de Saúde Coletiva**, p. 251-265, 2011.

MANDLER, D.; TURRYAN, I. Applications of self-assembled monolayers in electroanalytical chemistry. **Electroanalysis**, v. 8, n. 3, p. 207-213, 1993.

MANTHA, S. et al. Nanocomposite Layer-by-Layer Assembled Catalytic Interfaces for Biosensing Applications. **Langmuir**, v. 26, n 24, p. 19114–19119, 2010.

MARLETTA, A. et al. Photo-irradiation effectson the surface morfology of poly(p-phenylene vinylene) films. **Applied Surface Science**, v. 256, p. 3018-3023, 2010.

MARQUES, P. R. B. D. O.; YAMANAKA, H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1791–1799, 2008.

MARTINS, I. DELLA ROSA, H. V. Considerações toxicológicas da exposição ocupacional aos fármacos antineoplásicos. **Rev. Bras. Med. Trab.** v. 2, n. 2, p. 118-125, 2004.

MARTINS, I. **Avaliação da exposição de profissionais da área da saúde à ciclofosfamida** – Tese (Doutorado), Universidade de São Paulo, SP, 2003.

NASCIMENTO, U. S. **Carvão de babaçu como fonte térmica para sistema de refrigeração por absorção no estado do Maranhão** - Trabalho Final (Mestrado Profissional, Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

NEGREIRA, N., DE AIDA, M. L., & BARCELO, D. Cytostatic drugs and metabolites in municipal and hospital wastewaters in Spain: Filtration, occurrence, and environmental risk. **Science of the Total Environment**, v. 497, p. 68-77, 2014.

NOBRE, K. A. **Avaliação de Galactomanana da Adenantha pavonina na Formação de Sistemas Matriciais** - Tese (Doutorado), UFCE, Fortaleza, CE, 2012.

NUSSBAUMER, S. et al. Analysis of anticancer drugs: A review. **Talanta**, v. 85, n. 5, p. 2265–2289, 2011.

PATERNO, L. G.; MATTOSO, L. H. C.; De OLIVEIRA Jr, O. N. Filmes poliméricos ultrafinos produzidos pela técnica de automontagem: preparação, propriedades e aplicações. **Quím. Nova**, v. 24, n. 2, p. 238-235, 2001.

PEIXOTO, A. R. **Plantas Oleaginosas Arbóreas**. Biblioteca Rural. Ed. Nobel S.A.. São Paulo, 1973.

RAO, M. G.; BHARATHI, P.; AKILA, R. M. A Comprehensive Review On Biopolymers. **Sci. Revs. Chem. Commun**, v. 4, n. 2, p. 61-68, 2014.

SABATANI, E. et al. Organized self-assembling monolayers on electrodes. Part I. Octadecyl derivatives on gold. **J. Electroanal. Chem.**, v. 219, p. 365–371, 1987.

SANTOS, A. C. et al. Organização supramolecular da ftalocianina de cobalto (II) e seu efeito na oxidação do aminoácido cisteína. **Quim. Nova**, v. 33, n. 3, p. 539-546, 2010.

SCHWARTZ, D. K. Mechanisms and kinetics of self-assembled monolayer formation. **Annu. Rev. Phys. Chem**, v. 52, p. 107–137, 2001.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, J. F.; CROUCH, S. R. Fundamentos de química analítica, 1ª ed, 2006.

THERÉZIO, E. M. et al. A. Substrate/semiconductor interface effects on the emission efficiency of luminescent polymers. **Journal of Applied Physics**, v. 110, p. 445041-445046, 2011.

TUNER, A.; KARUBE, M. I.; WILSON, G. S. Biosensors: Fundamentals and Applications. Oxford University Press, p.770, 1987.

ULMAN, A. Thermal-stability of lagmuir-blodgett and self-assembled films- a possible scenario for order-disorder transitions. **Advanced Materials**, v. 3, n. 6, p. 298-303, 1991.

ULMAN, A. Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 4, p. 1533–1554, 1996

VALENGA, F., et al. Galactomannan thin films as supports for the immobilization of Concanavalin A and/or dengue viruses. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 1. p. 88-94, 2012.

VIEIRA, A.P. et al. Kinetics and thermodynamics of textile dye adsorption from aqueous solutions using babassu coconut mesocarp. **J. Hazard. Mater**, v. 166, p. 1272–1278, 2009.

WHISTLER, L.R; BEMILLER, J. N. Carbohydrate chemistry for food scientists. **The American Association of Cereal Chemists**, Saint Paul. 1997

WU, X. et al. Functionalized Polyfluorene Film Sensors for Sensitive Detection of Iron (III) in both Organic and Aqueous Media. **Macromolecules**, v. 43, n. 21, p. 8917–8923, 2010.

YAMANAKA, H. et al. Biossensores Eletroquímicos. **Universitat Autònoma de Barcelona**, p. 99, 2009.

ZAMPIERI, D, A., **Avaliação da presença de antineoplásico em água residuária de um hospital oncológico e do sistema de esgotamento sanitário municipal**, 54f. Dissertação (Programa de Pós- Graduação em Pesquisa e Desenvolvimento - Biotecnologia Médica) Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São Paulo, 2013.

CAPÍTULO I

SENSORES E BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS PARA ANÁLISE DE FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS

SENSORES E BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS PARA ANÁLISE DE FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS

Handerson Rodrigues Silva Lima^{1*}; Josany Saibrosa da Silva¹, Emanuel Airton de Oliveira Farias², Carla Eiras^{2,3} e Lívio César Cunha Nunes¹

1.Núcleo de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, 64049-550, Brasil. 2.Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia, BIOTEC, *Campus* de Parnaíba, UFPI, Parnaíba, PI, 64202-020, Brasil. 3.Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados - LIMAV, CT, UFPI, *Campus* Ministro Petrônio Portela, Teresina-PI, 64049-550, Brasil.

*handersonrsl@yahoo.com.br

RESUMO

O câncer é uma das principais causas de morte em todo o mundo sendo muitas vezes tratado com o uso de medicamentos antineoplásicos, que possuem alto potencial de toxicidade ao ser humano e ao meio ambiente mesmo em concentrações muito baixas, sendo o monitoramento desses fármacos de extrema importância. Dentre as técnicas de detecção de substâncias em baixas concentrações, os sensores e biossensores eletroquímicos vêm se destacando por sua praticidade e pelo baixo custo. Essa revisão traz, pela primeira vez, uma abordagem simplificada e atraente dos principais sensores e biossensores eletroquímicos até então desenvolvidos para a análise de fármacos antineoplásicos. Foram descritos os fármacos analisados bem como o princípio de cada metodologia utilizada para sensoriamento eletroquímico, relatando ainda as técnicas utilizadas para a quantificação dos fármacos e o desempenho analítico de cada sensor, destacando-se o limite de detecção (LD) encontrado bem como, o intervalo linear (IL) de quantificação para cada sistema. E finalmente, é apresentada uma prospecção tecnológica a respeito do desenvolvimento e utilização de sensores e biossensores eletroquímicos na quantificação de medicamentos antineoplásicos baseada na pesquisa de patentes nas bases do Instituto Nacional de Propriedade Industrial do Brasil (INPI), *European Patent Office (EPO)*, *World Intellectual Property Organization (WIPO)* e *United States Patent and Trademark Office (USPTO)*. Na busca realizada em março de 2017, a partir da combinação das principais palavras-chave relacionadas a este tema não foi encontrada nenhuma patente depositada até o momento, representando, portanto, uma área a ser explorada. Esta revisão demonstrou ainda que a utilização destes sistemas vem ganhando destaque nos últimos anos, e que a quantificação de antineoplásicos a partir de técnicas eletroquímicas, pode trazer grandes vantagens financeiras e para a saúde de forma geral.

Palavras-chave: sensor eletroquímico, quantificação, quimioterápico, anticâncer.

ABSTRACT

Cancer is one of the leading causes of death worldwide being often treated with the use of antineoplastic drugs that have high potential for toxicity to the human and environment even in very low concentrations, being the monitoring of these drugs of utmost importance. Among the techniques for detection of substances at low concentrations, electrochemical sensors and biosensors have been noted for their practicality and low cost. This review brings, for the first time, a simplified and attractive approach to the main electrochemical sensors and biosensors developed for the analysis of antineoplastic drugs. The drugs analyzed and the principle of each methodology used for electrochemical sensing were described, also reporting the techniques used for the quantification of the drugs and the analytical performance of each sensor, highlighting the limit of detection (LOD) found as well as the Linear Range of quantification (LR) for each system. Finally, a technological prospection was presented about the development and use of electrochemical sensors and biosensors in the quantification of antineoplastic drugs based on patent research in the Brazilian Patent Office (INPI), European Patent Office (EPO), World Intellectual Property Organization (WIPO) and United States Patent and Trademark Office (USPTO). In the search conducted in 2017, January, from the combination of the main keywords related to this topic, no patents has been found so far, therefore, an area to be explored. This review also showed that the use of these systems has been gaining prominence in recent years, and that the quantification of antineoplastics from electrochemical techniques can bring great financial and health benefits in general.

Keywords: electrochemical sensor, measuring, chemotherapy, anticancer

4.1 INTRODUÇÃO

O câncer atualmente tem sido tratado como uma epidemia global onde entre as principais formas de tratamento desta doença podem ser citados a cirurgia, a radioterapia e os tratamentos medicamentosos (SILVA et al., 2016) estes últimos se destacam pela utilização de medicamentos citotóxicos ou citostáticos para combater as células tumorais.

Porém, esses medicamentos possuem alto potencial tóxico, mutagênico e carcinogênico, oferecendo risco ocupacional (RIZALAR et al. 2012) ou mesmo a grupos de indivíduos que se encontram em risco considerável de exposição a esses fármacos, como os próprios pacientes, os trabalhadores que preparam e administram os medicamentos, os profissionais de saúde que cuidam dos pacientes, os pesquisadores, entre outros (MARTINS; ROSA, 2004).

Além disso os medicamentos antineoplásicos são muitas vezes liberados ao meio ambiente de forma completa (sem metabolização) e podem criar um grande prejuízo para o meio ambiente mesmo em baixas concentrações (LUTTERBECK et al. 2015). Assim, o monitoramento exposicional e ambiental mostram-se essenciais para a prevenção de riscos advindos da exposição a esses fármacos.

Além do monitoramento ambiental e ocupacional, o monitoramento das concentrações plasmáticas de fármacos antineoplásicos se mostra de grande importância devido à possibilidade de otimização da terapia utilizada pelos pacientes usuários e o melhor manejo dos efeitos colaterais resultantes da terapia antineoplásica (FLOREA, et al., 2015).

Apesar do exposto, o monitoramento desses fármacos ainda se depara com grandes dificuldades tanto de ordem técnica quanto analítica, não existindo um padrão adequado em relação ao tipo de amostragem ou ao método de análise que permita uma avaliação do risco promovido pela exposição aos mesmos (MARTINS; ROSA, 2004).

Entre as técnicas utilizadas para a análise dessa classe de medicamentos podem ser citadas a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) ou à fluorimetria, eletroforese capilar acoplada à detecção UV, cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), entre outras. Contudo, muitas dessas técnicas apresentam altos custos e muitas vezes

necessitam de um pré-tratamento das amostras (NUSSBAUMER et al., 2011), que, dentre outras desvantagens, podem levar à perda potencial do analito nas diferentes etapas do processo, além de muitas vezes necessitarem de metodologias entediadas e demoradas (DOGAN-TOPAL; OZKAN, 2011a).

Assim, o desenvolvimento de métodos analíticos para a detecção e quantificação desses fármacos tem ganhado bastante interesse, sendo os sensores e biossensores eletroquímicos interessantes candidatos a mensurar a concentração de antineoplásicos em amostras, devido à sua alta sensibilidade, baixo custo e rapidez com que são realizadas as análises (FLOREA et al., 2015).

Futuramente estes sistemas de sensoriamento podem vir a fornecer resultados analíticos dentro de alguns minutos, a exemplo do glicosímetro atualmente disponíveis no mercado, e assim, serem extremamente promissores para melhorar a eficiência dos tratamentos para o câncer e diminuir os riscos provenientes da exposição ocupacional. A eletroquímica pode ainda fornecer novas visões sobre o desenvolvimento de fármacos e levar a uma maior compreensão do mecanismo de interação entre as drogas antineoplásicas e o ácido desoxiribonucléico do inglês desoxiribonucleic acid (*DNA*) (DOGAN-TOPAL; OZKAN, 2011b).

Assim, esse trabalho objetiva mostrar para o leitor o cenário atual relacionado ao desenvolvimento de sensores e biossensores eletroquímicos no monitoramento de drogas antineoplásicas, trazendo, até onde foi pesquisado, pela primeira vez na literatura, um relato dos principais sensores e biossensores eletroquímicos até então desenvolvidos para a análise de fármacos antineoplásicos. A revisão apresenta ainda uma breve descrição dos fármacos analisados, bem como, o princípio de cada metodologia utilizada no processo de sensoriamento, destacando-se o limite de detecção encontrado bem como o intervalo linear de quantificação dos mesmos.

4.2 Sensores eletroquímicos para análise de fármacos antineoplásicos

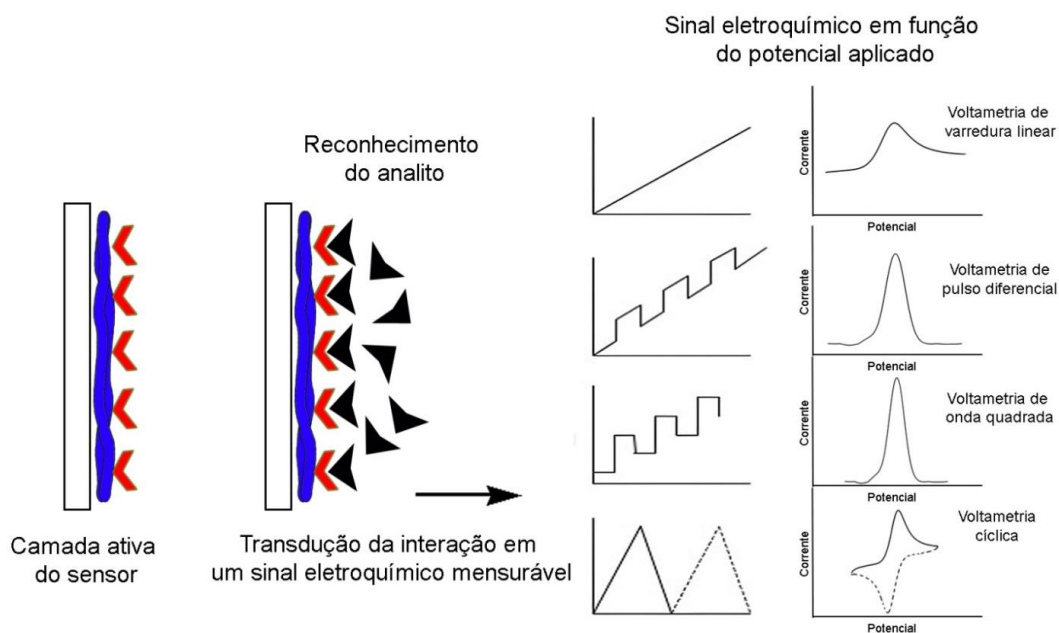
Os sensores químicos são dispositivos que possibilitam a obtenção de informações com manipulação mínima do sistema onde estão inseridos gerando resultados que podem ser analisados e correlacionados com outros parâmetros do ambiente, onde a obtenção da informação analítica depende essencialmente da

capacidade da membrana, usualmente posicionada na extremidade do dispositivo, em reconhecer a espécie de interesse, como por exemplo, uma droga antineoplásica. O elemento sensor deve estar acoplado a um transdutor, que será responsável por converter a interação analito-elemento sensor em um sinal analítico mensurável (LOWINSOHN; BERTOTTI, 2006), como por exemplo, um sinal de corrente elétrica, capacitância, pontencial, entre outros, a depender do tipo de transdutor empregado.

A Figura 8 mostra o esquema geral do funcionamento de um sensor eletroquímico. Nesta Figura são mostradas, resumidamente, as diferentes formas de aplicar o potencial elétrico, bem como modelos de resposta de corrente obtidos por diferentes técnicas de voltametria.

A camada ativa do sensor, Figura 8, pode ser composta pelos mais variados tipos de receptores, conforme serão exemplificados mais a frente. Vale ressaltar ainda que existem eletrodos dos mais variados tipos de materiais: ouro (HAJIAN et al., 2015), platina (RADHAPYARI et al., 2013), carbono (WEI et al., 2014), à base de vidro recoberto com óxidos (RADHAPYARI; KHAN, 2015), entre outros, que podem ser utilizados como transdutores na confecção de sensores e biossensores eletroquímicos.

Figura 8. Esquema de um sensor eletroquímico.



Fonte: Arquivo próprio

Assim, o emprego de sensores eletroquímicos para monitoramento da concentração de moléculas de relevância biológica tem sido objeto de investigações crescentes em Eletroanalítica (LOWINSOHN; BERTOTTI, 2006).

Para Erdem, Karadeniz e Caliskan (2011) tem havido um considerável interesse no desenvolvimento de sensores eletroquímicos, devido à sua importante aplicação no diagnóstico clínico, na medicina, na prevenção de epidemias, na proteção do meio ambiente e na bioengenharia.

A literatura científica já aborda o desenvolvimento e utilização de alguns sensores eletroquímicos para a determinação de fármacos antineoplásicos. A Tabela 1 sumariza alguns dos principais sensores eletroquímicos encontrados. Estes por sua vez foram desenvolvidos empregando-se diferentes materiais e técnicas eletroquímicas.

Tabela 1. Sensores eletroquímicos para detecção de antineoplásicos.

ARTIGO	ELETRODO MODIFICADO	FÁRMACO DETECTADO	TÉCNICA USADA	LIM. DET (molL ⁻¹)	INT .LINEAR (molL ⁻¹)	REFERÊNCIA
A novel 5-fluorouracile anticancer drug sensor based on ZnFe ₂ O ₄ magnetic nanoparticles ionic liquids carbon paste electrode	(EPC/LI/NPM-ZnFe ₂ O ₄) Eletrodo de pasta de carbono modificado com nanopartículas magnéticas de ZnFe ₂ O ₄ e líquido iônico de brometo de 1,3-dipropylimidazol	5-fluoruracila	(do inglês SWV) Voltametria de Onda quadrada	7x10 ⁻⁸	0.1 to 1400x10 ⁻⁶	(SHOJAEI et al., 2016)
Adsorptive stripping voltammetric determination of anticancer drug lomustine in biological fluids using in situ mercury film coated graphite pencil electrode	(PGE/FM) Pencil grafite electrodes revestidos com filme de mercúrio	Lomustina	Voltametria de adsorção catódica de onda quadrada	8.13x10 ⁻⁸	1.92x10 ⁻⁷ a 1.36x10 ⁻⁵	(TEMERK et al., 2016)
Anticancer drug detection using a highly sensitive molecularly imprinted electrochemical sensor based on an electropolymerized microporous metal organic framework	(EOMM/GMT) Estrutura organometálica microporosa para gencitabina	Gencitabina	(VVL) Voltametria de varredura linear	3x10 ⁻¹⁵	3.8x10 ⁻¹⁵ a 38x10 ⁻⁹	(FLOREA et al., 2015)
Dendrimer modified graphite sensors for detection of anticancer drug Daunorubicin by voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy	(EGP/PAMAM) Eetrodos de grafite pirolítico modificados com dendrimero G4 PAMAM	Daunorubicina	(VPD) Voltametria de pulso diferencial	128x10 ⁻⁹	-	(ERDEM et al., 2011)

ARTIGO	ELETRODO MODIFICADO	FÁRMACO DETECTADO	TÉCNICA USADA	LIM. DET (molL ⁻¹)	INT .LINEAR (molL ⁻¹)	REFERÊNCIA
Determination of methotrexate and folic acid by ion chromatography with electrochemical detection on a functionalized multi-wall carbon nanotube modified electrode	(ECV/NTCMF-q) Eletrodos de carbono vítreo modificados com nanotubos de carbono multicamadas funcionalizados com amina quaternária	Metotrexato	Cromatografia iônica com detecção eletroquímica	0,4x10 ⁻⁹	0,2 x10 ⁻⁷ a 0,4 x10 ⁻⁴	(ZHU et al., 2013)
Electroanalysis and simultaneous determination of 6-thioguanine in the presence of uric acid and folic acid using a modified carbon nanotube paste electrode	(EPC/2,7-BF) Eletrodo de pasta de carbono modificado com 2,7-bis(ferrocenil etil)fluoren-9-ona	6-tioguanina	VPD	22x10 ⁻⁹	Dois intervalos: 0.06 a 10x10 ⁻⁶ e 10 a 160x10 ⁻⁶	(BEITOLLAHI et al., 2011)
Electrochemical preparation of sodium dodecylsulfate doped over-oxidized polypyrrole/multi-walled carbon nanotube composite on glassy carbon electrode and its application on sensitive and selective determination of anticancer drug: Pemetrexed	(ECV/NTCMF-COOH/PPO) Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono multicamadas funcionalizado e polipirrol superoxidado	Permetrexed	(AdSDPV) Adsorptive stripping Differential Pulse Voltammetry	3.28x10 ⁻⁹	1x10 ⁻⁸ a 1x10 ⁻⁷	(KARADAS; OZKAN, 2014)
Electrochemical sensor for ultrasensitivedetermination of doxorubicin and methotrexate based on cyclodextrin-graphene hybrid nanosheets	(ECV/CD-GN) Eletrodo de carbono vítreo modificado com híbrido ciclodextrina-grafeno	(Doxorrubicina) [Metotrexato]	VPD	(0.1x10 ⁻⁹) [20 x10 ⁻⁹]	(10x10 ⁻⁹ a 0,2x10 ⁻⁶) e [0,1x10 ⁻⁶ a 10 ⁻⁶]	(GUO et al., 2011)
Electrochemical study of the anticancer drug daunorubicin at a water/oil interface: drug lipophilicity and quantification.	Sensor baseado na transferência direta de íons na microinterface água/diclorohexano	Daunorubicina	VPD	0.8x10 ⁻⁶	12 a 82x10 ⁻⁶	(RIBEIRO et al., 2013)
Fabrication of an electrochemical sensor based on carbon nanotubes modified with gold nanoparticles for determination of valrubicin as a chemotherapy drug: Valrubicin-DNA interaction	(EO/NTCM/ED/NPO) Eletrodo de ouro modificado com, etilenodiamina, nanotubos de carbono multicamadas e nanoparticulas de ouro	Valrubicina	(VC) Voltametria cíclica	0.018x10 ⁻⁶	0.5 a 80x10 ⁻⁶	(HAJIAN et al., 2015)

ARTIGO	ELETRODO MODIFICADO	FÁRMACO DETECTADO	TÉCNICA USADA	LIM. DET (molL ⁻¹)	INT .LINEAR (molL ⁻¹)	REFERÊNCIA
Highly sensitive determination of methotrexate at poly (l-lysine) modified electrode in the presence of sodium dodecyl benzene sulfonate	(ECV/PLL) Eletrodo de carbono vítreo modificado com poli (l-lisina)	Metotrexato	SWV	1.7x10 ⁻⁹	5x10 ⁻⁹ a 0.2x10 ⁻⁶	(WEI et al., 2014)
Microcoated wire sensors for the determination of anticancer drugs cyclophosphamide and ifosphamide in the presence of their degradates	(PVC-COOH) Sensor de membrana de cloreto de polivinila carboxilada	Ciclofosfamida e ifosfamida	Potenciometria	-	10 ⁻³ a 10 ⁻⁵ para ambos	(HASSAN et al., 1998)
Synthesis of Ag nanoparticles for the electrochemical detection of anticancer drug flutamide	(ECV/NP-Ag) Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanoparticulas de prata	Flutamida	VPD	9.33x10 ⁻⁶	10 a 1000x10 ⁻⁶	(AHMADI et al., 2015)
The First Electrochemical MIP Sensor for Tamoxifen	(MIP-TAM) Sensor de impressão molecular para o tamoxifeno	Tamoxifeno	VC	-	1 a 100x10 ⁻⁹	(YARMAN; SCHELLER, 2014)
Ultrasensitive electrochemical sensing of the anticancer drug tirapazamine using an ordered mesoporous carbon modified pyrolytic graphite electrode	(EGO/CMO) Eletrodo de grafite pirolítico modificado com carbono mesoporoso ordenado	Tirapazamina	VPD	2x10 ⁻¹¹	5x10 ⁻¹¹ a 1.5x10 ⁻⁵	(HU et al., 2009)
Voltammetric determination of anticancer drug flutamide in surfactant media at polymer film modified carbon paste electrode	(EPC-PAG) Eletrodo de pasta de carbon modificado com filme polimérico de ácido glutâmico	Flutamida	VPD	0.18X10 ⁻⁶	0.72 a 5.8x10 ⁻⁴	(BRAHMAN et al., 2012)

Fonte: Arquivo próprio.

4.2.1. Sensores eletroquímicos que empregam materiais nanométricos.

A nanotecnologia tem sido considerada como uma tecnologia de uso geral, sendo comum para quase todos os setores tecnológicos, devido ao fato de que as interações existentes entre diferentes materiais quando os mesmos se encontram em escala nanométrica (10^{-9} m) são capazes de gerar novas propriedades (BRESNAHAN; TAJTENBERG, 1995) onde podem ocorrer fenômenos únicos, diferentes daqueles observados na escala macroscópica, surgindo assim a possibilidade de novas aplicações para esses materiais (ADAMS; BARBANTE, 2013).

Alguns materiais nanométricos, tais como nanotubos de carbono (ZHU et al., 2013; KARADAS; OZKAN, 2014), nanopartículas de ouro (HAJIAN et al., 2015) e de prata (AHMADI et al., 2015), entre outros, têm demonstrado potencial para o desenvolvimento de sistemas de sensoriamento, e alguns desses materiais já mostraram resultados promissores no desenvolvimento de sensores eletroquímicos para a determinação de fármacos antineoplásicos, tais como o metotrexato (ZHU et al., 2013), a flutamida (AHMADI et al., 2015), entre outros.

O metotrexato é um fármaco análogo do ácido fólico, que atua como agente antimetabólito ao combinar-se firmemente com a enzima dihidrofolato redutase e inibir a conversão de di-hidrofolato a tetrahidrofolato que é necessário na síntese de DNA, RNA e proteínas, interferindo assim na mitose celular. Por esse motivo, o MTX é comumente usado no combate ao câncer de mama, câncer de cabeça e pescoço e câncer de bexiga (WEI et al., 2014), leucemia linfoblástica aguda e outras doenças neoplásicas tendo ainda efeitos imunossupressores e anti-inflamatórios eficazmente explorados para o tratamento de outras doenças (ZHU et al., 2013).

Zhu et al. (2013) desenvolveram um sensor eletroquímico a partir da modificação de eletrodos de carbono vítreo (ECV) com nanotubos de carbono em multicamadas funcionalizados com amina quaternária (NTCMF-q) para a determinação de Metotrexato e ácido fólico.

A utilização dos NTCMF-q na modificação dos eletrodos permitiu acelerar significativamente o processo de transferência de elétrons na superfície do eletrodo modificado (ECV/NTCMF-q), catalisando a oxidação eletroquímica do metotrexato e do ácido fólico quando comparado aos eletrodos não modificados, contudo, devido à

proximidade nos potenciais de oxidação de ambos os fármacos, a determinação simultânea dos mesmos foi realizada por meio de cromatografia iônica com detecção eletroquímica. Assim, o método foi aplicado para a determinação simultânea de metotrexato e ácido fólico em plasma e urina humanos. As características do sensor encontram-se descritas na Tabela 1.

Beitollahi, Raof e Hosseinzadeh (2011) descreveram a preparação e caracterização de eletrodos de pasta de nanotubos de carbono (EPNC) modificados com 2,7-bis (etilferrocenil) fluoreno-9-ona (2,7-BF). Estes eletrodos modificados (EPNC/2,7-BF) mostraram eficiente atividade catalítica para a eletro-oxidação da 6-tioguanina, do ácido fólico e do ácido úrico de forma individual e/ou simultaneamente, sendo utilizado na análise de amostras farmacêuticas e em urina.

A droga antineoplásica 6-tioguanina é um análogo da purina utilizado como um inibidor metabólico com atividade antitumoral, para o tratamento de leucemias e linfomas (WANG; WANG; XIE, 2006). O ácido úrico é o produto final do catabolismo dos nucleosídeos de purina, sendo uma importante biomolécula presente em fluidos fisiológicos (BEITOLLAHI; RAOOF; HOSSEINZADEH, 2011).

Ahmadi et al. (2015) modificaram eletrodos de carbono vítreo (GCE) com nanopartículas de prata, utilizando calixarenos como molde para formação das nanopartículas, para a determinação de flutamida.

A flutamida é um fármaco anti-andrógeno não esteróide frequentemente utilizado para o tratamento de câncer de próstata que tem a capacidade de bloquear a ação da testosterona, um estimulante do crescimento de células cancerosas da próstata, sendo assim, mesmo não sendo capaz de curar o câncer, pode mantê-lo sob controle por longos períodos (AHMADI et al., 2015).

Os calixarenos são compostos macrocíclicos formados por unidades de compostos fenólicos ligados por pontes de metileno onde se formam cavidades hidrofóbicas, essas cavidades presentes nestes compostos permitiram que fossem utilizados como molde para a síntese de nanopartículas de prata (NP-Ag) na superfície do ECV, controlando o tamanho, a quantidade e distribuição das nanopartículas de prata produzidas, sendo posteriormente removidos do sensor (AHMADI et al., 2015).

O filme formado (ECV/NP-Ag) mostrou atividade catalítica para a redução da flutamida, onde a atividade de transferência de elétrons foi consideravelmente

melhorada em relação ao eletrodo não modificado. Este eletrodo modificado foi empregado na detecção de flutamida em urina humana e em comprimidos medicinais(AHMADI et al., 2015).

Hajian et al. (2015) desenvolveram um sensor eletroquímico para a determinação do fármaco antineoplásico valrubicina, onde eletrodos de ouro (EO) pré-tratados com nanotubos de carbono multicamadas (NTCM), foram revestidos pela deposição de filmes de etilenodiamina (ED), sendo então adicionadas nanopartículas de ouro (NPO). A valrubicina é um antineoplásico que tem sido amplamente empregada na terapia do câncer de bexiga, pertencente à classe das antraciclina de segunda geração sendo derivada da doxorubicina (HAJIAN et al., 2015).

O sensor desenvolvido por Hajian e colaboradores (2015)(EO/NTCM/ED/NPO) possibilitou um aumento na área de superfície do eletrodo e na taxa de transferência de elétrons, resultando em uma boa capacidade catalítica para a redução do referido fármaco, inclusive para análises em amostras de urina e soro sanguíneo humanos contendo valrubicina. Algumas características do sensor foram descritas na Tabela 1.

Karadas e Ozkan (2014), desenvolveram um sensor eletroquímico a partir da modificação de ECV com nanotubos de carbono multicamadas funcionalizados com ácido carboxílico (NTCMF-COOH) e poli-pirrol oxidado (PPO) para a determinação do fármaco pemetrexede.

Esse fármaco é um agente antifolato que exerce a sua ação interferindo em processos metabólicos folato-dependentes essenciais para a replicação celular, atuando como um agente antineoplásico. O seu principal alvo é a timidilato-sintase mas também inibe enzimas envolvidas na síntese de purinas, tendo demonstrado boa atividade contra o câncer de pulmão, de cabeça e pescoço, de cólon e mama (KARADAS; OZKAN, 2014)

Com o uso doPPO conseguiu-se uma melhoria na corrente de oxidação do pemetrexede, devido ao aumento da porosidade do filme e, conseqüentemente, da área superficial ativa do eletrodo. Desta forma, verificou-se que os eletrodos modificados(ECV/NTCMF-COOH/PPO) mostraram-se promissores para serem aplicados diretamente na análise do medicamento mesmo em sua forma farmacêutica (por exemplo em controle de qualidade), sem a necessidade de

qualquer separação de excipientes ou de preparação da amostra, uma vez que não foi detectada interferência de tais excipientes(KARADAS; OZKAN, 2014).

No estudo de Guo e seus colaboradores (2011), eletrodos de carbono vítreo foram modificados com nanosistemas híbridos de ciclodextrina (CD) e grafeno (GN), desenvolvendo um sensor (ECV/CD-GN) para a determinação de doxorrubicina e metotrexato, conseguindo elevada sensibilidade além de boa reprodutibilidade e estabilidade.

A performance eletroquímica dos eletrodos modificados apresentaram grandes vantagens relacionadas à elevada cinética de transferência de elétrons gerando um microambiente favorável às reações eletroquímicas desses fármacos. O sensor se mostrou promissor para a determinação de ambos os fármacos em níveis traço, e algumas de suas propriedades foram descritas na Tabela 1.

Shojaei et al. (2016) modificaram um eletrodo de pasta de carbono (EPC) com nanopartículas magnéticas de $ZnFe_2O_4$ (NPM- $ZnFe_2O_4$) e o líquido iônico brometo de 1,3-propylimidazolium (LI) para a determinação do antineoplásico 5-fluoruracila, um dos pró-fármacos mais difundidos para o tratamento do câncer, que atua como antimetabólito inibindo processos biossintéticos essenciais ou pela incorporação aos ácidos nucleicos (SHOJAEI et al., 2016).

O sensor desenvolvido (EPC/LI/NPM- $ZnFe_2O_4$) demonstrou um aumento significativo no valor da corrente de pico de oxidação da 5-fluorouracila, devido ao fato de as nanopartículas de $ZnFe_2O_4$ e o líquido iônico terem contribuído para um aumento na área superficial dos sensores, facilitando a transferência de elétrons e promovendo um aumento na oxidação do fármaco (SHOJAEI et al., 2016).

Os sensores foram usados na detecção do fármaco pelo método de adições de padrão em amostras farmacêuticas e biológicas (soro e urina)(SHOJAEI et al., 2016). Algumas características do sensor podem ser encontradas na Tabela 1.

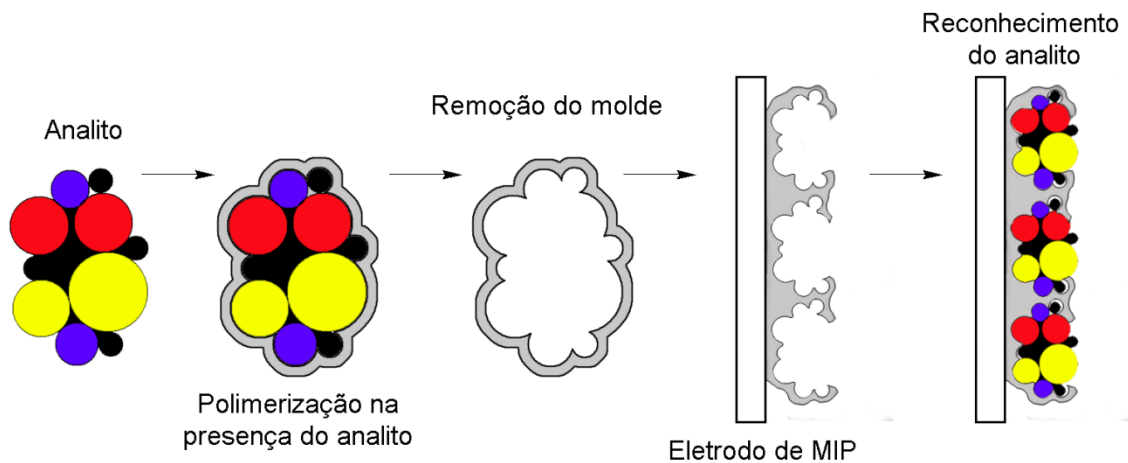
4.2.2 Sensores de impressão molecular

A técnica de impressão molecular em sensores (do inglês *molecular imprinted electrodes-MIP*), consiste na polimerização de determinados monômeros funcionais, na presença de moléculas molde com posterior extração do molde da matriz polimérica resultante, gerando um filme repleto de cavidades complementares em

forma e tamanho da molécula molde (FLOREA et al., 2015). Os sinais eletroquímicos observados a partir do contato entre esse filme e um meio contendo moléculas do analito podem ser utilizados com propósito de sensoriamento.

Além de serem de baixo custo e não necessitarem de material biológico na camada ativa, excelente especificidade tem sido observada. A dessorção do molde, Figura 9, geralmente é feita empregando-se uma solução tampão, como tampão PBS Ph 7.2 (FLOREA et al., 2015) ou misturas de solventes, como água, metanol e hidróxido de sódio (RADHAPYARI; KOTOKY; KHAN, 2013).

Figura 9. Representação esquemática de um eletrodo do tipo MIP



Fonte: Arquivo próprio

Florea et al. (2015) desenvolveram um sensor eletroquímico para análise de gencitabina utilizando a técnica de impressão molecular. Dessa forma, empregando-se a técnica de voltametria cíclica, foi realizada a eletropolimerização de nanopartículas de ouro funcionalizadas com p-aminotiofenol sobre a superfície de eletrodos de ouro, na presença de gencitabina como molécula molde. Posteriormente, o fármaco foi removido, originando uma estrutura organometálica microporosa (EOMP). Em seguida, a resposta voltamétrica do mediador redox ferrocianeto foi estudada por voltametria de varredura linear frente ao filme microporoso na ausência e na presença do fármaco.

A gencitabina é um análogo nucleosídico capaz de interferir na síntese de DNA, que é utilizado clinicamente no tratamento de vários carcinomas, tais como o câncer de pulmão, pâncreas, no câncer de mama metastático entre outros. Quando

o filme microporoso EOMP foi posto em contato com moléculas desse fármaco, estas foram reincorporadas ao filme, assim, o contato da gencitabina com as cavidades disponíveis na superfície do eletrodo promoveu alterações nos voltamogramas de varredura linear, por facilitar a transferência de elétrons entre o mediador ferrocianeto e a superfície do eletrodo, de forma proporcional à quantidade do analito no meio, em um dado intervalo de concentração (FLOREA et al., 2015).

O sensor desenvolvido foi utilizado para a detecção de gencitabina em amostras de soro enriquecidas com padrão e em formulações medicamentosas (FLOREA et al., 2015).

Yarman e Scheller (2014) partiram da eletropolimerização do *o*-fenileno-diamina-resorcinol na superfície de um eletrodo de carbono vítreo, empregando a técnica de voltametria cíclica, na presença de uma molécula molde de tamoxifeno, para desenvolver um sensor impresso para a quantificação desse fármaco. Em seguida, a resposta voltamétrica do mediador redox ferrocianeto foi estudada por voltametria cíclica frente ao sensor impresso na ausência e na presença do referido fármaco.

O tamoxifeno (TAM) é um agente anti-estrógeno não-esteróide utilizado na prevenção e tratamento de câncer de mama que, em vista de sua importância no tratamento dessa enfermidade tem impulsionado o desenvolvimento de vários métodos analíticos para a sua quantificação (RADHAPYARI; KOTOKY; KHAN, 2013).

Para o sensor formado (*MIP-TAM*), verificou-se que ocorria uma diminuição nos valores de corrente de pico para os processos de oxidação e redução do marcador redox ferricianeto, observados por voltametria cíclica, de forma proporcional ao aumento da concentração de TAM no meio eletrolítico (para o intervalo de 1 a 100 nM do fármaco).

Desta forma, foi possível realizar a quantificação indireta do TAM a partir da relação observada entre a concentração do fármaco na solução eletrolítica e efeito promovido nos voltamogramas do ferricianeto, onde o aumento da concentração do fármaco levava a uma diminuição dos picos de oxidação e redução do marcador redox. Contudo, segundo os autores, a diminuição nos valores de corrente observada nos voltamogramas pode também ser influenciada por outros fatores agindo sobre a estrutura do MIP sendo o desenvolvimento de metodologias para a detecção direta do analito alvo uma estratégia mais confiável a ser estudada.

4.2.3 Sensores eletroquímicos que utilizam polímeros como camada ativa

Hassan e colaboradores (1998) desenvolveram um sensor à base de PVC carboxilado (PVC-COOH), e a partir da interação entre as moléculas dos fármacos ciclofosfamida e ifosfamida em uma solução e os grupos carboxílicos do PVC-COOH do sensor, foi possível quantificar ambos os fármacos em amostras farmacêuticas. Algumas características do sensor foram descritas na Tabela 1. A Ciclofosfamida e seu isômero ifosfamida são fármacos alquilantes que têm sido usados clinicamente para o tratamento do câncer há mais de 30 anos (HASSAN et al., 1998).

Brahman et al. (2012) modificaram eletrodos de pasta de carbono (EPC) com polímero de ácido glutâmico (PAG) e utilizaram para a determinação de flutamida em meio eletrolítico contendo um tensoativo, o brometo de cetiltrimetilamonio. Os tensoativos têm sido frequentemente utilizados em estudos eletroquímicos devido a sua capacidade de aumentar a velocidade de transferência de elétrons entre a superfície do eletrodo e o analito, melhorando os limites de detecção, já a adição do polímero exerceu um efeito catalítico significativo sobre a redução eletroquímica da flutamida.

A interferência de várias moléculas como glicose, ácido úrico, ácido cítrico, uréia, além de íons como o K^+ , Ca^{2+} , NO_3^- , entre outros, que são comumente encontrados em fluidos humanos foram avaliadas afim de determinar a seletividade do sensor, sendo que a utilização do eletrodo modificado não mostrou sofrer alterações significativas na presença desses interferentes, tendo sido utilizado para determinação da flutamida em amostras analíticas e a partir de sua forma farmacêutica. Algumas propriedades do sensor foram descritas na Tabela 1.

Em 2014, Wey e seus colaboradores desenvolveram um sensor eletroquímico simples e sensível à base de um eletrodo de carbono vítreo modificado com poli(L-lisina)(PLL) para detecção de metotrexato na presença do tensoativo aniônico dodecil benzeno sulfonato de sódio (SDBS) na solução eletrolítica. Esse sensor (ECV/PLL) facilitou o processo de oxidação do fármaco e o tensoativo SDBS ajudou a melhorar a reprodutibilidade do método ao impedir o processo de adsorção dos produtos de oxidação do metotrexato sobre o eletrodo. O filme exibiu excelente atividade tendo sido aplicado para detectar esse fármaco em comprimidos medicinais.

Erdem; Karadeniz; Caliskan (2011), modificaram a superfície de eletrodos de grafite pirolítico (EGP) a partir da deposição de um filme do dendrímero PAMAM geração 4, com extremidade amino-terminal, e empregaram o sistema EGP/PAMAM como sensor para a análise do fármaco daunorrubicina. Esse fármaco pertence à classe das antraciclinas e apresenta a capacidade de se intercalar entre os pares de bases do *DNA*, possuindo eficiente atividade antitumoral (RIBEIRO; SILVA; PEREIRA, 2013).

Os resultados dos ensaios eletroquímicos indicaram que a modificação da superfície do eletrodo de grafite pirolítico melhorou o sinal de oxidação do fármaco, aumentando mais de duas vezes em relação ao sinal obtido para o eletrodo (EGP) não modificado. Suspeita-se que a daunorrubicina poderia interagir e se acumular por meio da formação de ligações de hidrogênio com os grupos amina presentes no PAMAM, resultando em um aumento da magnitude do sinal de oxidação do fármaco, como de fato fora observado (ERDEM; KARADENIZ; CALISKAN, 2011).

4.2.4 Outros sensores eletroquímicos

A tirapazamina é um pró-fármaco antitumoral que é seletivamente ativado pelo ambiente de baixo oxigênio de alguns tumores, sendo utilizada no tratamento do câncer do colo do útero, um dos cânceres mais comuns em mulheres (HU; GUO; SHAO, 2009).

Hu, Guo e Shao (2009) modificaram um eletrodo de grafite pirolítico (EGP) com carbono mesoporoso ordenado (CMO) produzindo um sensor para investigar o comportamento eletroquímico da tirapazamina. O eletrodo modificado (EGO/CMO) mostrou uma resposta eletroquímica para o fármaco bastante superior quando comparado ao eletrodo não modificado. Os autores atribuíram os motivos para a otimização dos resultados encontrados ao aumento da área superficial promovido pelo CMO e à presença de grupos funcionais contendo oxigênio na superfície do eletrodo.

A interferência de várias moléculas como o ácido úrico, a serotonina, catecolaminas e o ácido ascórbico, comumente encontradas em fluidos humanos foram avaliadas e não afetaram a detecção precisa do fármaco e o sensor foi utilizado com sucesso na determinação de tirapazamina em soro humano.

Ribeiro, Silva e Pereira (2013) desenvolveram um sensor eletroquímico de daunorrubicina (DNR) baseado na transferência direta de íons na interface água/1,6-diclorohexano. O comportamento voltamétrico desse fármaco foi investigado, onde a transferência direta do íon DNRH^+ na micro interface líquido/líquido foi observada. A determinação de DNRH^+ no plasma humano desproteínizado foi realizado com sucesso, porém não foi possível determinar a DNRH^+ no plasma não tratado, por causa da sua interação com a albumina, o que prejudicou o ensaio amperométrico.

Temerk et al. (2016) desenvolveram sensores eletroquímicos para determinação de lomustina a partir do revestimento de eletrodos de grafite, denominado pelos autores como *pencil grafite electrode* (do inglês *PGE*), com filme de mercúrio (FM). A lomustina é um antineoplásico alquilante amplamente usado no tratamento de tumores cerebrais resistentes, em recidivas da doença de Hodgkin, em linfomas, melanomas malignos, entre outros tumores (TEMERK et al., 2016).

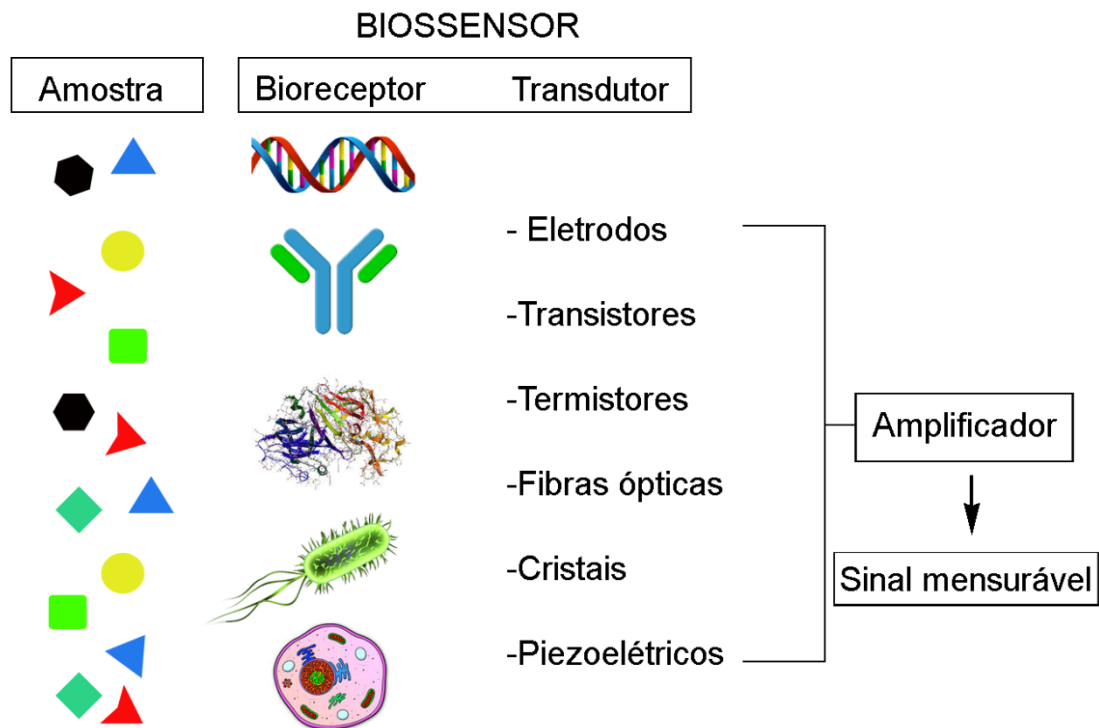
No estudo de Temerk e colaboradores (2016), foi observado um aumento no valor de corrente do processo de redução do fármaco na superfície do eletrodo modificado em comparação com o eletrodo não modificado, evidenciando o papel do mercúrio como agente facilitador da transferência de elétrons entre a superfície do sensor e o analito.

Assim, os resultados encontrados foram atribuídos ao efeito do filme de mercúrio sobre o *PGE*, amplificando o sinal eletroquímico e viabilizando a quantificação do referido fármaco em amostras de sangue e urina humanas de forma exata e precisa.

4.2 Biossensores eletroquímicos para fármacos antineoplásicos

Os biossensores eletroquímicos diferenciam-se dos sensores eletroquímicos por serem sistemas compostos por um elemento de reconhecimento de natureza biológica tais como, enzimas, anticorpos, receptores de drogas, *DNA*, entre outros imobilizado em um transdutor composto por um material eletroativo, neste caso um eletrodo, capaz de converter um sinal eletroquímico (reações envolvendo transferências de elétrons) em um sinal mensurável (GIL; DE MELO, 2010). A Figura 10 mostra o esquema de um biossensor.

Figura 10. Esquema simplificado de funcionamento de um biossensor.



Fonte: Arquivo próprio

Os biossensores eletroquímicos têm sido empregados em diversas áreas do conhecimento e a sua grande aplicabilidade está relacionada a vantagens como a alta sensibilidade, respostas rápidas, baixo custo, alta especificidade, detecção de baixas concentrações do analito, número variável de enzimas disponíveis comercialmente para o desenvolvimento de diferentes sensores enzimáticos, entre outras vantagens (MARQUES; YAMANAKA, 2008).

Atualmente, encontram-se descritos na literatura um número relativamente pequeno de estudos abordando o desenvolvimento e a utilização de biossensores eletroquímicos para a determinação de fármacos antineoplásicos. A Tabela 2 sumariza alguns dos biossensores até então encontrados, e a seguir estão apresentados os principais aspectos dos sistemas desenvolvidos.

Tabela 2. Biossensores eletroquímicos para detecção de antineoplásicos.

ARTIGO	ELETRODO MODIFICADO	FÁRMACO DETECTADO	TÉCNICA USADA	LIM. DET (molL ⁻¹)	INT .LINEAR (molL ⁻¹)	REFERÊNCIA
A novel sensitive electrochemical DNA biosensor for assaying of anticancer drug leuprolide and its adsorptive stripping voltammetric determination	(PGE/ds-DNA) Pencil grafite electrode modificado com DNA de dupla fita	Leuprolida	(AdsDVP) Differential Pulse Adsorptive Stripping Voltammetry	4.9x10 ⁻⁸	0.16 a 4.9x10 ⁻⁶	(DOGAN-TOPAL & OZKAN, 2011a)
An electrochemical sensor of non-electroactive drug 6-thioguanine based on the dsDNA/AET/Au.	(EO/AET/ds-DNA) Eletrodo de ouro modificado com filme de ds-DNA produzidos em monocamadas auto montadas de 2-aminoetanotiol	6-Thioguanina	(1)-Differential Pulse Stripping Voltammetry (2)- SWV	Sondas eletroquímicas: (1)- [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} → 2,0x10 ⁻⁷ (2) Co(bpy) ₃ ^{2+/3+} → 1,2x10 ⁻⁷	(1) 1,1 × 10 ⁻⁶ to 1,1 × 10 ⁻⁵ e (2) 4,0 × 10 ⁻⁷ a 2,2 × 10 ⁻⁵	(WANG; WANG & XIE, 2006)
Biosensor for detection of selective anticancer drug gemcitabine based on polyaniline-gold nanocomposite	(ITO/PANI/NPO/HRP) Eletrodos de ITO modificados com filme nanocompósito de polianilina e ouro modificados com peroxidase	Gencitabina	VPD	1.1x10 ⁻¹⁰	0.37 to 4.1x10 ⁻⁹	(RADHAPYARI & KHAN, 2015)
Detection of anticancer drug tamoxifen using biosensor based on polyaniline probe modified with horseradish peroxidase	(Pt/PANI/HRP) Peroxidase imobilizada em eletrodo de platina modificado com polianilina	Tamoxifeno	VC	1.9x10 ⁻¹⁰	0.27 a 2.9x10 ⁻⁸	(RADHAPYARI; KOTOKY & KHAN, 2013)
DNA Langmuir–Blodgett modified glassy carbon electrode as voltammetric sensor for determinate of methotrexate.	(ECV-ox/ds-DNA) Eletrodo de carbono vítreo modificado com ds-DNA pela técnica de Langmuir–Blodgett	Metotrexato	SWV	5.0x10 ⁻⁹	2.0x10 ⁻⁸ a 4.0x10 ⁻⁶	(WANG et al., 2009)
Electrochemical determination of anticancer drug fulvestrant at dsDNA modified pencil graphite electrode	(PGE/dsDNA) Pencil graphite electrode modificado com DNA de fita dupla	Fulvestrant	VPD	6.7x10 ⁻⁷	0.16 a 3.2x10 ⁻⁵	(DOGAN-TOPAL & OZKAN, 2011b)

ARTIGO	ELETRODO MODIFICADO	FÁRMACO DETECTADO	TÉCNICA USADA	LIM. DET (molL ⁻¹)	INT .LINEAR (molL ⁻¹)	REFERÊNCIA
Electrochemical determination of the anticancer drug taxol at a ds-DNA modified pencil-graphite electrode and its application as a label-free electrochemical biosensor	(PGE/ds-DNA) Pencil graphite electrode modificado com ds-DNA	Taxol	VPD	8.0 x10 ⁻⁸	2x10 ⁻⁷ a 1x10 ⁻⁵	(TAJIK et al., 2015)
Electrochemical studies of DNA immobilization onto the azide-terminated monolayers and its interaction with taxol	(EO/SAM/ds-DNA) Eletrodo de ouro modificado com monocamada automantada de ds-DNA	Taxol	VPD	1.2 x10 ⁻⁸	1.2x10 ⁻⁷ a 1.5x10 ⁻⁶	(MEHDINIA et al., 2008)
Electrochemical detection of anti-breast-cancer agents in human serum by cytochrome P450-coated carbon nanotubes	(ES/NTCM/CYP450) Eletrodos serigrafados modificados com nanotubos de carbono multicamadas e isoformas do citocromo P450.	Ciclofosfamida, etoposideo, ftorafur e ifosfamida	VC	0.05 x 10 ⁻⁶ a 4,9 x10 ⁻⁶ para os diferentes fármacos	-	(BAJ-ROSSI; DE MICHELI & CARRARA, 2012)
Glutathione-s-transferase modified electrodes for detecting anticancer drugs	(EPC/GST) Eletrodo de pasta de carbono modificada com glutathione-S-transferase	Vários antineoplásicos	SWV	8.8 x10 ⁻⁶ para a cisplatina	0.05 a 0.14x10 ⁻³ para a cisplatina	(MATERON et al., 2014)
Separation and simultaneous detection of anticancer drugs in a microfluidic device with an amperometric biosensor	(ES/TT/NPO/ds-DNA/CL) Eletrodos serigrafados modificados nanopartículas de ouro, polímero tertiofeno, ds-DNA e cardiolipina	Antraciclínas: daunomicina, doxorubicina, idarubicina e mitoxantrona	Cronoamperometria	1,2 to 5,5 x10 ⁻¹⁵ para os diferentes fármacos	2 to 60 x10 ⁻¹²	(CHANDRA et al., 2011)

ARTIGO	ELETRODO MODIFICADO	FÁRMACO DETECTADO	TÉCNICA USADA	LIM. DET (molL ⁻¹)	INT .LINEAR (molL ⁻¹)	REFERÊNCIA
Electrochemical oxidation behavior of methotrexate at <i>DNA</i> /SWCNT/Nafion composite film-modified glassy carbon electrode	(<i>DNA</i> /SWCNT/Nafion-modified/CGE) Eletrodo de carbon vítreo modificado com filme composto de Nafion e nanotubos de carbono funcionalizados com <i>DNA</i>	Metotrexato	Square wave anodic stripping voltammetry	8.0×10 ⁻⁹	2.0×10 ⁻⁸ a 1.5×10 ⁻⁶	(WANG et al., 2012)
Polyaniline– <i>DNA</i> based sensor for the detection of anthracycline drugs	(ECVIPANI/ <i>ds-DNA</i>) Eletrodo de carbon vítreo modificado com polianilina e <i>DNA</i>	Antraciclinas: daunomicina, doxorubicina e idarubicina	Voltametria cíclica	0.01 to 0.2×10 ⁻⁹ M for different drugs	1×10 ⁻⁸ a 1×10 ⁻⁴ e 1×10 ⁻¹⁰ a 5×10 ⁻¹⁰	(SHAMAGSUM OVA et al., 2015)
A Novel <i>DNA</i> Biosensor Based on a Pencil Graphite Electrode Modified with Polypyrrole/Functionalized Multiwalled Carbon Nanotubes for Determination of 6-Mercaptopurine Anticancer Drug	(PGE/NTCMF/PP/ <i>ds-DNA</i>) <i>dsDNA</i> imobilizado em <i>pencil graphite electrodes</i> modificados com polipirrol e nanotubos de carbono multicamadas funcionalizadas.	6-Mercaptopurina	VPD	0.08 ×10 ⁻⁶	0.2 to 100×10 ⁻⁶	(KARIMI-MALEH et al., 2015)

- sensores foram mantidas conforme denominação expressa pelo autor no trabalho original.

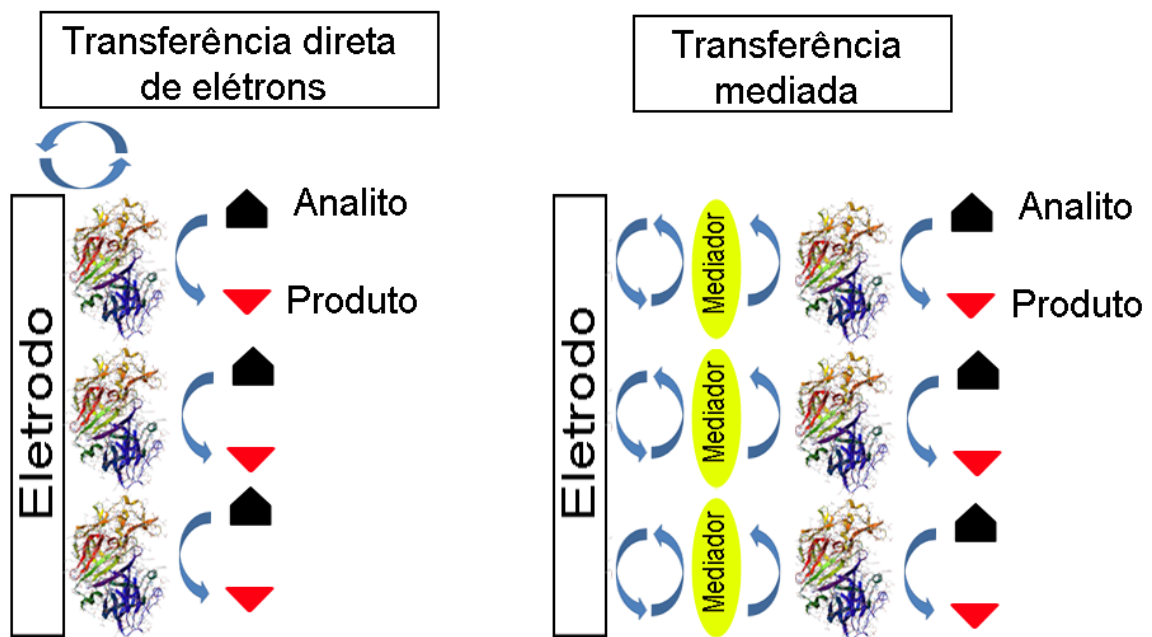
Todas as siglas utilizadas para denominação dos

Fonte: Arquivo próprio

4.3.1 Biossensores enzimáticos

Quando o material biológico empregado para o desenvolvimento de um biossensor trata-se de uma enzima, estes são denominados biossensores enzimáticos (Figura 11), merecendo destaque aqueles em que o monitoramento do analito é baseado no princípio de inibição da enzima, onde a atividade enzimática é medida antes e após a inibição. Este processo é efetuado pela exposição da enzima a um inibidor específico, por um determinado período de tempo, sendo que a porcentagem de inibição sofrida pela enzima está quantitativamente relacionada com a concentração do agente inibidor (MARQUES; YAMANAKA 2008).

Figura 11. Esquema simplificado da transferência eletrônica em biossensores enzimáticos com a ajuda ou não de mediadores redox.



Fonte: Arquivo próprio

Materon et al. (2014) desenvolveram um biossensor para detectar antineoplásicos através da modificação de eletrodos de pasta de carbono com a enzima glutationa-S-transferase (GST). A GST é uma enzima que protege as células de substâncias xenobióticas ao catalisar reações de conjugação com a glutationa e facilitar a sua excreção.

O biossensor (EPC/GST) proposto por Materon e colaboradores (2014) tem como princípio a quantificação de fármacos antineoplásicos com base na competição entre estes e 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), pelo sítio catalítico da enzima GST. A reação do CDNB com a glutationa adicionada ao meio eletrolítico, catalisada pela GST, gera um sinal eletroquímico que pode ser mensurado. Contudo, este sinal pode ser enfraquecido pela adição de drogas antineoplásicas, tais como a cisplatina, devido a competição ocasionada entre o fármaco e o substrato CDNB pelos sítios ativos na enzima.

O sensor (EPC/GST) mostrou ser eficiente na quantificação do referido fármaco, contudo, não foi específico para uma droga em particular, podendo detectar outros substratos dessa enzima, tais como os fármacos gencitabina, doxorubicina, carboplatina, entre outros (MATERON et al., 2014).

Radhapyari, Kotoky e Khan (2013) desenvolveram um biossensor amperométrico para a detecção de tamoxifeno, esse biossensor foi produzido a partir da imobilização da enzima peroxidase (do inglês *horse hadish peroxidase - HRP*), sobre eletrodos de platina (Pt) modificados com polianilina (PANI). Esse biossensor (Pt/PANI/HRP) foi utilizado para monitorar a redução catalítica do fármaco, tendo apresentado excelentes propriedades, como boa sensibilidade e baixos limites de detecção para o fármaco, conforme pode ser observado na Tabela 2.

Baj-Rossi, De Micheli e Carrara (2012) depositaram nanotubos de carbono sobre eletrodos de pasta de carbono produzindo um sensor eletroquímico que foi utilizado para a quantificação do fármaco etoposídeo. Posteriormente, os nanotubos de carbono foram funcionalizados com três diferentes isoformas do citocromo P450 (CYP1A2, CYP2B6 e CYP3A4) produzindo biossensores para a quantificação dos fármacos ftorafur, ciclofosfamida e ifosfamida. Neste estudo, os fármacos foram analisados em tampão fosfato salino (PBS) e em soro humano. Algumas propriedades desses biossensores encontram-se descritas na Tabela 2.

O trabalho de Baj-Rossi, De Micheli e Carrara (2012) baseou-se essencialmente na reação bioquímica catalisada pelo citocromo P450, o qual transforma a forma reduzida do fármaco em sua forma oxidada, utilizando para isso, uma molécula de oxigênio e dois elétrons (fornecidos pelo fluxo de corrente que vem

do eletrodo) originando um sinal eletroquímico que pode ser utilizado para a quantificação desses fármacos.

Radhapyari e Khan (2015) desenvolveram um biossensor a partir da imobilização da enzima peroxidase (*HRP*) em filmes nanocompósitos de polianilina e nanopartículas de ouro (PANI/NPO) sobre a superfície de eletrodos de vidro recobertos com óxido de índio e estanho (ITO) para determinação direta de gencitabina. O filme de PANI/NPO empregado para a imobilização da *HRP* levou à produção de um biossensor que foi aplicado para a determinação do fármaco em formulações farmacêuticas, sem necessidade de pré-tratamento da amostra. Algumas propriedades desse biossensor encontram-se descritas na Tabela 2.

4.3.2 Biossensores que utilizam *DNA*

A construção de biossensores eletroquímicos de *DNA* baseia-se na imobilização de filmes de ácidos nucleicos ao longo de um transdutor eletroquímico, onde alterações na estrutura do *DNA*, que venham a ocorrer durante a intercalação de moléculas ligantes, são detectadas originando um sinal mensurável (TAJIK et al., 2015). Os sinais são gerados devido a oxidação de sítios nas bases nitrogenadas, sendo assim, a investigação eletroquímica da interação entre ácidos nucleicos e moléculas ligantes tem sido explorada, por possibilitar a detecção de mudanças que venham a ocorrer na estrutura do *DNA* durante a interação com outras moléculas (TAJIK et al., 2015).

Chandra et al. (2011) utilizando nanopartículas de ouro e o polímero tertiofeno com grupos carboxílicos livres (TT), depositaram filmes desses compostos sobre eletrodos serigrafados (ES), imobilizando em seguida moléculas de *DNA* de dupla fita (*dsDNA*) e cardiolipina (CL) como elementos de reconhecimento para a produção de biossensores.

Os biossensores (ES/TT/NPO/*ds-DNA*/CL) foram utilizados para a detecção simultânea dos antineoplásicos daunorrubicina, doxorubicina, idarubicina, e mitoxantrona, previamente separados em um dispositivo microfluidico de separação, um sistema desenvolvido para a separação e detecção de vários analitos biológicos (SHIDDIKY et al., 2006; SHIDDIKY; SHIM, 2007).

Esses antineoplásicos são fármacos da classe das antraciclinas, que atuam alterando a fluidez e o transporte de íons da membrana celular, promovendo a formação de radicais livres de oxigênio e promovendo a ruptura dos filamentos do DNA (KATZUNG, 2014), sendo muito utilizados clinicamente no tratamento de vários tipos de câncer (CHANDRA et al., 2011).

A proposta de modificação do biossensor utilizando-se ds-DNA e CL teve como princípio a conhecida interação entre os fármacos estudados e as bases nitrogenadas do DNA além da conhecida interação entre as antraciclinas e a CL presente na superfície de células cancerígenas, originando um biossensor capaz de interagir com os fármacos de interesse. Algumas características do biossensor podem ser observadas na Tabela 2.

Mehdinia et al. (2008) prepararam monocamadas automontadas (do inglês *Self Assembled Monolayers - SAMS*) de um derivado de tiol iodoetano sobre eletrodos de ouro (EO) que, em seguida, foram utilizadas para a imobilização de ds-DNA, produzindo assim um biossensor (EO/SAM/ds-DNA), onde a interação do dsDNA com o fármaco taxol foi estudada. O taxol é um dos mais eficazes agentes quimioterápicos naturais, e é normalmente utilizado na prática clínica para o tratamento de câncer de ovário e da mama (TAJIK et al., 2015).

No estudo de Mehdinia e colaboradores (2008), o decréscimo observado nos valores do pico de corrente de oxidação da guanina no ds-DNA foi utilizado para monitorar a interação com o fármaco permitindo assim a quantificação do mesmo em amostras de soro humano. Algumas das propriedades do biossensor podem ser observadas na Tabela 2.

Wang, Wang e Xie (2006) modificaram eletrodos de ouro (EO) com monocamadas automontadas de aminoetanotiol (AET) e em seguida, depositaram ds-DNA na superfície do eletrodo a partir da adsorção eletroestática, um método simples de imobilização de dsDNA na superfície de eletrodos modificados que é aconselhável, especialmente para biossensores eletroquímicos de ds-DNA.

O biossensor (EO/AET/ds-DNA) foi desenvolvido para a quantificação do fármaco 6-tioguanina, usando duas diferentes sondas eletroquímicas $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ e $\text{Co}(\text{bpy})_3^{2+/3+}$, contudo, devido às características do ds-DNA e a complexidade dos fatores relacionados à resposta eletroquímica ideal, não foi possível elucidar

completamente o mecanismo de interação entre o ds-DNA e o fármaco. Algumas características do biossensor encontram-se descritas na Tabela 2.

Wang et al. (2009) desenvolveram um biossensor eletroquímico altamente sensível para a detecção de metotrexato. Um eletrodo de carbono vítreo (ECV) foi progressivamente polido e limpo, originando um eletrodo que foi denominado (ECV-ox) onde em seguida, o DNA de fita dupla ds-DNA foi imobilizado sobre a sua superfície através da técnica de *Langmuir-Blodgett (LB)*.

Os testes eletroquímicos para a detecção do fármaco utilizando o biossensor ECV-ox/ds-DNA mostraram processos de oxidação bem definidos, cuja corrente foi cerca de 100 vezes maior do que o eletrodo não modificado de ECV e 5 vezes maior que o ECV(ox) também não modificado. Esse aumento nos valores de corrente foi atribuído à interação entre o fármaco e o DNA formando um complexo por intercalação com alta afinidade.

Os autores sugerem que grupos contendo oxigênio, formados na superfície do eletrodo ECV-ox devido ao processo de tratamento utilizado, permitiram uma melhor interação entre o fármaco e o eletrodo por meio de ligações de hidrogênio, melhorando a taxa de transferência de elétrons. O método proposto foi aplicado para a determinação do metotrexato em sua forma farmacêutica e em urina humana. Algumas características do biossensor foram descritas na Tabela 2.

A leuprolida é um agonista do hormônio liberador de gonadotrofinas (LH/Gn) que em doses terapêuticas contínuas, faz com que haja estimulação constante e repetitiva dos receptores desse hormônio na hipófise, promovendo uma diminuição na secreção do hormônio luteinizante (LH) e folículo-estimulante (FSH), tendo efeitos positivos no tratamento de cânceres hormônio-responsivos, tais como câncer de mama, próstata e miomas uterinos (DOGAN-TOPAL; OZKAN, 2011a).

Dogan-Topal e Ozkan (2011a), a partir da modificação da superfície de um eletrodo de grafite, denominado pelos autores como *pencil graphite electrode (PGE)*, com ds-DNA, desenvolveram um biossensor para determinação de leuprolida. Os resultados obtidos para a oxidação desse fármaco utilizando o biossensor (PGE/dsDNA) mostraram uma dependência linear entre os sinais analíticos e as concentrações desse analito no meio eletrolítico, relacionada à diminuição no sinal de guanina após a interação com o fármaco, o que pode ser explicado pelos danos sobre os grupos oxidáveis das bases de guanina devido à adsorção do fármaco.

O método proposto pôde ser aplicado para a determinação de leuprolida na forma de matéria-prima e na sua forma de dosagem farmacêutica sem qualquer interferência. Algumas características do biossensor foram descritas na Tabela 2.

O fulvestranto é um novo tipo de antagonista do receptor de estrógeno, capaz de complexar-se a esses receptores, impedindo a sua dimerização e tornando-o transcricionalmente inativo, inibindo assim o crescimento de tumores responsivos ao estrogênio, sendo indicado para o tratamento de mulheres na pós-menopausa com câncer da mama avançado mesmo na terapia com tamoxifeno (DOGAN-TOPAL; OZKAN, 2011b).

Dogan-Topal e Ozkan (2011b) desenvolveram um biossensor eletroquímico (PGE/ds-DNA) para determinação do fulvestranto a partir da imobilização de ds-DNA sobre o PGE.

Os resultados obtidos em voltamogramas de pulso diferencial apontam que o sinal de oxidação das bases guanina diminuíram com o aumento da concentração desse fármaco no meio eletrolítico, o que poderia ser explicado pela blindagem de grupos oxidáveis nas bases nitrogenadas, tais como a guanina. Para o método desenvolvido, não foi necessária a realização de pré-tratamento das amostras, tendo o mesmo sido utilizado para a determinação do fulvestranto em sua forma farmacêutica medicinal. Algumas características do biossensor forma descritas na Tabela 2.

Posteriormente, Tajik et al. (2015) usando o PGE, desenvolveram um biossensor eletroquímico (PGE/ds-DNA) para quantificação do taxol, a partir da modificação desses eletrodos com ds-DNA.

Em ensaios eletroquímicos de Voltametria de Pulso Diferencial, foi observado que o aumento na concentração do taxol promoveu uma diminuição correspondente nos sinais de oxidação das bases guanina e adenina presentes no DNA, possivelmente pela intercalação do fármaco nessa estrutura. O biossensor foi usado para a determinação do fármaco em sua forma farmacêutica injetável, bem como em urina e soro sanguíneo humano. Algumas características gerais do biossensor foram descritas na Tabela 2.

Shamagsumova et al. (2015) produziram biossensores a partir da eletropolimerização de anilina, empregando a técnica de voltametria cíclica, em ECV na presença de DNA e ácido oxálico como agente dopante para a determinação de

antraciclina (doxorubicina, daunorrubicina e idarrubicina). Neste estudo, a resposta voltamétrica do mediador redox ferrocianeto foi estudada por voltametria cíclica frente ao biossensor, na ausência e na presença de antraciclina.

A adição de antraciclina ao meio eletrolítico resultou na diminuição da corrente observada e no aumento da resistência à transferência de elétrons entre o mediador ferrocianeto usado como sonda eletroquímica e a superfície do eletrodo, provavelmente, devido a capacidade das moléculas de antraciclina penetrarem na camada superficial de PANI e intercalar-se ao *DNA*, dificultando a transferência de elétrons entre a sonda redox e o eletrodo (SHAMAGSUMOVA et al., 2015).

A determinação das antraciclina foi possível mesmo na presença de sulfanilamidas e de algumas moléculas comumente encontrados no sangue que poderiam vir a interferir nos ensaios. Algumas características do biossensor foram descritas na Tabela 2, esse sensor foi usado ainda na determinação de doxorubicina em uma preparação farmacêutica (SHAMAGSUMOVA et al., 2015).

Karimi-Maleh et al. (2015) desenvolveram um biossensor para análise do fármaco 6-mercaptopurina, empregando *DNA* imobilizado em *PGE* modificados com polipirrol (PP) e nanotubos de carbono em multicamadas funcionalizados (*PGE/NTCMF/PP/ds-DNA*). O fármaco 6-mercaptopurina atua como um anti-metabólito inibindo a biossíntese de nucleotídeos de adenina, essenciais para a replicação celular, tendo sido muito usado para o tratamento de leucemias (KARIMI-MALEH et al., 2015).

O biossensor desenvolvido por Karimi-Maleh et al. (2015) mostrou-se capaz de quantificar o fármaco em concentrações baixíssimas, conforme pode ser observado na Tabela 2, sendo observado que a adição desse fármaco ao meio eletrolítico promoveu uma diminuição considerável nos processos de oxidação da guanina e adenina do *DNA* presentes no biossensor. Estas observações foram feitas pela técnica de Voltametria de Pulso Diferencial, e ocorreram devido a inibição da oxidação dessas bases, de forma proporcional à quantidade do fármaco presente na amostra em um dado intervalo de concentração. O biossensor foi aplicado ainda para a detecção de 6-mercaptopurina em amostras farmacêuticas e em urina humana pelo método de adição de padrão (KARIMI-MALEH et al., 2015).

4.3 Prospecção tecnológica

Com base na observação dos diferentes sensores e biossensores eletroquímicos já descritos na literatura, nota-se que esse é um tema que vem ganhando destaque especialmente nos últimos anos, tratando-se de um ramo científico promissor que pode vir a trazer grandes vantagens no campo da saúde humana e ambiental, contudo, para tal, o seu aprimoramento e a defesa dos direitos de propriedade industrial referentes aos mesmos são de suma importância para a consecução desses objetivos.

Assim, foi realizada uma prospecção tecnológica a fim de relatar as patentes encontradas relacionadas ao uso de sensores e biossensores eletroquímicos na análise de fármacos antineoplásicos que tenham sido objeto de patentes em diversos países. A busca foi realizada em março de 2017 nas bases do Instituto Nacional de Propriedade Industrial do Brasil (INPI), *European Patent Office* (EPO), na *World Intellectual Property Organization* (WIPO) e na *United States Patent and Trademark Office* (USPTO).

Na pesquisa avançada realizada no campo de títulos de patentes, quando utilizaram-se os termos exatos, de forma individual, muitas patentes foram localizadas, em especial nas bases internacionais, contudo, ao se combinarem os termos, relacionando os sensores e biossensores eletroquímicos aos antineoplásicos, nenhuma patente foi encontrada com o tema proposto nos sítios do INPI, *EPO* e *WIPO*, conforme apresentado na Tabela 3, o que demonstra que a tecnologia de sensores e biossensores eletroquímicos na detecção de medicamentos antineoplásicos, embora esteja em crescimento, ainda se encontra pouco explorada no ramo das patentes.

Na base *USPTO*, algumas patentes foram encontradas combinando-se os termos “electrochemical sensor” e “chemotherapy drug”, porém nenhuma delas relacionava especificamente o desenvolvimento de sensores eletroquímicos para a análise de fármacos antineoplásicos.

Entre as patentes encontradas, algumas relatavam a produção de dispositivos implantáveis para monitoramento dinâmico de propriedades fisiológicas e biológicas dos tumores, outros relacionavam o desenvolvimento de sensores implantáveis sem fio para a detecção de radiação local recebida em tratamentos

radioterápicos, outrasrelacionam ainda os sensores com a detecção de moléculas utilizadas no tratamento do câncer, porém sendo veiculadas ao uso de radioterapia e não de quimioterapia. Um exemplo é a patente cujo número de depósito é US 20040197267 A1 (BLACK & NATASHA, 2014), depositada em 2004 com o título “*In vivo* fluorescence sensors, systems, and related methods operating in conjunction with fluorescent analytes”, na qual se trata de um sensor que detecta fluorescência principalmente de radiofármacos utilizados no tratamento de câncer.

Tabela 3 – Número de patentes depositadas por base de dados envolvendo sensores e biossensores eletroquímicos e sua correlação com quantificação de antineoplásicos.

PALAVRAS-CHAVE	INPI	EPO	USPTO	WIPO
Sensor/sensor	2947	>10.000	>10.000	>10.000
Biossensor/biosensor	61	7858	>10.000	>10.000
Sensor eletroquímico/ Electrochemical sensor	29	1848	3652	3518
Biossensor eletroquímico/ Electrochemical biosensor	7	403	564	609
Antineoplásico/Antineoplastic drug	6	55	638	490
Quimioterápico/ chemotherapy drug	22	32	1325	291
Sensor eletroquímico e quimioterápico/ Electrochemical sensor and chemotherapy drug	0	0	12	0
Sensor eletroquímico e antineoplásico/Electrochemical sensor and antineoplastic drug	0	0	0	0
Biossensor eletroquímico e quimioterápico/ Electrochemical biosensor and chemotherapy drug	0	0	0	0
Biossensor eletroquímico e antineoplásico/ Electrochemical biosensor and antineoplastic drug	0	0	0	0

Pesquisa em **título** de patente; INPI: Instituto Nacional da Propriedade Industrial; EPO: *European Property Organization*; WIPO: *World Intellectual Property Organization*; USPTO: United States Patent and Trademark Office

Fonte: Arquivo próprio (2017).

Assim, nota-se que a proteção dos direitos de exclusividade em exploração comercial referentes aos sensores e biossensores eletroquímicos para antineoplásicos ainda é um ramo pouco explorado, visto as diferentes possibilidades advindas da utilização prática dessas ferramentas, sendo uma área promissora a se investigar.

4.5. CONCLUSÃO

Essa revisão descreve, pela primeira vez, a utilização de sensores e biossensores eletroquímicos na análise de fármacos antineoplásicos. Foram verificados diferentes sensores e biossensores eletroquímicos que tem se mostrado promissores para a análise desses fármacos, e tendo-se como base o grande número de antineoplásicos atualmente disponíveis no mercado e o potencial demonstrado por esses sensores na quantificação de tais medicamentos, novos estudos devem ser motivados voltados para o desenvolvimento de novas tecnologias de sensoriamento.

Contudo, de acordo com as informações coletadas nas bases de dados do INPI, EPO, WIPO e USPTO pôde-se observar que até a presente data, não foram registrados depósitos de patentes em nenhuma das bases mencionadas, demonstrando que os estudos desses sensores ainda se apresentam como um campo promissor a ser explorado.

Assim, o aperfeiçoamento dos sensores e biossensores eletroquímicos de modo a garantir a sua utilização de forma prática e segura visando a detecção de antineoplásicos, especialmente aqueles conhecidamente prejudiciais aos seres vivos e ao meio ambiente, pode vir a ser de extrema valia para a segurança de profissionais que trabalham com esses fármacos, dos pacientes e de todo o meio ambiente que conhecidamente sofre risco de contaminação.

REFERÊNCIAS

- AHMADI, F. et al. Synthesis of Ag nanoparticles for the electrochemical detection of anticancer drug flutamide. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 36, n. 3, p. 439–445, 2015.
- BAJ-ROSSI, C.; DE MICHELI, G.; CARRARA, S. Electrochemical detection of anti-breast-cancer agents in human serum by cytochrome P450-coated carbon nanotubes. **Sensors (Switzerland)**, v. 12, n. 5, p. 6520–6537, 2012.
- BEITOLLAHI, H.; RAOOF, J.-B.; HOSSEINZADEH, R. Electroanalysis and simultaneous determination of 6-thioguanine in the presence of uric acid and folic acid using a modified carbon nanotube paste electrode. **Analytical Sciences**, v. 27, n. 10, p. 991, 2011.
- BRAHMAN, P. K. et al. Voltammetric determination of anticancer drug flutamide in surfactant media at polymer film modified carbon paste electrode. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 396, p. 8–15, 2012.
- BRESNAHAN, T. F.; TAJTENBERG, M. General purpose technologies: engines of growth. **J. Econom.**, v. 65, p. 83-108, 1995.
- CHANDRA, P. et al. Separation and simultaneous detection of anticancer drugs in a microfluidic device with an amperometric biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 28, n. 1, p. 326–332, 2011.
- DOGAN-TOPAL, B.; OZKAN, S. A. A novel sensitive electrochemical DNA biosensor for assaying of anticancer drug leuprolide and its adsorptive stripping voltammetric determination. **Talanta**, v. 83, n. 3, p. 780–788, 2011a.
- DOGAN-TOPAL, B.; OZKAN, S. A. Electrochemical determination of anticancer drug fulvestrant at dsDNA modified pencil graphite electrode. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 12, p. 4433–4438, 2011b.
- ERDEM, A.; KARADENIZ, H.; CALISKAN, A. Dendrimer modified graphite sensors for detection of anticancer drug Daunorubicin by voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy. **The Analyst**, v. 136, n. 5, p. 1041–1045, 2011.
- FLOREA, A. et al. Anticancer drug detection using a highly sensitive molecularly imprinted electrochemical sensor based on an electropolymerized microporous metal organic framework. **Talanta**, v. 138, p. 71–76, 2015.
- GIL, E. D. S.; DE MELO, G. R. Electrochemical biosensors in pharmaceutical analysis. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 3, p. 375–391, 2010.
- GUO, Y. et al. Electrochemical sensor for ultrasensitive determination of doxorubicin and methotrexate based on cyclodextrin-graphene hybrid nanosheets. **Electroanalysis**, v. 23, n. 10, p. 2400-2407, 2011.

HAIJIAN, R. et al. Fabrication of an electrochemical sensor based on carbon nanotubes modified with gold nanoparticles for determination of valrubicin as a chemotherapy drug: Valrubicin-DNA interaction. **Materials Science and Engineering C**, v. 49, p. 769–775, 2015.

HASSAN, S. S. et al. Microcoated wire sensors for the determination of anticancer drugs cyclophosphamide and ifosfamide in the presence of their degradates. **Talanta**, v. 46, n. 6, p. 1395–1403, 1998.

HU, G.; GUO, Y.; SHAO, S. Ultrasensitive electrochemical sensing of the anticancer drug tirapazamine using an ordered mesoporous carbon modified pyrolytic graphite electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, n. 11, p. 3391–3394, 2009.

KARADAS, N.; OZKAN, S. A. Electrochemical preparation of sodium dodecylsulfate doped over-oxidized polypyrrole/multi-walled carbon nanotube composite on glassy carbon electrode and its application on sensitive and selective determination of anticancer drug: Pemetrexed. **Talanta**, v. 119, p. 248–254, 2014.

KARIMI-MALEH, H. et al. A novel DNA biosensor based on a pencil graphite electrode modified with polypyrrole/functionalized multiwalled carbon nanotubes for determination of 6-Mercaptopurine anticancer drug. **Ind. Eng. Chem. Res**, v. 54, p. 3634–3639, 2015.

KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. **Farmacologia Básica & Clínica** - 12ed. Mcgraw-Hill Interamerican. 2014 .

LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos. **Quím. Nova**, v. 29, n.6, p.1318-1325, 2006.

LUTTERBECK, C. A. et al. Removal of the anti-cancer drug methotrexate from water by advanced oxidation processes: Aerobic biodegradation and toxicity studies after treatment. **Chemosphere**, v. 141, p. 290-296, 2015.

MARQUES, P. R. B. D. O.; YAMANAKA, H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. **Quím. Nova**, v. 31, n. 7, p. 1791–1799, 2008.

MARTINS, I. DELLA ROSA, H. V. Considerações toxicológicas da exposição ocupacional aos fármacos antineoplásicos. **Rev. Bras. Med. Trab.** v. 2, n. 2, p. 118-125, 2004.

MATERON, E. M. et al. Glutathione-s-transferase modified electrodes for detecting anticancer drugs. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 58, p. 232–236, 2014.

MEHDINIA, A. et al. Electrochemical studies of DNA immobilization onto the azide-terminated monolayers and its interaction with taxol. **Analytical Biochemistry**, v. 375, n. 2, p. 331–338, 2008.

NUSSBAUMER, S. et al. Analysis of anticancer drugs: A review. **Talanta**, v. 85, n. 5,

p. 2265–2289, 2011.

PETRLOVA, J. et al. Cisplatin electrochemical biosensor. **Electrochimica Acta**, v. 51, n. 24, p. 5169–5173, 2006.

RADHAPYARI, K.; KHAN, R. Biosensor for detection of selective anticancer drug gemcitabine based on polyaniline-gold nanocomposite. **Advanced Material Letters**, v. 6, n. 1, p. 13–18, 2015.

RADHAPYARI, K.; KOTOKY, P.; KHAN, R. Detection of anticancer drug tamoxifen using biosensor based on polyaniline probe modified with horseradish peroxidase. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 2, p. 583–587, 2013.

RIBEIRO, J. A.; SILVA, F.; PEREIRA, C. M. Electrochemical study of the anticancer drug daunorubicin at a water/oil interface: Drug lipophilicity and quantification. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 3, p. 1582–1590, 2013.

RIZALAR, S.; TURAL, E.; ALTAY, B. Nurses' protective measures during chemotherapy preparation and administration in Turkey. **International Journal of Nursing Practice**, v. 18, p. 91–98, 2012.

SHAMAGSUMOVA, R. et al. Polyaniline – DNA based sensor for the detection of anthracycline drugs. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, v. 220, p. 573–582, 2015.

SHIDDIKY, M. J. A., SHIM, Y.B., Trace analysis of DNA: Preconcentration, separation, and electrochemical detection in microchip electrophoresis using Au nanoparticles. **Anal Chem**, v. 79, p. 3724–3733, 2007.

SHOJAEI, A. F. et al. A novel 5-fluorouracil anticancer drug sensor based on ZnFe₂O₄ magnetic nanoparticles ionic liquids carbon paste electrode. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, v. 230, p. 607–614, 2016

SILVA, S. et al. Tratamento do câncer por hipertermia, **Ciências biológicas e da saúde**, v. 2, n. 3, p. 87–98, 2016.

TAJIK, S. et al. Electrochemical determination of the anticancer drug taxol at a ds-DNA modified pencil-graphite electrode and its application as a label-free electrochemical biosensor. **Talanta**, v. 134, p. 60–64, 2015.

TEMERK, Y. et al. Adsorptive stripping voltammetric determination of anticancer drug lomustine in biological fluids using in situ mercury film coated graphite pencil electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 760, p. 135–142, 2016.

WANG, F. et al. DNA Langmuir-Blodgett modified glassy carbon electrode as voltammetric sensor for determination of methotrexate. **Electrochimica Acta**, v. 54, n. 5, p. 1408–1413, 2009.

WANG, W.; WANG, S. F.; XIE, F. An electrochemical sensor of non-electroactive drug 6-thioguanine based on the dsDNA/AET/Au. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 120, n. 1, p. 238–244, 2006.

WEI, Y. et al. Highly sensitive determination of methotrexate at poly (l-lysine) modified electrode in the presence of sodium dodecyl benzene sulfonate. **Bioelectrochemistry**, v. 98, p. 70–75, 2014.

YANAGI Jr, T. **Inovações tecnológicas na bioclimatologia animal visando aumento da produção animal: relação bem estar animal x clima**, 2006. Artigo em Hyper-texto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2006_2/ITBA/Index.htm>. Último acesso em: 20/11/2016.

YARMAN, A.; SCHELLER, F. W. The first electrochemical MIP sensor for tamoxifen. **Sensors (Switzerland)**, v. 14, n. 5, p. 7647–7654, 2014.

ZHU, Z. et al. Determination of methotrexate and folic acid by ion chromatography with electrochemical detection on a functionalized multi-wall carbon nanotube modified electrode. **Journal of Chromatography A**, v. 1283, p. 62–67, 2013.

CAPÍTULO II

DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE FILMES FINOS NANOESTRUTURADOS EM SENSORES ELETROQUÍMICOS PARA DETERMINAÇÃO DE METOTREXATO

DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE FILMES NANOESTRUTURADOS EM SENSORES ELETROQUÍMICOS PARA DETERMINAÇÃO DE METOTREXATO

Handerson Rodrigues Silva Lima^{1*}; Emanuel Airton de Oliveira Farias², Paulo Ronaldo Sousa Teixeira³, Carla Eiras^{2,3} e Lívio César Cunha Nunes¹

1.Núcleo de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, 64049-550, Brasil. 2.Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia, BIOTEC, *Campus* de Parnaíba, UFPI, Parnaíba, PI, 64202-020, Brasil. 3.Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados - LIMAV, CT, UFPI, *Campus* Ministro Petrônio Portela, Teresina-PI, 64049-550, Brasil.

*handersonrsl@yahoo.com.br

RESUMO

O câncer é uma doença muitas vezes tratada com o uso de antineoplásicos, medicamentos com alto potencial de toxicidade ao ser humano e ao meio ambiente, mesmo em concentrações muito baixas. Neste contexto, o desenvolvimento de métodos analíticos para a detecção desses fármacos tem atraído atenção, onde os sensores eletroquímicos têm se destacado devido à sua alta sensibilidade, baixo custo e rapidez de análise. O metotrexato (MTX) é um antineoplásico muito utilizado em terapias contra o câncer com atividade potencialmente tóxica. Este manuscrito descreve o comportamento eletroquímico do MTX em eletrodos de ITO (Indium Tin Oxide) modificados com filmes nanoestruturados contendo biopolímeros extraídos do Babassu Mesocarp (BM) (*Orbignya phalerata*), buscando desenvolver sensores eletroquímicos para este fármaco. Após intercalar o PVS (poly vinyl sodium sulfonate) em conjunto com o BM, a sensibilidade analítica do sensor foi melhorada de $2.49 \mu\text{A}/\mu\text{mol L}^{-1}$ (ITO) para $5.55 \mu\text{A}/\mu\text{mol L}^{-1}$ (ITO/PVS/MB). A modificação do ITO com o filme proposto permitiu alcançar um limite de detecção de $5.95 \times 10^{-7} \text{mol L}^{-1}$ para o MTX. A presença do MB no filme aumentou consideravelmente a rugosidade do sensor, bem como as interações com o MTX, o que permitiu melhorar o desempenho analítico do sistema proposto. Este estudo demonstrou a possibilidade de quantificação de MTX a partir de técnicas eletroquímicas utilizando-se polímeros naturais, o que pode trazer grandes vantagens financeiras e para a saúde de forma geral.

Palavras-chave: sensor eletroquímico, quantificação, antineoplásico, metotrexato;

5.1 INTRODUÇÃO

O câncer é um importante problema de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento (GUERRA ET AL. 2005)¹ e muitas vezes o seu tratamento é baseado na utilização de medicamentos considerados potencialmente tóxicos, conhecidos como antineoplásicos, podendo produzir efeitos mutagênicos, carcinogênicos, teratogênicos, fetotóxicos e esterilizantes (MAIA; BRITO, 2011²; MARTINS e ROSA, 2004³).

Assim, esses medicamentos possuem grande potencial de toxicidade, oferecendo risco ocupacional (RIZALAR et al. 2012⁴) ou mesmo a grupos de indivíduos em risco de exposição aos mesmos (MARTINS; ROSA, 2004³), sendo ainda muitas vezes liberados no meio ambiente, podendo oferecer riscos mesmo em baixas concentrações (LUTTERBECK et al. 2015⁵).

Dessa forma, o monitoramento ocupacional e ambiental mostram-se essenciais para a prevenção de riscos advindos da exposição a esses fármacos. Além disso, o monitoramento das concentrações plasmáticas de antineoplásicos em pacientes oncológicos se mostra de grande importância pois pode permitir a otimização da terapia utilizada e melhorar o perfil de efeitos colaterais resultantes dessa terapia (FLOREA, et al., 2015⁶).

Assim, a busca por métodos analíticos capazes de quantificar fármacos antineoplásicos tem sido bastante explorada, sendo os sensores eletroquímicos promissores candidatos por apresentarem alta sensibilidade, baixo custo e rapidez na análise (FLOREA, et al., 2015⁶; LOWINSOHN; BERTOTTI, 2006⁷).

Esses sensores tratam-se de dispositivos capazes de obterem informações com manipulação mínima do sistema onde estão inseridos, gerando resultados que podem ser analisados e correlacionados com outros parâmetros do ambiente (LOWINSOHN; BERTOTTI, 2006⁷).

O sinal observado em um eletrodo durante o sensoriamento eletroquímico pode ainda ser melhorado, por exemplo, pelo recobrimento do eletrodo com nanomateriais de uma forma geral, como membranas, filmes finos, polímeros e etc. (WU et al, 2010⁸; JAMES et al, 2012⁹), esses eletrodos têm sido empregados na quantificação de diferentes analitos, dentre eles algumas drogas antineoplásicas, como por exemplo, a flutamida (AHMADI et al., 2015¹⁰; BRAHMAN et al., 2012¹¹), 5-

fluoruracila (SHOJAEI et al., 2016¹²), daunorubicina (RIBEIRO et al., 2013¹³), valrubicina (HAJIAN et al., 2015¹⁴), 6-tioguanina (BEITOLLAHI et al., 2011¹⁵), entre outros.

No entanto, algumas dificuldades ainda devem ser superadas para o uso prático e seguro dessas ferramentas, uma delas está no fato de que muitos dos materiais utilizados na produção destes sistemas ainda são caros ou escassos, assim, o desenvolvimento de sensores com materiais financeiramente acessíveis e abundantes deve ser incentivado (LIMA ET AL., 2018¹⁶).

O uso de filmes finos é uma alternativa economicamente viável para o desenvolvimento de sensores eletroquímicos, principalmente aqueles filmes produzidos pela técnica *Layer-by-Layer (LbL)*, que, além de permitir a manipulação da matéria em nível molecular de diversos tipos de materiais, não necessita de aparatos experimentais extravagantes, minimizando o custo de produção (DECHER, 1997¹⁷; EGAWA et al, 2011¹⁸; JAMES et al, 2012⁹).

A literatura traz uma gama de materiais empregados na produção de filmes *LbL*, sejam conjugados em camadas alternadas, originando os chamados nanocompósitos (MANTHA et al., 2010¹⁹), ou ainda imobilizados individualmente (EGAWA et al., 2011¹⁸).

Recentemente tem se destacado o uso de materiais obtidos de fontes naturais na formação de filmes finos, em especial, devido a propriedades como a biodegradabilidade e a biocompatibilidade, que são propriedades difíceis de se encontrar na maioria dos polímeros sintéticos conhecidos (Teixeira et al., 2018²⁰).

Uma fonte desses polímeros naturais são os materiais lignocelulósicos, que são formados por estruturas rígidas e fibrosas composta principalmente de celulose, hemicelulose e lignina (Teixeira et al., 2018²⁰), onde pode-se destacar o mesocarpo do coco babaçu (*Orbignya phalerata* Mart) (MB), um subproduto agrícola com grande quantidade de materiais lignocelulósicos, não-tóxico, renovável e com grande potencial a ser utilizado na área industrial (VIEIRA et al, 2009²¹).

Alguns outros materiais também têm se mostrado promissoras na produção de filmes, como a goma de angico, extraída de *Anadenanthera Macrocarpa Benth* (EIRAS; SANTOS; ZAMPA, 2010²²), e as galactomananas, extraídas de *Adenanthera pavonina L.* (EIRAS et al., 2007²³).

Entre as drogas antineoplásicas, destaca-se o metotrexato (MTX) ($C_{20}H_{22}N_8O_5$), um análogo do ácido fólico ($C_{19}H_{19}N_7O_6$) que pode ligar-se à enzima dihidrofolato redutase e inibir a conversão de dihidrofolato a tetrahydrofolato, inibindo assim a síntese de DNA, RNA e proteínas. Por esse motivo, o MTX é comumente usado no combate a vários tipos de câncer (WEI et al., 2014²⁴)

Nessa perspectiva, o presente trabalho teve como objetivo a modificação de eletrodos utilizando-se filmes nanoestruturados desenvolvidos a partir de materiais naturais e abundantes, que possam vir a ser utilizados como camada ativa para melhorar a resposta observada para o MTX em sensores eletroquímicos.

5.2. METODOLOGIA

5.2.1 Materiais e Reagentes

O Metotrexato em pó (Fagron), o ácido clorídrico, ácido sulfúrico, acetato de sódio, acetato de amônio, o ácido plivinilsulfônico, a poli alilamina hidrocloreada e os demais reagentes para preparação dos meios eletrolíticos (Aldrich), foram adquiridos comercialmente, em padrão analítico, não necessitando de purificação prévia. Água purificada por meio do sistema Milipore (Mili-Q) foi empregada no preparo das soluções necessárias ao estudo.

5.2.2 Obteção dos materiais para produção dos filmes

O mesocarpo do coco de babaçu *in natura* (MB) foi doado pelo Departamento de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí (UFPI, Brazil) na forma de pó, coletado a partir do coco da palmeira do babaçu colhido no Município de Codó-MA, o mesocarpo foi retirado manualmente e então triturado, passando em seguida por um processo de seleção do tamanho do grão de aproximadamente 0,074 mm.

A goma de angico foi cedida pelo Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia da UFPI– BIOTEC-Parnaíba (Brazil), sendo previamente purificada na forma de sal de sódio como descrito por Costa, Rodrigues e De Paula (1996) ²⁵.

A galactomanana foi previamente extraída e cedida pelo Núcleo de Tecnologia Farmacêutica (NTF) da UFPI – Teresina (Brazil), no processo de extração, determinada massa de sementes de *Adenantha pavonina* foi colocada em água destilada e levadas a aquecimento (100°C por 20 minutos), em seguida a água foi descartada e foi adicionada mais um volume de água destilada à temperatura ambiente para entumescer as sementes. O endosperma foi retirado e pesado e a essa massa foi adicionado um volume de água, sendo então triturada até completa homogeneização. A massa foi filtrada em filtro de nylon e depois precipitada em álcool etílico. O precipitado obtido foi prensado e a massa resultante novamente solubilizada em água destilada, filtrada e precipitada em álcool etílico. Após a segunda precipitação a massa foi solubilizada em água destilada e seca sob condições apropriadas em *Spray Dry*.

5.2.3 Limpeza dos substratos

Os substratos de ITO empregados na deposição dos filmes foram submetidos a duas etapas de limpeza, sendo a primeira com água e detergente e a segunda com um tratamento por plasma, conforme descrito em outros trabalhos do grupo (Teixeira et al., 2018²⁰; De Oliveira Farias et al., 2017²⁶).

5.2.4 Preparo das soluções tampão e leituras de pH

Todas as soluções tampão, bem como os ajustes de pH foram realizados de acordo como descrito na Farmacopéia Brasileira 4^o edição, 2003. Todas as medições de pH foram feitas com um Medidor de pH microprocessador (Hanna 213 Instruments, EUA).

5.2.5 Preparo das dispersões para a deposição dos Filmes

As dispersões dos polissacarídeos foram preparadas na concentração de 1,0 g L⁻¹ no momento de sua utilização, com exceção da solução da goma de angico, que se apresentou demasiadamente viscosa nessa concentração, nesse caso empregou-se a concentração de 0,1 g L⁻¹. As dispersões foram preparadas utilizando-se Dimetilsulfóxido (DMSO), para melhor solubilização, e tampão acetato de amônio pH 3.5 (1mL:60mL).

A solução de ácido polivinilsulfônico (PVS), um polieletrólito de carga negativa, bem como de polialilamina hidrocloreada (PAH), um polieletrólito de carga positiva, ambos frequentemente utilizados para a produção de filmes [reference], foram preparadas na concentração de 0,5 g L⁻¹. Todas as dispersões formadas foram levadas ao banho ultrassônico à temperatura ambiente durante 5 min previamente à utilização, para homogeneização.

5.2.6 Preparo dos Filmes Layer-by-Layer

Em busca de um eletrodo mais sensível para a eletrooxidação do MTX, estudou-se os seguintes filmes: ITO modificado com galactomanana (ITO/GM), ITO modificado com goma de angico (ITO/GA), ITO modificado com mesocarpo de

babaçu (ITO/MB), ITO modificado com ácido polivinilsulfônico (ITO/PVS), ITO modificado com ácido polivinilsulfônico e mesocarpo de babaçu (ITO/PVS/MB), ITO modificado com polialilamina hidrocloreada (ITO/PAH) e ITO modificado com polialilamina hidrocloreada e mesocarpo de babaçu (ITO/PAH/MB).

Os filmes foram preparados conforme proposto por DECHER, (1997¹⁷), a Figura 1 ilustra o processo de preparo de um filme bicamada, (ITO/PVS/BM) como exemplo. Inicialmente o ITO (substrato para o filme) foi imerso na solução de PVS por 5 minutos. Posteriormente, foi lavado para retirada do excesso de material não adsorvido no ITO. Logo após, o sistema ITO/PVS formado foi imerso na solução de BM também por 5 minutos, seguido de etapa de lavagem. É importante ressaltar que após cada etapa de lavagem, o filme foi seco sob leve fluxo de gás N₂ (não mostrado no esquema). Os demais filmes foram produzidos seguindo essa mesma metodologia.

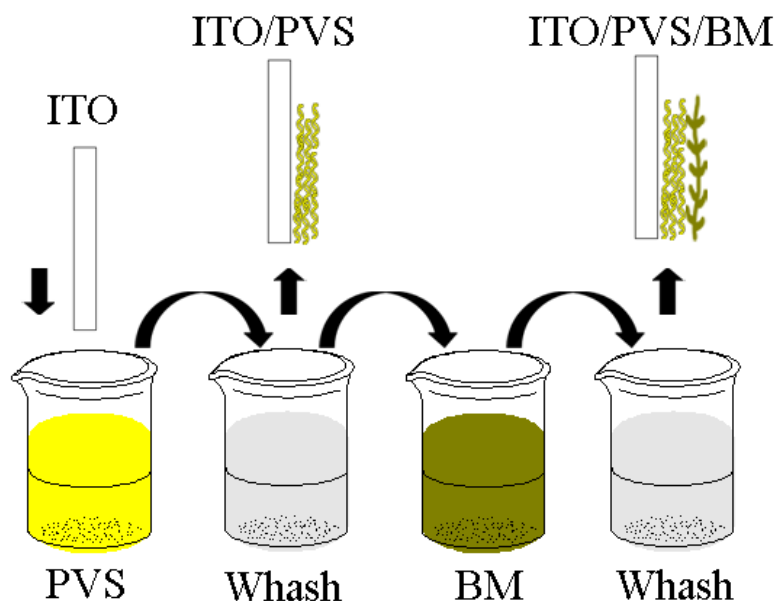


Figura 12. Esquema de produção do filme de ITO/PVS/BM usado como sensor de MTX.

5.2.7 Estudos eletroquímicos

Os estudos eletroquímicos foram realizados com o auxílio de um Bipotenciostato/Galvanostato Dropsens μ Stat 400 da METROHM e uma célula

eletroquímica com encaixe para três eletrodos e capacidade máxima de 50 mL. Como eletrodo de trabalho foram utilizados substratos de ITO modificados ou não. Um eletrodo de fio de platina em espiral ($A= 2,0 \text{ cm}^2$) foi usado como eletrodo auxiliar e um eletrodo de calomelano saturado (SCE) como eletrodo de referência.

A solução de estoque ($5.5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) de MTX (Fagron) foi preparada com HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e armazenada ao abrigo da luz e as diluições foram realizadas imediatamente antes do uso.

5.2.7.1 Estudos da resposta eletroquímica do Metotrexato pela técnica de Voltametria Cíclica

Foi realizado um estudo preliminar em busca do melhor meio eletrolítico para os estudos eletroquímicos com o MTX. Estudou-se os seguintes eletrólitos suporte: Ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0.05 mol L^{-1} , pH 1.3; Ácido Clorídrico (HCl) 0.1 mol L^{-1} , pH 1.0; Tampão acetato de amônio ($\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2$) 2.0 mol L^{-1} , pH 3.5; Tampão acetato de sódio ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$) 2.0 mol L^{-1} , pH 3.5.

Após seleção do eletrólito suporte, estudou-se também o mecanismo eletroquímico do MTX neste meio, bem como a influência da modificação do ITO na resposta eletroquímica do MTX.

5.2.7.2 Estudo da resposta eletroquímica do Metotrexato por Voltametria de Onda Quadrada.

Os estudos quantitativos para o MTX foram realizados por Voltametria de Onda Quadrada, onde primariamente avaliou-se: Amplitude de potencial, Frequência de potencial, Tempo de deposição e Potencial de deposição e ainda a influência da agitação da solução entre as medidas sucessivas. Em seguida foram feitas curvas de calibração.

5.2.8 Curva de calibração do MTX por espectrofotometria UV-VIS

O espectro de absorção de uma solução $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de MTX, foi obtido com auxílio do espectrofotômetro modelo *Carry 60 Varian*, após a seleção do pico de

máxima absorção do MTX (302 nm), uma curva de calibração para o fármaco foi produzida mediante a análise de concentrações crescentes do analito em HCl 0,1 molL⁻¹ e em tampão acetato de amônio (0,2 molL⁻¹, pH 3.5).

5.2.9 Análise da Morfologia dos eletrodos por Microscopia de Força atômica

Os eletrodos de ITO não modificado e aqueles modificados com filmes de PVS e PVS/MB foram observados por microscopia de força atômica (*AFM*), usando um microscópio modelo TT-AFM (Signal Hill, CA, EUA), com frequência de ressonância em torno de 300 kHz (AppNano). As análises foram realizadas no modo de vibração (*tapping*) em áreas de 4.0×4.0 μm, sendo que pelo menos três áreas diferentes foram examinadas em cada amostra. As imagens foram coletadas com 512 pixels de resolução e, posteriormente processadas com o software Gwyddion 2.29. Tal como descrito na literatura, os valores da rugosidade foram aqueles obtidos a partir das imagens estudadas (EATON e WEST, 2010²⁷).

5.2.10 Análise de Potencial Zeta

As medidas de potencial zeta das dispersões produzidas foram determinadas utilizando-se um equipamento Malvern 3000 Zetasizer NanoZS, (Malvern Instruments, UK). Para as análises do potencial zeta, as seguintes dispersões foram preparadas em água purificada: Mesocarpo de babaçu (MB) (1mg/mL); Galactomanana (GM) (1mg/ mL); Goma de Angico (GA) (0,1mg/ mL); Ácido polivinilsulfônico (PVS) (0,5mg/ mL); Poli-alilamina hidrocloreada (PAH) (0,5mg/ mL).

5.2.11 Análise estatística

Os voltamogramas apresentados foram realizados em triplicata e os resultados expressos representam as curvas médias de corrente vs potencial obtidas em cada análise (n=3), os valores de pico máximo de corrente foram utilizados para comparação estatísticas entre as curvas obtidas. Para Torman et al. (2012²⁸), para amostras de tamanho menor ou igual a 10, recomenda-se não proceder testes de normalidade e partir diretamente para uma estratégia não-

paramétrica de análise assim, os valores referentes à corrente máxima de pico em cada curva foram comparados usando-se teste de Kruskal-Wallis seguido do teste post-hoc de Dunn's. As diferenças entre as médias foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 – Estudo da resposta eletroquímica do MTX em eletrodos de ITO por voltametria cíclica

O estudo eletroquímico em eletrodo de ITO não modificado, em tampão acetato de amônio 2.0 mol L^{-1} e pH 3,5, na ausência ou presença de $5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de MTX, foi realizado empregando-se a técnica de voltametria cíclica, Fig. 2.

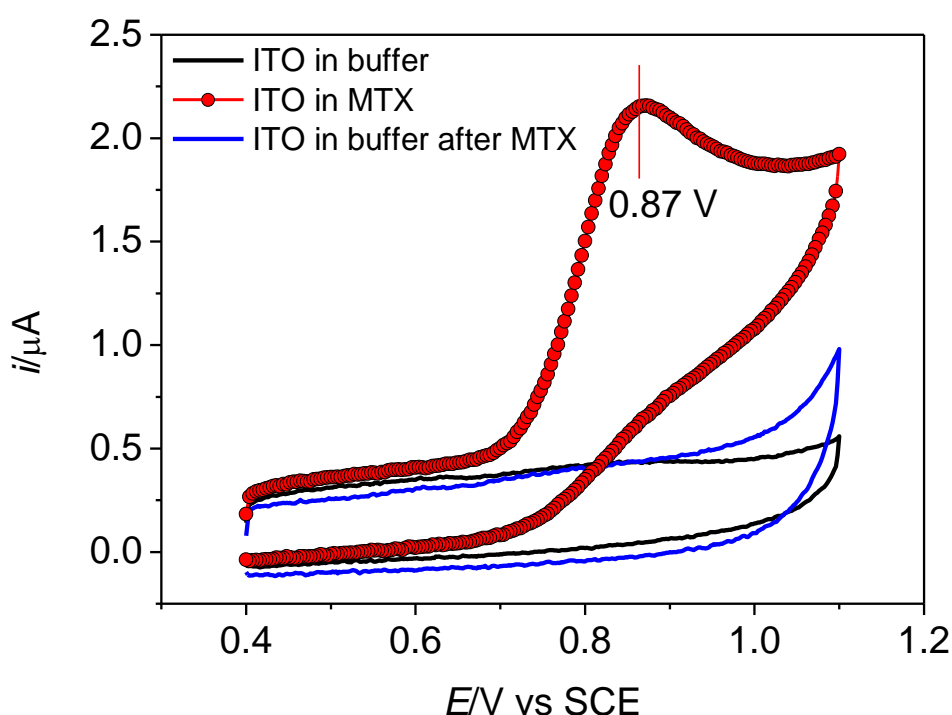


Figura 13: Voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo de ITO na ausência e na presença de $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de MTX, e após limpeza e reutilização do eletrodo. Eletrólito: tampão acetato de amônio 2.0 mol L^{-1} pH 3.5, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

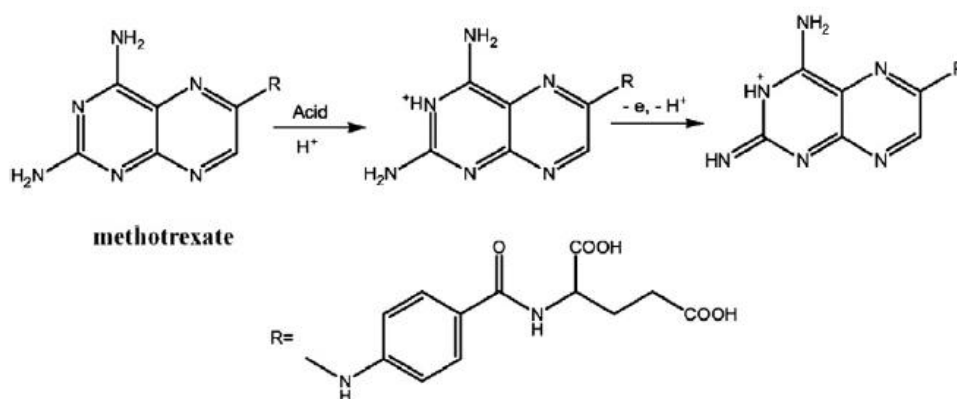
O perfil eletroquímico do MTX usando ITO como eletrodo de trabalho mostrou apenas um processo de oxidação em $+0,87 \text{ V vs ECS}$. Esse comportamento foi descrito em outros estudos (GAO et al., 2007²⁹, WANG et al., 2009³⁰, e WANG et al., 2012³¹) onde eletrodos de carbono foram empregados e, também mostraram o aparecimento de apenas um processo anódico para o MTX, e nenhum processo de redução, indicando que a reação de oxidação foi totalmente irreversível.

Na literatura, alguns estudos empregando eletrodos de carbono, propõem um mecanismo de oxidação para o MTX, Figura 3. O metotrexato pertence ao grupo

das pteridinas e o grupo amina presente na posição C2 do anel de pirimidina é eletroativo, sendo assim, o processo de oxidação detectado nesses estudos deve corresponder à oxidação deste grupo amino (WANG, et al., 2009³⁰) (WANG et al., 2012³¹).

A partir do mecanismo proposto para a oxidação do MTX, Figura 2, um radical livre intermediário de carga positiva é formado e, este pode polimerizar-se gerando então produtos insolúveis (GAO et al., 2007²⁹). Assim, a oxidação do MTX, observada em nosso estudo em +0,87 V vs ECS sobre eletrodo de ITO, parece ocorrer seguindo esse mesmo mecanismo.

Figura 14: Mecanismo de oxidação do MTX.



Fonte: Wei et al. (2014²⁴)

Outro fato importante a se observar é que ao final da varredura realizada na presença do fármaco, o eletrodo de ITO foi removido deste meio, lavado, seco e uma nova varredura foi registrada na ausência do MTX, Figura 2. Este teste foi realizado com objetivo de se avaliar a interação do fármaco com a superfície do substrato e, mostrou que a após sua reutilização, os eletrodos de ITO, mantiveram suas características eletroquímicas iniciais indicando que não houve a contaminação ou “envenenamento” do eletrodo pelo MTX.

5.3.2 – Escolha do meio eletrolítico e estudo da influência do pH e concentração molar

Na Figura 4A, observa-se que o pico máximo de oxidação do MTX, inicialmente definido em +0,87 V em tampão $C_2H_7NO_2$, foi deslocado para maiores

potenciais quando os demais eletrólitos foram empregados. A oxidação do MTX ocorreu em aproximadamente em + 0,91 V em H₂SO₄ e + 0,93 V em C₂H₃NaO₂ e HCl. Além disso, ocorreu uma perda na definição do processo de oxidação do MTX quando esses dois últimos foram utilizados, Figura 3A.

Como vantagem, o tampão C₂H₇NO₂ mostrou ainda maiores valores de densidade de corrente, apresentando diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo HCl ($p < 0,05$), sendo portanto, o meio escolhido para testes subsequentes. Os valores de corrente máxima de pico observados nos grupos C₂H₃NaO₂, H₂SO₄ e HCl, não apresentaram diferenças estatísticas entre si ($p > 0,05$).

Para GAO et al., 2007²⁹, estudos com o MTX indicaram que um processo de oxidação bem definido foi obtido em tampão acetato e apenas as medidas em meio ácido produziram respostas estáveis. Em meio básico, o processo de oxidação quase desapareceu, indicando a importância dos prótons no processo de oxidação do MTX. Diante desta observação, utilizando-se C₂H₇NO₂ (2.0 mol L⁻¹) foram estudados pHs na faixa de 3.5 a 6.0, intervalo de pH onde comumente o MTX tem sido estudado por outros autores (GAO et al., 2007²⁹, WANG et al., 2009³⁰), Figura 4B.

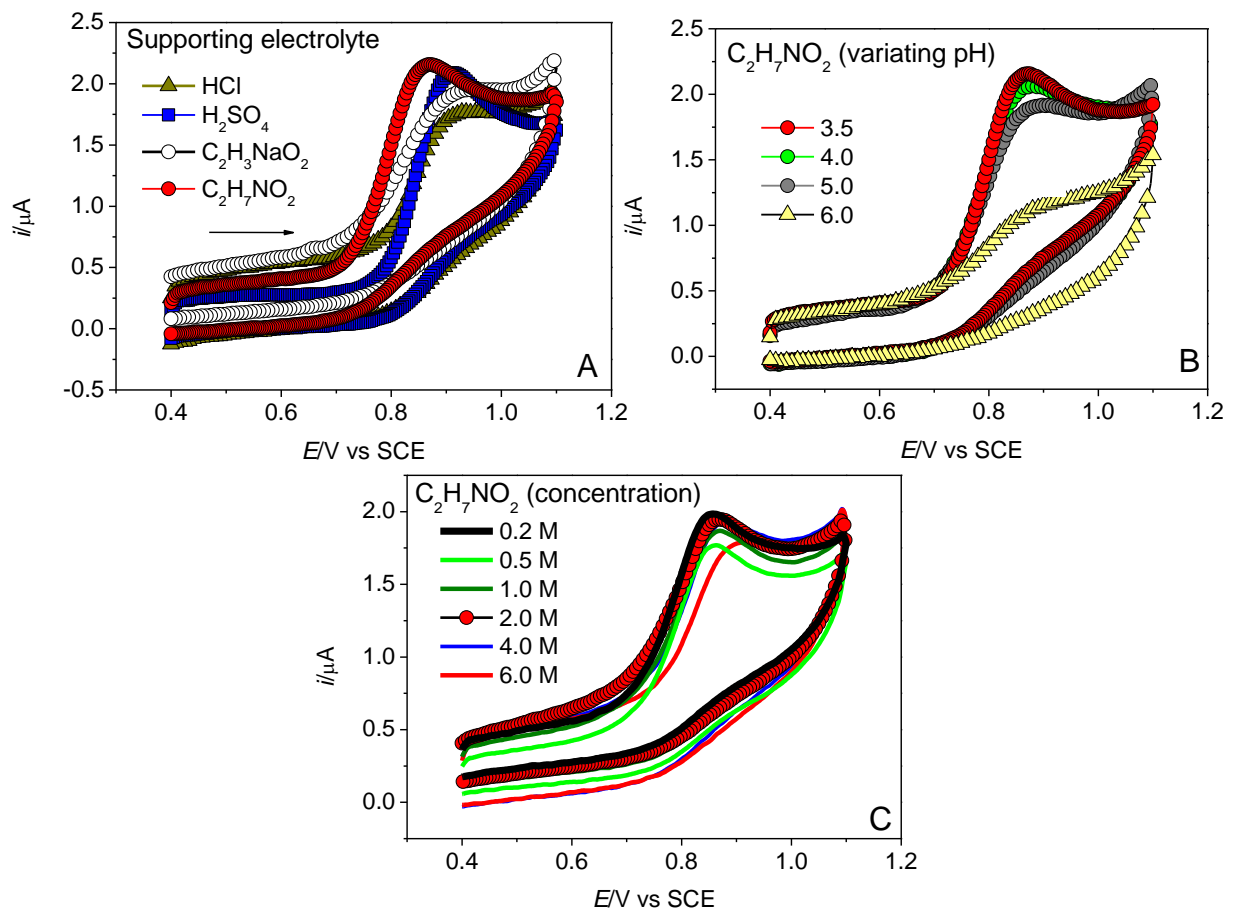


Figura 15: Voltamogramas cíclicos na presença de $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de MTX em eletrodos de ITO A) em diferentes meios eletrolíticos; B) voltamogramas registrados em $\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2$ em diferentes pHs (b) C) voltamogramas registrados em $\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2$ em diferentes concentrações; Todos voltamogramas cíclicos foram registrados na presença de $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. *Diferenças estatisticamente significativas foram observadas entre os grupos $\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2$ e HCl ($p < 0,05$) em (A) e entre o grupo pH 6.0 e pH 3.5 ($p < 0,05$) em (B). Em (C) não foram observadas diferença estatisticamente significativas entre os grupos ($p > 0,05$)

A partir da análise dos voltamogramas, verificou-se que em pHs mais ácidos, foram obtidas maiores densidades de corrente Figura 4B., contudo, GAO et al. (2007²⁹) observaram que em pHs muito baixos a estabilidade dos voltamogramas tornava-se ruim. Assim, o tampão $\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2$ pH 3.5 foi escolhido para a realização dos testes subsequentes.

Para avaliar o efeito da concentração do tampão acetato de amônio pH 3.5, no perfil eletroquímico do MTX, foram estudadas diferentes concentrações na faixa de 0.2 a 6.0 mol L⁻¹, Figura 4C.

Com base nos voltamogramas observados na Figura 4C, todos os grupos levaram a correntes de pico estatisticamente semelhantes, sendo assim a concentração de $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ foi selecionada para testes subsequentes, uma vez que o custo das análises pode ser reduzido empregando-se uma menor quantidade de reagentes para o preparo do eletrólito suporte.

5.3.3 – Estudo da velocidade de varredura na resposta eletroquímica do MTX

O estudo do efeito da velocidade de varredura no processo de oxidação do MTX em eletrodos de ITO é mostrado na Figura 4A. A relação linear entre a velocidade de varredura e a corrente de pico do processo de oxidação do MTX é mostrada na Figura 5B. Esta correlação sugere que os processos eletroquímicos na interface eletrodo/eletrólito são governados principalmente por transferência de cargas, uma vez que a relação de i_p vs v mostrou um coeficiente de correlação linear de $R = 0,998$ (XIE et al., 2008³³; PRUNEAN et al., 1999³⁴).

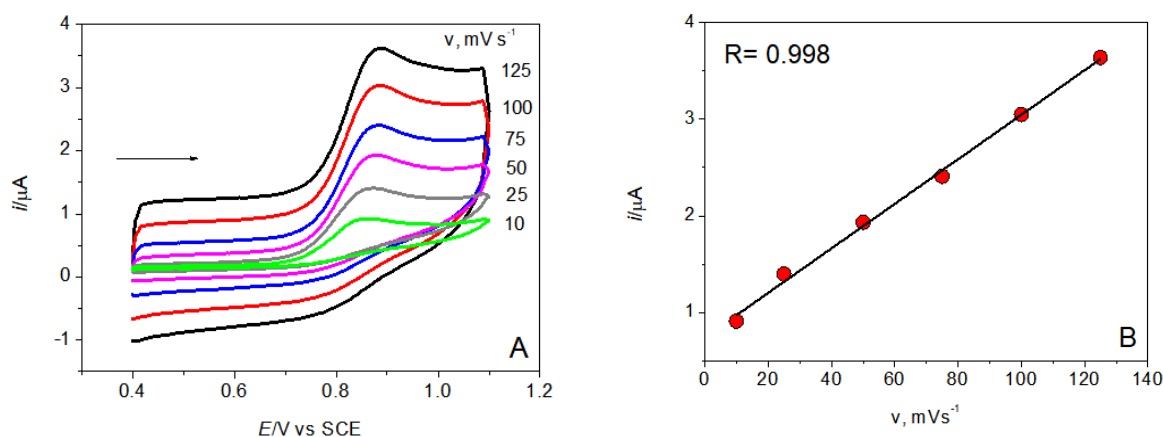


Figura 16. Voltamogramas cíclicos obtidos para o MTX sob diferentes velocidades de varredura (a) correlação linear observada para os valores de corrente em função das velocidades estudadas (b). Todas as medidas foram realizadas em tampão $\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2$ ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 3.5).

Após a otimização do meio eletrolítico, pH e concentração molar, e da melhor compreensão do comportamento eletroquímico do MTX em eletrodos de ITO, buscou-se melhorar ainda mais seu sinal analítico a partir da modificação da superfície do ITO, conforme descrito seguir.

5.3.4 – Proposta de utilização de filmes finos para otimização da reposta eletroquímica para o MTX

A modificação da superfície de eletrodos apresenta-se como uma alternativa quando se busca a melhoria do sinal analítico em estudos eletroquímicos, sendo essas modificações obtidas a partir de diferentes processos e materiais. Os materiais poliméricos têm atraído cada vez mais atenção em análise eletroquímica devido a fatores como boa estabilidade, permeabilidade seletiva e forte adesão à superfície de eletrodos (WEI et al., 2014²⁴).

Neste estudo, propusemos a modificação de eletrodos de ITO por monocamadas automontadas a partir de polímeros naturais, tais como, a goma de angico (0,1 mg/mL) (GA), a galactomanana (1mg/mL) (GM) e o mesocarpo de babaçu (1mg/mL) (B), Figura 6A. Para efeito de comparação, na Figura 6B apresentamos a influência da modificação do eletrodo de ITO com monocamadas de dois polímeros sintéticos, a polialilamina hidrocloreada (PAH), um polieletrólito catiônico e o ácido polivinilsulfônico (PVS), um polieletrólito aniônico.

O processo de oxidação do MTX observado em +0,87 V vs ECS para o eletrodo de ITO não modificado, continuou sendo observado para o caso em que o eletrodo foi modificado com as monocamadas de GA, GM ou MB, Figura 6A, indicando que a modificação do eletrodo não impediu a eletrooxidação do fármaco. Além disso, houve um aumento na corrente máxima de pico de aproximadamente 2.2 μA obtido com o ITO não modificado para 2.9; 3.1 e 4.5 μA , respectivamente, quando se utilizaram eletrodos modificados. O filme de ITO/BM melhorou a resposta eletroquímica do MTX em aproximadamente 105% em comparação com apenas o ITO, apresentando diferença estatisticamente significativa com o grupo ITO sem modificação ($p < 0,05$). Portanto, o BM foi o biopolímero escolhido para a realização de testes subsequentes.

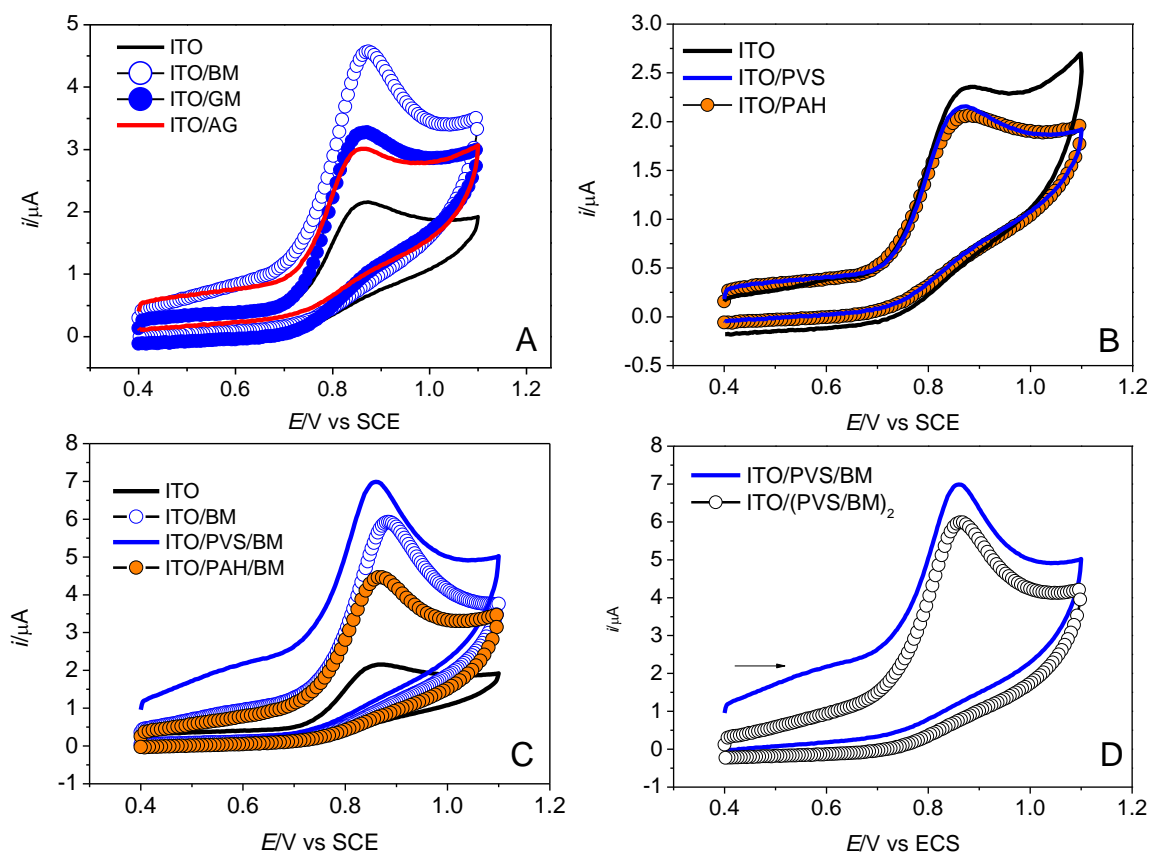


Figura 17: Voltamogramas cíclicos obtidos para os eletrodos de ITO modificados com: A) Filmes de GA, GM ou MB; B) Filmes de PVS ou PAH. C) Filmes bicamadas de ITO/PVS/BM ou ITO/PAH/BM em comparação com a resposta da monocamada de BM. D) Filmes ITO/PVS/BM contendo uma e duas bicamadas. Todas as medidas foram realizadas em Tampão $C_2H_7NO_2$, $0,2 \text{ molL}^{-1}$, pH 3,5 e $v=50 \text{ mVs}^{-1}$, na presença de $5,0 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$ de MTX. *Diferença estatisticamente significativa foi observada entre os grupos ITO e ITO/MB ($p < 0,05$) em (A); entre os grupos ITO/BM e ITO/PVS/BM ($p < 0,05$) em (B); Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$) em (C) e em (D);

Esses resultados corroboram com outros trabalhos do grupo, pois em análise realizada por voltametria cíclica, o BM apresentou eletroatividade em meio ácido, demonstrando que o uso do polímero na forma de filmes monocamadas exibiu propriedades eletroquímicas adequadas para uso na construção de sistemas de sensoriamento eletroquímico (Teixeira et al., 2018²⁰).

Na Figura 6B, verifica-se que a modificação de eletrodos de ITO com os polieletrólitos sintéticos convencionais PVS e PAH não levou a diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) nos valores de corrente observados em relação aos eletrodos não modificados. Porém, quando o PVS foi intercalado com o

BM (ITO/PVS/BM), Figura 6C, uma melhoria estatisticamente significativa ($p < 0,05$) foi alcançada. A corrente para o sistema ITO/PVS/BM aumentou 318% em relação ao ITO sozinho. O incremento de corrente promovido pelo filme bicamada foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao filme de ITO/BM. O PVS provavelmente cria mais sítios de ancoragem para o BM que é adsorvido na etapa seguinte, aumentando a quantidade de BM adsorvido na superfície do eletrodo. Há também o aumento da rugosidade do sistema quando o PVS é intercalado em conjunto com o BM, acarretando numa maior área eletroativa do eletrodo, o que facilita as reações eletroquímicas do MTX (Figura 11).

Conforme observado na Figura 6C, a utilização de PAH para a formação do filme (ITO/PAH/BM) não trouxe diferenças estatisticamente significativa em relação ao ITO/MB ($p > 0,05$).

A Figura 6D compara voltamogramas de filmes contendo 1 e 2 bicamadas do filme PVS/MB. Neste caso, não houve uma diferença estatisticamente significativa entre os picos máximos de corrente para os dois voltamogramas, contudo, houve uma discreta diminuição nos valores de densidade de corrente após a adição da segunda bicamada. Este resultado pode estar relacionado ao aumento da quantidade de material não condutor (PVS) sobre o substrato, dificultando a transferência eletrônica entre o eletrodo e o fármaco com o aumento do número de camadas (SANTOS et al., 2010³⁵). Dessa forma, as análises do MTX subsequentes foram efetuadas com um filme contendo uma bicamada.

Para melhor compreender que tipo de interações governam a formação desses filmes, um estudo dos potenciais zeta das dispersões empregadas na formação dos mesmos foi realizado, conforme Tabela 1.

Tabela 1 – Potencial zeta dos materiais utilizados na produção de filmes.

Material	Potencial zeta
Mesocarpo de babaçu (MB) (1mg/mL);	-43.1
Galactomanana (GM) (1mg/mL);	-14
Goma de Angico (GA) (0,1mg/mL);	-40.9
Polímero de ácido polivinilsulfônico (PVS) (0,5mg/mL);	-19.6
Polialilamina hidrocloreada (PAH) (0,5mg/mL);	+28.8

As interações que ocorrem entre polieletrólitos altamente carregados são principalmente eletrostáticas, porém, também são possíveis outros tipos de interações secundárias do tipo Van der Waals e pontes de hidrogênio (SILVA et al., 2009³⁶). Assim, a interação eletrostática entre os materiais envolvidos não é necessariamente exclusiva e nem tampouco essencial para a formação de um filme *LbL*, onde, a depender dos materiais escolhidos, outras forças podem orientar o mecanismo de formação dos filmes (DE OLIVEIRA et al., 2015³⁷). Dessa forma, interações secundárias parecem governar os processos de formação dos filmes estudados, uma vez que tanto o BM quanto o PVS possuem carga negativa (Tabela 01).

5.3.5 – Estudos quantitativos do MTX por Voltametria de Onda Quadrada

Para estudos envolvendo o MTX, comparando-se voltamogramas de onda quadrada, pulso diferencial e de varredura linear, a onda quadrada apresenta as melhores características devido à sua maior sensibilidade e à sua elevada velocidade de varredura (GAO et al., 2007²⁹), assim essa técnica foi utilizada nesse trabalho para o estudo eletroanalítico que se segue.

Assim como a VC, a Square Wave Voltammetry (SWV) tem sido amplamente utilizada, sendo uma das técnicas voltamétricas de pulso mais rápidas e sensíveis, onde os limites de detecção podem ser comparados aos das técnicas cromatográficas e espectroscópicas (DE SOUZA; MACHADO; AVACA, 2003³⁸).

Os voltamogramas de onda quadrada apresentados na Figura 7A mostram que ao serem realizadas varreduras sucessivas nos eletrodos de ITO não modificados na presença do fármaco, os valores de corrente diminuem com o aumento do número de ciclos, fato que pode ser atribuído a oxidação irreversível do MTX. A cada etapa de varredura, a quantidade de MTX disponível na interface eletrodo/eletrólito diminui, acarretando em menores valores de corrente.

Uma solução sugerida por Wei et al. (2014²⁴) foi a adição de 0,1 mg/mL de dodecilbenzenosulfonato de sódio ao eletrólito de suporte, o que melhorou a estabilidade para o pico de oxidação mesmo após cinco varreduras sucessivas. Segundo esses autores, o tensoativo impediu a adsorção do produto oxidado do MTX ao eletrodo, deixando mais sítios disponíveis para a eletrooxidação do MTX.

No presente estudo, este problema pode ser contornado agitando-se a solução entre as medidas sucessivas, Figura 7B, optando-se assim por manter o eletrólito suporte puro.

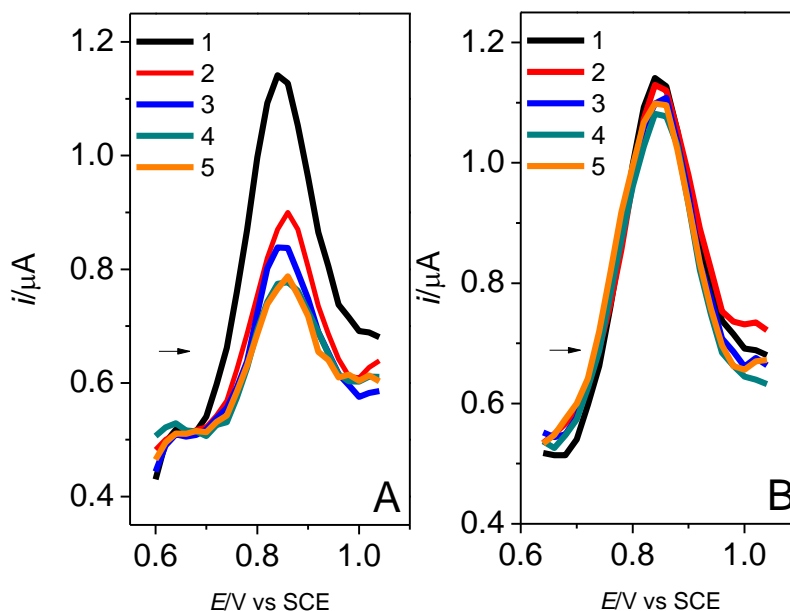


Figura 18: Voltamogramas de Onda Quadrada para os eletrodos de ITO na presença de $5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de MTX em varreduras consecutivas: A) sem agitação entre as leituras e B) com agitação mecânica entre as leituras (Tampão $\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2$ $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 3.5; Amp 20 mV; Freq 20 Hz). *Não houve diferença estatisticamente significativa entre as medidas apenas em (B).

Observou-se que o simples fato de agitar mecanicamente a solução no intervalo entre cada varredura, não houve variações significativas nos valores de corrente do sistema, mesmo após 5 ciclos, como mostrado na Figura 7B. A agitação entre cada medida foi realizada tomando-se cuidado para aguardar o sistema retornar ao repouso e proceder com uma nova varredura, minimizando assim contribuições indesejadas na corrente observada oriundas do processo de convecção.

Vários parâmetros da técnica SWV foram estudados a fim de obter a melhor resposta para a oxidação do MTX, Figura 8.

O aumento da frequência de aplicação dos pulsos de potenciais pode ser um dos artifícios utilizados para se melhorar a resposta da SWV, já que se todas as outras variáveis forem fixadas, uma vez que a sensibilidade é dada em função apenas da frequência da onda. Outra forma de melhorar a sensibilidade analítica na

SWV em processos totalmente irreversíveis é aumentar a amplitude de aplicação dos pulsos de potenciais (DE SOUZA, MACHADO e AVACA, 2003³⁸). Assim, verificou-se que um potencial de amplitude de 75 mV e frequência de 20 Hz eram suficientes para garantir aos voltamogramas uma boa definição de pico e altos valores de densidade de corrente, Figura 8 A e B.

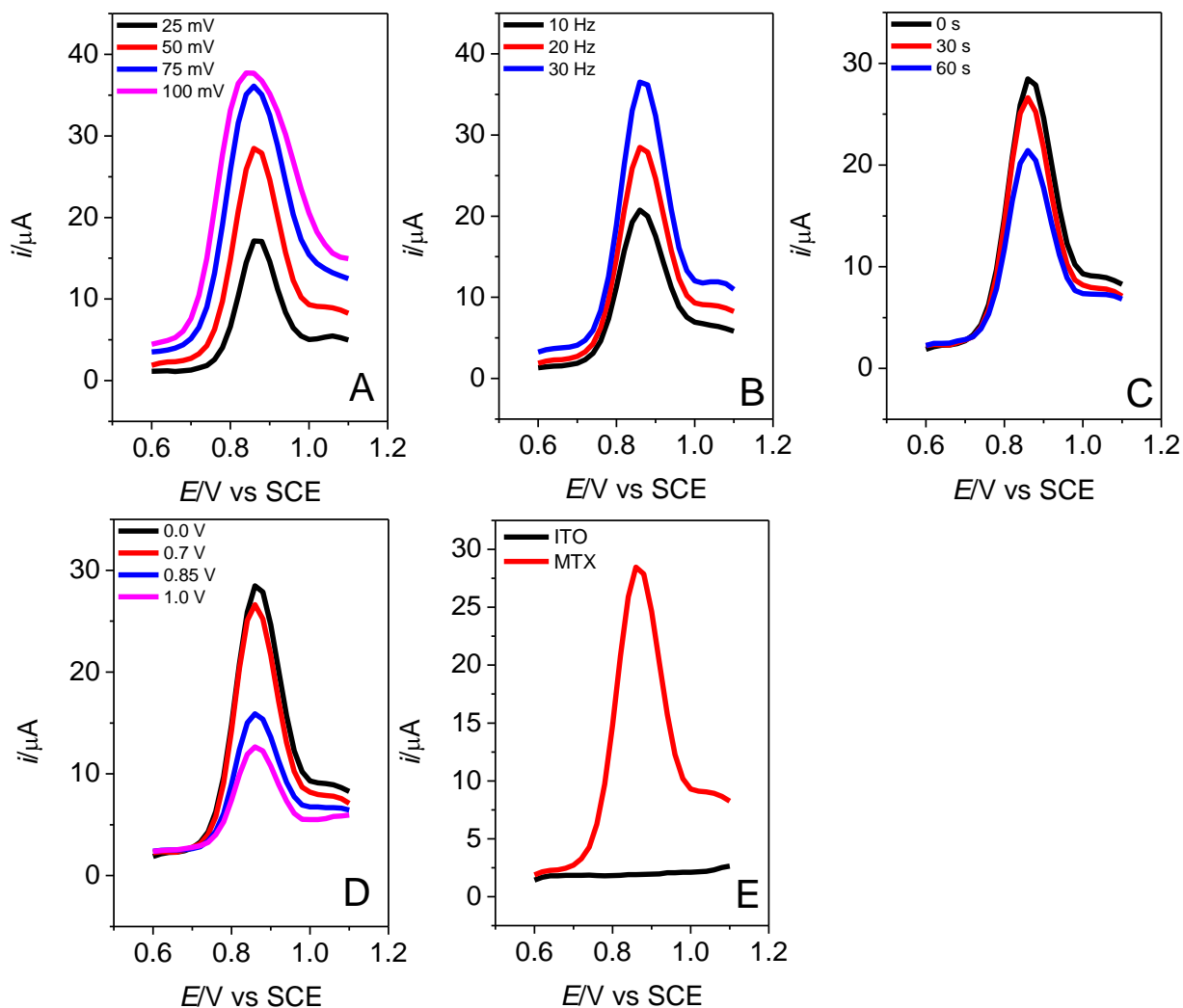


Figura 19: Voltamogramas de onda quadrada para eletrodos de ITO na presença de $6,25 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de MTX variando-se os parâmetros: A) Amplitude de potencial, B) Frequência de potencial, C) Tempo de deposição, D) Potencial de deposição e E) parâmetros definidos. (Tampão $\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2$ $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 3.5).

Verificou-se ainda que a aplicação de um potencial de deposição não trouxe vantagens aos resultados observados, pelo contrário, o valor do pico de corrente

diminuiu conforme o aumento do potencial e tempo de aplicação, Figuras 8C e D, o que pode estar promovendo a adsorção dos produtos de oxidação do MTX na superfície do eletrodo. A Figura 8E mostra voltamogramas de onda quadrada na ausência e na presença do MTX nas condições definidas.

Em etapa seguinte construíram-se curvas de calibração por SWV para o fármaco empregando-se eletrodos de ITO/PVS/BM, Figura 9. Os testes de detecção foram realizados adicionando-se alíquotas da solução estoque de MTX à célula eletroquímica, de forma que a concentração deste analito variasse de 1.0×10^{-6} a 6.25×10^{-5} mol L⁻¹. A regressão linear é mostrada na Figura 9B. Já os limites de detecção e quantificação (mostrados na tabela 02) foram estimados através das equações 1 e 2.

LD = 3.3 DP/S (Equação 1)

LQ = 10 DP/S S (Equação 2)

DP= estimativa do desvio padrão da resposta do branco experimental;
S = Slope ou coeficiente angular da curva analítica.

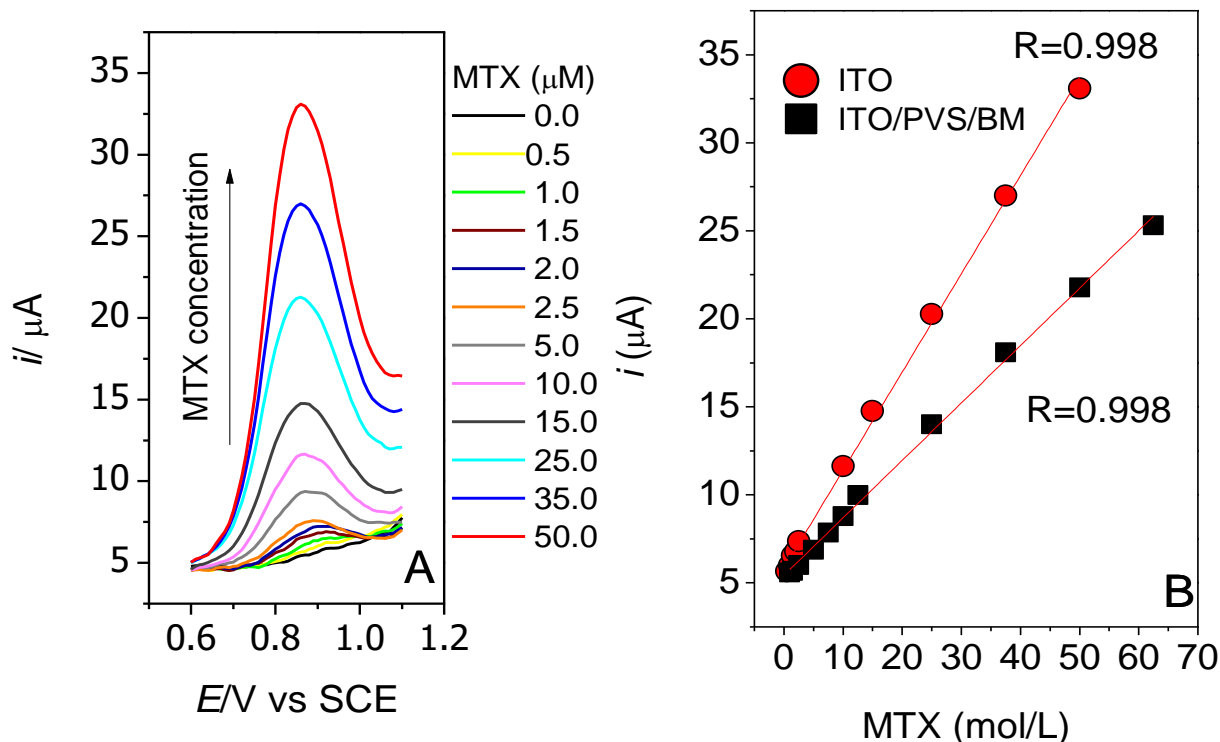


Figura 20: Voltamogramas de onda quadrada na presença de MTX (mol L⁻¹) em eletrodos de ITO/PVS/MB (Meio eletrolítico – Tampão C₂H₇NO₂ 0.2 mol L⁻¹ pH 3,5; Amp 75 mV, Freq 20 Hz) (a) e respectiva curva de calibração (b).

Após modificação do ITO com o filme de ITO/PVS/MB a sensibilidade analítica foi melhorada de $2,49 \mu\text{A}/\mu\text{mol L}^{-1}$ para $5,55 \mu\text{A}/\mu\text{mol L}^{-1}$ quando utilizou-se o filme, fato observado na inclinação das curvas analíticas apresentadas na Figura 9B. De qualquer forma, o ITO sozinho poderia ser utilizado para a detecção do MTX e, até então, não foram encontrados na literatura dados sobre o comportamento eletroquímico do MTX em ITO, justificando também a importância desse estudo.

5.3.6 – Comparação entre as técnicas de espectrofotometria UV-VIS e SWV usando-se eletrodos ITO/PVS/MB.

A partir da elaboração da curva de calibração para o MTX pela técnica de SWV utilizando-se eletrodos de ITO/PVS/MB, também procedemos com a construção de uma curva de calibração para o MTX por espectrofotometria UV-VIS para fins de comparação entre os intervalos lineares de leitura e limites de detecção entre diferentes métodos.

A maioria dos trabalhos publicados referentes à molécula de MTX utilizam detectores espectrofotométricos de UV-Vis, devido à presença de um grupo pteridina heterocromático cromóforo neste fármaco, o qual possui absorvância máxima dependente do pH (RUBINO, 2001³⁹).

A curva de calibração para o MTX obtida em tampão acetato de amônio ($0,2 \text{ molL}^{-1}$, pH 3.5), apresentou maiores limites de detecção, sendo menos sensível em relação à utilização de HCl $0,1 \text{ molL}^{-1}$ (resultados não apresentados). Assim, a curva obtida em HCl $0,1 \text{ molL}^{-1}$ foi utilizada, Figura 10.

Com base nos resultados apresentados na Tabela 2, verificam-se faixas lineares de quantificação muito próximas obtidas para o fármaco nas técnicas utilizadas, onde com a espectrofotometria UV-Vis foi possível obter uma curva variando a concentração de MTX de $5,0 \times 10^{-6}$ a $15 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$. Para os eletrodos de ITO/PVS/MB uma faixa linear variando de $1,5 \times 10^{-6}$ a $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ foi obtida.

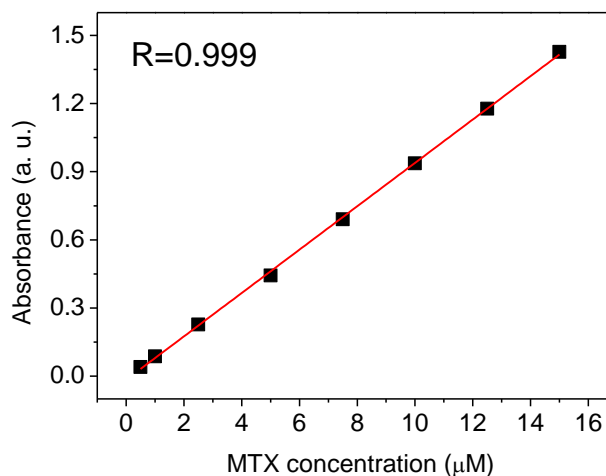


Figura 21: Curva de calibração do MTX por espectrofotometria UV-Vis.

Table 5- Metodos para quantificação de MTX neste trabalho.

Metodo	Intervalo linear (mol L ⁻¹)	LD (mol L ⁻¹)
Espectrofotometria	5.0 x10 ⁻⁶ a 15 x10 ⁻⁵	3.5x10 ⁻⁶
Voltametria de Onda Quadrada com ITO/PVS/MB	1.5x10 ⁻⁶ a 5.0x10 ⁻⁵	5.95 x 10 ⁻⁷

Assim, verifica-se que os métodos aqui propostos são eficazes para a detecção de MTX.

5.3.7 – Estudo da morfologia e rugosidade do sensor

A partir da otimização dos parâmetros de preparo do filme que apresentou as melhores características quanto à densidade de corrente e definição do pico anódico para a eletrooxidação do MTX, avaliou-se a morfologia e rugosidade do filme ITO/PVS/MB por Microscopia de Força Atômica.

Inicialmente, como controle, estudou-se o substrato de ITO, e, em seguida, os filmes ITO/PVS e ITO/PVS/MB, conforme mostra a Figura 11.

Os eletrodos de ITO apresentam uma microestrutura bem conhecida e com padrões característicos, que já foram observados anteriormente por AFM, como por exemplo, por EATON e WEST, 2010²⁷. Esta estrutura, mostrada na Figura 11A, consiste em “ilhas rasas”, constituídas de grãos globulares muitos pequenos que estão acima de grãos globulares semelhantes, situados em um nível inferior.

A morfologia da monocamada de PVS foi semelhante à do ITO não modificado, embora tenha exibido o aparecimento de pequenos grãos distribuídos por toda a área estudada (Figura 11B). Nos filmes ITO/PVS/MB, a presença de algumas estruturas foram observadas exibindo características globulares maiores em várias áreas com a estrutura de "ilha" do ITO completamente ausente (Figura 11C) sendo essa área a mais representativa para o filme, contudo, em algumas áreas, observaram-se grandes aglomerados globulares (Figura 11D e 11E), que podem estar relacionados também à solubilidade limitada do MB no meio utilizado.

A rugosidade dos filmes de PVS/MB mostram um incremento significativo em comparação aos eletrodos não modificado e modificado com PVS, devido à presença do MB, Figura 11F. Esse aumento na rugosidade pode ser vantajoso uma vez que pode implicar também no aumento da área superficial do eletrodo modificado por este material, que por sua vez, pode acarretar em uma maior adsorção de moléculas biológicas e facilitar reações químicas (ZHANG et al., 2015⁴⁰), o que pode estar relacionado à maior interação entre o analito e o filme levando a uma maior densidade de corrente, conforme observado na Figura 6C.

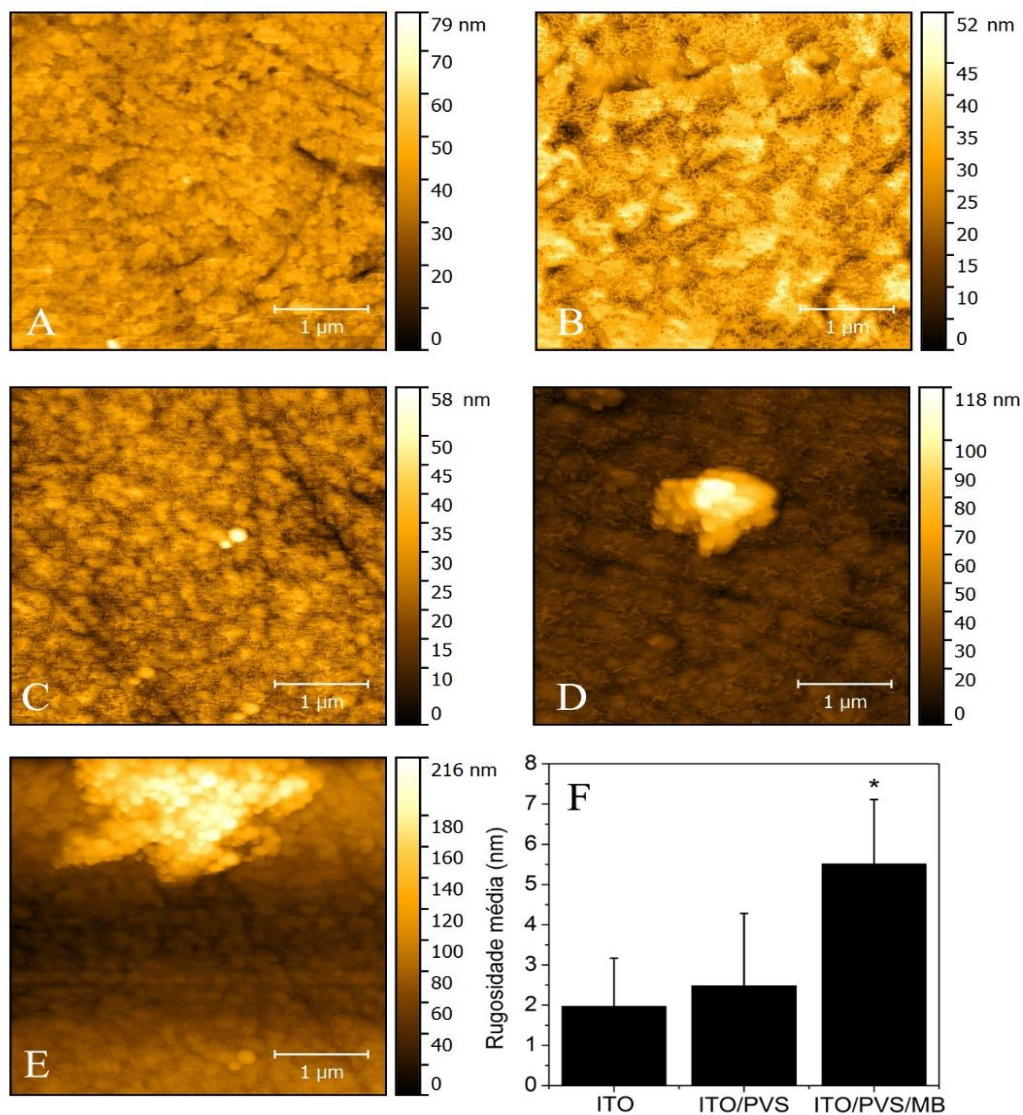


Figura 22: Microscopia de Força Atômica de eletrodos de A) ITO –eletrodo não modificado; B) ITO/PVS – eletrodo de ITO modificado com PVS (0,5mg/ml); C,D e E) ITO/PVS/MB – eletrodo de ITO modificado com PVS (0,5mg/ml) e mesocarpo de babaçu (1mg/ml) em diferentes áreas; F) – Rugosidade média dos sistemas estudados; (*) $p < 0,05$

5.4. CONCLUSÃO

A modificação de ITO a partir do filme bicamada de PVS/MB melhorou a resposta eletroquímica para fármaco, fato que pode ser atribuído à maior superfície de contato adquirida pelo eletrodo após sua modificação, conforme observado por AFM. O sensor produzido apresentou uma resposta linear entre $1,5 \times 10^{-6}$ e $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, com um LD de $5,95 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, demonstrando o potencial que esta técnica possui em quantificar o fármaco em baixíssimas concentrações.

Assim, o desenvolvimento de novas metodologias para análise desse fármaco mostram-se promissoras, merecendo destaque o desenvolvimento de sensores com materiais naturais financeiramente acessíveis e abundantes. Novos estudos visando o aperfeiçoamento desses sistemas bem como a validação das metodologias analíticas devem ser motivados a fim de se obter uma técnica rápida, prática e segura para determinação de MTX.

REFERENCIAS

- 1 - GUERRA, M.R. DE MOURA GALLO, C. V. MENDONÇA, G. A. S. The risk of cancer in Brazil: tendencies and recent epidemiologic studies. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 3, p. 227-234, 2005.
- 2 - MAIA, P. G.; DE BRITO, J. C. Riscos relacionados à exposição de trabalhadores a quimioterápicos antineoplásicos: uma análise crítica da produção científica brasileira. **Revista Tempus Actas de Saúde Coletiva**, p. 251-265, 2011.
- 3 - MARTINS, I. DELLA ROSA, H. V. Considerações toxicológicas da exposição ocupacional aos fármacos antineoplásicos. **Rev. Bras. Med. Trab.** v. 2, n. 2, p. 118-125, 2004.
- 4 - RIZALAR, S.; TURAL, E.; ALTAY, B. Nurses' protective measures during chemotherapy preparation and administration in Turkey. **International Journal of Nursing Practice**, v. 18, p. 91-98, 2012.
- 5 - LUTTERBECK, C. A. et al. Removal of the anti-cancer drug methotrexate from water by advanced oxidation processes: Aerobic biodegradation and toxicity studies after treatment. **Chemosphere**, v. 141, p. 290-296, 2015.
- 6 - FLOREA, A. et al. Anticancer drug detection using a highly sensitive molecularly imprinted electrochemical sensor based on an electropolymerized microporous metal organic framework. **Talanta**, v. 138, p. 71–76, 2015.
- 7 - LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos. **Quím. Nova**, v. 29, n. 6, p.1318-1325, 2006
- 8 - WU, X. et al. Functionalized Polyfluorene Film Sensors for Sensitive Detection of Iron (III) in both Organic and Aqueous Media. **Macromolecules**, v. 43, n. 21, p. 8917–8923, 2010.
- 9 - JAMES, J. Z.; LUCAS, D.; KOSHLAND, C. P. Gold Nanoparticle Films As Sensitive and Reusable Elemental Mercury. **Sensors Environ. Sci. Technol**, v.46, n. 17, p. 9557–9562, 2012.
- 10 - AHMADI, F. et al. Synthesis of Ag nanoparticles for the electrochemical detection of anticancer drug flutamide. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 36, n. 3, p. 439–445, 2015.
- 11 - BRAHMAN, P. K. et al. Voltammetric determination of anticancer drug flutamide in surfactant media at polymer film modified carbon paste electrode. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 396, p. 8–15, 2012.
- 12 - SHOJAEI, A. F. et al. A novel 5-fluorouracil anticancer drug sensor based on ZnFe₂O₄ magnetic nanoparticles ionic liquids carbon paste electrode. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, v. 230, p. 607–614, 2016

- 13 - RIBEIRO, J. A.; SILVA, F.; PEREIRA, C. M. Electrochemical study of the anticancer drug daunorubicin at a water/oil interface: Drug lipophilicity and quantification. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 3, p. 1582–1590, 2013.
- 14 - HAJIAN, R. et al. Fabrication of an electrochemical sensor based on carbon nanotubes modified with gold nanoparticles for determination of valrubicin as a chemotherapy drug: Valrubicin-DNA interaction. **Materials Science and Engineering C**, v. 49, p. 769–775, 2015.
- 15 - BEITOLLAHI, H.; RAOOF, J.-B.; HOSSEINZADEH, R. Electroanalysis and simultaneous determination of 6-thioguanine in the presence of uric acid and folic acid using a modified carbon nanotube paste electrode. **Analytical Sciences**, v. 27, n. 10, p. 991, 2011.
- 16 - LIMA, H. R. S. SILVA, J. S. DE OLIVEIRA FARIAS, E. A. BTEIXEIRA, P. R. S. CEIRAS, C.BCUNES, L. C. C. Electrochemical sensors and biosensors for the analysis of antineoplastic drugs. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 15, p. 27-37, 2018.
- 17 - DECHER, G. Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites. **Science**, v. 277, p. 1232-1237, 1997.
- 18 - EGAWA, Y. et al. Electrochemical and optical sugar sensors based on phenylboronic acid and its derivatives. **Materials Science and Engineering: C**, v. 31, n. 31, p. 1257-1264, 2011.
- 19 - MANTHA, S. et al. Nanocomposite Layer-by-Layer Assembled Catalytic Interfaces for Biosensing Applications. **Langmuir**, v. 26, n 24, p. 19114–19119, 2010.
- 20 - TEIXEIRA, P.R.S., TEIXEIRA, A.S.M., FARIAS, E.A.. et al. Chemically modified babassu coconut (*Orbignya sp.*) biopolymer: characterization and development of a thin film for its application in electrochemical sensors. **J Polym Res**, v. 25, p.127, 2018.
- 21 - VIEIRA, A.P. et al. Kinetics and thermodynamics of textile dye adsorption from aqueous solutions using babassu coconut mesocarp. **J. Hazard. Mater**, v. 166, p. 1272–1278, 2009.
- 22 - EIRAS, C.; SANTOS, A. C.; ZAMPA, M. F.; et al. Natural polysaccharides as active biomaterials in nanostructured films for sensing. **J. Biomater. Science**. v. 21, p. 1533-1544, 2010.
- 23 - EIRAS, C. et al. Nanocompósitos eletroativos de poli-o-metoxianilina e polissacarídeos naturais. **Quím. Nova**, v. 30, n.5, 2007.
- 24 - WEI, Y. et al. Highly sensitive determination of methotrexate at poly (l-lysine) modified electrode in the presence of sodium dodecyl benzene sulfonate. **Bioelectrochemistry**, v. 98, p. 70–75, 2014

25 - COSTA, S. M. O.; RODRIGUES, J. P. A.; DE PAULA, R. C. M.; Polímeros: Ciência e Tecnologia, 1996.

26 - DE OLIVEIRA FARIAS, E.A., NOGUEIRA, S.S., DE OLIVEIRA FARIAS, A.M. et al. A thin PANI and carrageenan–gold nanoparticle film on a flexible gold electrode as a conductive and low-cost platform for sensing in a physiological environment *J Mater Sci.* v. 52, n. 23, p.13365–13377, 2017.

27 - EATON, P.; WEST, P. **Atomic Force Microscopy**. Oxford University Press. Oxford. UK, 2010.

28 - TORMAN, V. B. L. et al. Normalidade de variáveis: métodos de verificação e comparação de alguns testes não-paramétricos por simulação. **Rev HCPA**, v. 32, n. 2, 2012.

29 - GAO, L. et al. Anodic voltammetric behaviors of methotrexate at a glassy carbon electrode and its determination in spiked human urine. **Journal of Electroanalytical Chemistry**. v. 610, p. 131–136, 2007.

30 - WANG, F. et al. DNA Langmuir-Blodgett modified glassy carbon electrode as voltammetric sensor for determinate of methotrexate. **Electrochimica Acta**, v. 54, n. 5, p. 1408–1413, 2009

31 - WANG, Y. et al. Electrochemical oxidation behavior of methotrexate at DNA/SWCNT/Nafion composite film-modified glassy carbon electrode. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 16, n. 10, p. 3227–3235, 2012a

32 - PONTINHA, A. D. R. et al. Antineoplastic drug methotrexate redox mechanism using a glassy carbon electrode. **Electroanalysis**, v. 24, n. 4, p. 917–923, 2012.

35 - SANTOS, A. C. et al. Organização supramolecular da ftalocianina de cobalto (II) e seu efeito na oxidação do aminoácido cisteína. **Quim. Nova**, v. 33, n. 3, p. 539-546, 2010.

36 - SILVA, W. C. et al. Synergistic Interaction between gold nanoparticles and nickelphthalocyanine in layer-by-layer (LbL) films: evidence of constitutional dynamic chemistry (CDC). **Chem. Phys**, v. 11 p. 5086-5091, 2009.

37 - DE OLIVEIRA, R. F.; XAVIER, A. C. F.; DE BARROS, A.; FERREIRA, M. Filmes nanoestruturados: técnicas de Langmuir Blodgett (LB) e Layer-by-layer (LbL). **Nanoestruturas**, v.1, p. 123-145, 2015

38 - DE SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: Aspectos teóricos. **Quim. Nova**, v. 26, N. 1, p. 81-89, 2003

39 - RUBINO, F. M. Separation methods for methotrexate, its structural analogues and metabolites. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 764, n 1-2, p. 217-254, 2001.

40 - ZHANG, G. Nanoscale Surface Modification for Enhanced Biosensing: A Journey Toward Better Glucose Monitoring, **Springer**. 2015.

Farmacopéia Brasileira. 4 ed. ed.: São Paulo: Atheneu, 2003.