Universidade de São Paulo

Instituto de Química

Programa de pós graduação em Química

RAFAEL MARTOS BUORO

**Derivados de lignina e DNA como agentes
modificadores no desenvolvimento de sensores
voltamétricos**

Versão corrigida da tese defendida e depositada na sPG

05/12/2014

São Paulo

2014

RAFAEL MARTOS BUORO

**Derivados de lignina e DNA como agentes
modificadores no desenvolvimento de sensores
voltamétricos**

Tese apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências (Química).

Orientador: Profa. Dra. Silvia
Helena Pires Serrano.

São Paulo

2014

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Buoro, Rafael Martos
B944d Derivados de lignina e DNA como agentes modificadores no
desenvolvimento de sensores voltamétricos / Rafael Martos
Buoro. -- São Paulo, 2014.
174p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Serrano, Silvia Helena Pires

1. Voltametria : Química analítica 2. Lignina 3. DNA
4. Sensores químicos I. T. II. Serrano, Silvia Helena Pires,
orientador.

543.0871 CDD

Agradecimentos

À Profa. Dra. Silvia Helena Pires Serrano pela ORIENTAÇÃO, conhecimento e amizade.

Ao Prof. Dr. Antonio William de Oliveira Lima por toda colaboração científica, pessoal e amizade.

À Profa. Dra. Ana Maria Coelho Oliveira-Brett, pela supervisão e suporte enquanto em Portugal

Aos professores do instituto de Química da Universidade de São Paulo por terem contribuído em algum momento com a formação acadêmica e/ou com o trabalho científico.

Aos meus colegas de Laboratório no Brasil; Robson, Fernando (Caracol), Daniel Medinas, Rapha, Luis Cides, Carol, Fernando (Maylla), Othon, Adriana (Dri), Amanda, Claudia, pelas discussões científicas, por suportarem minhas lágrimas e estimularem meus sorrisos

Aos meus colegas de laboratório em Portugal; Victor Diculescu, Adrian Enache, Ana Chiorcea, Ilanna Lopes, Carlos Oliveira, Sara Gomes, Dora Pontinha, Oana Popa, Martina Zatloukalová, e Márcia Manaia, pela recepção calorosa, companheirismo e amizade.

À Cibeles Rosani pelo suporte e dedicação no trâmite do processo do estágio em Portugal

A todos os funcionários do IQ-Usp que colaboraram direta ou indiretamente com a produção deste material.

À empresa Conpacel pelo fornecimento das amostras de licor negro (kraft).

À Gabriela Ávila Fernandes Silva pelo suporte e apoio.

À toda minha família, pela crença, investimento, suporte e amor.

À minha mãe Aparecida, pai Antonio e irmão Diego, pelo amor incondicional, suporte e apoio que permitiram a possibilidade de realização de todo este trabalho.

Às agências de fomento, CAPES pela bolsa de doutorado e doutorado sanduíche concedidas e FAPESP pelo suporte financeiro ao projeto temático.

Não sei quantas almas tenho

*Não sei quantas almas tenho.
Cada momento mudei.
Continuamente me estranho.
Nunca me vi nem acabei.
De tanto ser, só tenho alma.
Quem tem alma não tem calma.
Quem vê é só o que vê,
Quem sente não é quem é,*

*Atento ao que sou e vejo,
Torno-me eles e não eu.
Cada meu sonho ou desejo
É do que nasce e não meu.
Sou minha própria paisagem;
Assisto à minha passagem,
Diverso, móbil e só,
Não sei sentir-me onde estou.*

*Por isso, alheio, vou lendo
Como páginas, meu ser.
O que segue não prevendo,
O que passou a esquecer.
Noto à margem do que li
O que julguei que senti.
Releio e digo: "Fui eu?"
Deus sabe, porque o escreveu.*

Fernando Pessoa.

Resumo

Buoro, R. M. **“Derivados de lignina e DNA como agentes modificadores no desenvolvimento de sensores voltamétricos”** 2014. 174p. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Neste trabalho, 2 diferentes procedimentos foram utilizados para a extração de lignina a partir do licor negro, caracterizando-se quimicamente as amostras de lignina obtidas em relação a uma lignina comercial, visando a aplicação no desenvolvimento de sensores voltamétricos. A análise elementar, espectroscopia na região do infravermelho, análise térmica e caracterização eletroquímica do material mostraram que, tanto a origem da lignina quanto a metodologia de obtenção da mesma, a partir do licor negro, podem fornecer materiais com propriedades químicas distintas, embora possuam comportamento eletroquímico similar. Observou-se, também, que a lignina só pode ser armazenada na forma sólida, devido à oxidação pelo oxigênio dissolvido durante o tempo em que a solução mãe é armazenada. No entanto, a oxidação da lignina é necessária quando se tem por objetivo o desenvolvimento de sensores voltamétricos, devido a predominância de carbonos sp^2 na estrutura química oxidada, condição em que se obtém maior condutividade. Constatou-se também a necessidade de utilizar um transdutor metálico para o desenvolvimento de eletrodos quimicamente modificados com este material, visto que os eletrodos de carbono modificados com lignina oxidada ou não oxidada não apresentaram atividade eletroquímica. Devido à pequena porcentagem de enxofre existente na estrutura química, a lignina oxidada tende a se organizar pelos grupamentos SH quando na presença de ouro, expondo os grupamentos quinônicos eletroativos. A lignina oxidada ainda foi utilizada no preparo de eletrodo de pasta de carbono com nanopartículas de ouro, na qual a lignina oxidada impregnada no grafite atua como redutor *“in-situ”* do ouro, permitindo o preparo de um sensor voltamétrico versátil, capaz de realizar a determinação de ácido ascórbico, dopamina, nitrito e iodato. No que tange ao comportamento eletroquímico de fármacos e estudos de interação fármaco-DNA, eletrodos de carbono foram modificados com DNA de dupla fita com a finalidade de monitorar a interação DNA-Gemcitabina. O fármaco não apresentou atividade eletroquímica tanto na região positiva quanto na região negativa de potencial. A interação do mesmo com o DNA promove a condensação/agregação das duplas fitas do DNA em uma primeira etapa, seguida da clivagem do nucleosídeo guanina, formando guanina livre. O comportamento eletroquímico de leflunomida e sulfasalazina, dois fármacos aplicados ao tratamento da artrite reumatóide, foi estudado e mecanismos de oxidação foram propostos para cada fármaco.

Palavras Chave: Voltametria, Lignina, DNA, Sensor Eletroquímico.

Abstract

Buoro, R. M. “**Lignin derivatives and DNA as modifying agents in the development of voltammetric sensors**” 2014. 174p. PhD Thesis – PhD program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The chemical properties of samples of lignin, which were precipitated from black liquor using two different methodologies (precipitation with CO_2 and H_2SO_4), were studied and the results compared to those obtained from a commercial lignin sample in order to prepare voltammetric sensors. The elementary analysis, infrared spectroscopy, thermal analysis and electrochemical characterization of the material demonstrated that both, the source of lignin and the precipitation method from the black liquor, can provide lignin samples with different chemical properties, although the electrochemical behavior of all samples has been the same. Lignin could only be stored in solid form as lignin in the black liquor is slowly and quantitatively oxidized by dissolved oxygen, preventing the extraction procedures. However, the lignin as extracted from black liquor cannot be used to modify solid electrodes due its high resistivity. The previous oxidation of the all material was necessary when the aim was its application on the sensors development. The electrical conductivity in the oxidized lignin was achieved, probably due to the predominance of sp^2 hybridized carbon atoms, which improved orbital overlapping in the material. In addition, it was necessary to use a metallic transducer to produce electrodes modified with films of lignin with good electrochemical activity. The films drying time was also important parameter, which suggested a specific organization of lignin macromolecules over the electrode surface. Due to the small percentage of sulfur in the material, the oxidized lignin tended to be organized by the SH groups in the presence of metallic substrates, exposing its electroactive quinone groups. The oxidized lignin was further used to prepare carbon paste electrodes modified with gold nanoparticles, in which the impregnated oxidized lignin on graphite acted as an “in situ” reducing agent towards HAuCl_4 . The resulting composite allowed the preparation of a versatile voltammetric sensor, capable of detecting ascorbic acid, dopamine, nitrite and iodate. Regarding the electrochemical behavior and drug interaction studies DNA-molecule, carbon electrodes were modified with double strand DNA with the purpose of monitoring Gemcitabine-DNA interaction. The drug showed no electrochemical activity both, in the positive and the negative potential. The Gemcitabine-DNA interaction promoted condensation / aggregation of the double strand DNA in a first step, followed by cleavage of the nucleoside guanosine in the form of free guanine. In addition, the electrochemical behavior of sulfasalazine and leflunomide, two pharmacological compounds applied to the treatment of rheumathoid arthritis, were studied and their oxidation mechanisms were proposed.

Keywords: Voltammetry, Lignin, DNA, Electrochemical Sensor

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -TFAT – 4-(trifluorometil)acetanilida

AR – Artrite Reumatóide

AS – Ácido Salicílico

BDDE – Eletrodo de diamante dopado com boro

a-BDDE – Eletrodo de diamante dopado com boro pré-tratado anodicamente

c-BDDE – Eletrodo de diamante dopado com boro pré-tratado catodicamente

DNA – Ácido desoxirribonucleico

ds-DNA – Ácido desoxirribonucleico dupla fita

DMF – Dimetilformamida

ECV – Eletrodo de Carbono Vítreo

ECV-LIGs – Eletrodo de carbono vítreo modificado com lignina comercial

ECV-LIG_{CO2} – Eletrodo de carbono vítreo modificado com lignina precipitada com CO₂

ECV-LIG_{H2SO4} – Eletrodo de carbono vítreo modificado com lignina precipitada com H₂SO₄

EAu-LIG/EAu-Ligoxi – Eletrodo de ouro modificado com lignina comercial/lignina comercial oxidada

Ep,A – Potencial de pico anódico

Ep,c – Potencial de pico catódico

EapI – Potencial aplicado ao eletrodo de trabalho

EAu – Eletrodo de ouro

ECu – Eletrodo de cobre

EPC – Eletrodo de pasta de carbono

EPC-LIG – Eletrodo de pasta de carbono modificado com lignina

EPC-LIG-Au – Eletrodo de pasta de carbono modificado com lignina e nanopátículas de ouro

EPC-Ligoxi – Eletrodo de pasta de carbono modificado com lignina oxidada

EPC-AuNp – Eletrodo de pasta de carbono modificado com nanopartículas de ouro

EPCM – Eletrodo de pasta de carbono modificado

FTIR– Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier

GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas

GEM – Gemcitabina

Ip,A – Corrente de pico anódica

Ip,c – Corrente de pico catódica

LFM – Leflunomida

LIGs– Lignina obtida comercialmente.

LIGs-oxi– Lignina obtida comercialmente após oxidação química

LIGCO₂–Lignina precipitada do licor negro a partir do método do CO₂

LIGH₂SO₄– Lignina precipitada do licor negro a partir do método do H₂SO₄

m_{grafite} – massa de grafite

m_{LIG} – massa de lignina

m_{LIGOXI} – massa de lignina oxidada

m_{Au} – massa de tetracloraurato ácido (HAuCl₄)

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

PMMA – Polimetil metacrilato

Poli-A – Poliadenosina

Poli-G –Poliguanosina

Q/HQ – Grupos funcionais quinona/hidroquinona

RMN– Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

SSZ – Sulfasalazina

VC – Voltametria Cíclica

VOQ – Voltametria de Onda Quadrada

VPD–Voltametria de Pulso Diferencial

Uv-Vis – Ultravioleta-Visível

$W_{1/2}$ – Largura de pico à meia altura

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Mecanismo da reação principal do processo Kraft.....	3
Esquema 2. Estruturas química dos álcoois dos componentes básicos da lignina.....	4
Esquema 3. Um Oligômero de Lignina.....	5
Esquema 4. Estrutura química do dsDNA.....	15
Esquema 5. (A) Estrutura química da Gemcitabina e (B) estrutura química da citidina.....	18
Esquema 6. Estrutura molecular da sulfasalazina.....	20
Esquema 7. Estrutura química da leflunomida, metabólito ativo (A771726) e α - TFAT.....	21
Esquema 8. Procedimento de modificação de eletrodos sólidos com filmes lignina.....	33
Esquema 9. Principais Reações do processo Kraft envolvendo ligações β -aryl-éteres. R=H, alquil ou aril. (Adaptado de SJÖSTRÖM, 1993).....	43
Esquema 10. Mecanismo de saída de grupos metoxil da lignina e formação de grupos fenóis	44
Esquema 11. Mecanismo de Oxidação dos grupos funcionais da lignina.....	54
Esquema 12. Mecanismo de oxidação eletroquímica do par Q/HQ presente após oxidação eletroquímica da lignina.....	56
Esquema 13. Mecanismo proposto par a reação de transferência de carga no complexo $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$ na interface ECV-LIGs/Solução.....	66
Esquema 14. Mecanismo proposto de oxidação da SSZ.....	116
Esquema 15. Mecanismo proposto para a oxidação eletroquímica de LFM em ECV.....	129

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Espectro vibracional das amostras de lignina (I) Espectro total (II) Faixa espectral de 1900 - 400cm ⁻¹	45
Figura 2. Espectros vibracionais de amostra de LIG _{CO2} (—) e LIG _{H2SO4} (—).....	47
Figura 3. Curvas TG/DTG para amostras (A) LIG _s , (B) LIG _{CO2} e (C) LIG _{H2SO4} em atmosfera de ar.....	49
Figura 4. Curvas TG/DTG para amostras (A) LIG _s , (B) LIG _{CO2} e (C) LIG _{H2SO4} em atmosfera de N ₂	50
Figura 5. Curvas DSC de lignina obtida por precipitação com CO ₂ e H ₂ SO ₄	52
Figura 6. Voltamogramas cíclicos obtidos com ECV-LIG _s em eletrólito suporte. Condições experimentais: tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH 6,5. $v = 100\text{mV s}^{-1}$; - 0,2 V ≤ E _{apl} ≤ 0,6 V. Ciclos: 1,3,5,10,15,20,25 e 30 de um total de 30 voltamogramas.....	53
Figura 7. Imagens de microscopia Óptica do ECV-LIGs antes do tratamento em tampão fosfato(A,C) e após tratamento em tampão fosfato (B,D).....	55
Figura 8. Voltamogramas cíclicos obtidos com ECV-LIG _s após estabilização das correntes de pico. Condições experimentais: tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH 6,5. $v = 100\text{mV s}^{-1}$; - 0,2 V ≤ E _{apl} ≤ 0,6 V. Ciclos: 1,3,5,10,15,20,25 e 30 de um total de 30 voltamogramas.....	56
Figura 9. Voltamogramas cíclicos obtidos com o (—) ECV-LIG _s , (— — —) ECV-LIG _{CO2} e (•••) ECV-LIG _{H2SO4} em Tampão fosfato pH 6,5; 0,1 mol L ⁻¹ , após estabilização dos sinais. Condições experimentais: 3º ciclo de cada série de voltamogramas registrados com $v = 100\text{mV s}^{-1}$ e - 0,2 V ≤ E _{apl} ≤ 0,7 V.....	57

Figura 10. (A) Influência da velocidade de varredura nos voltamogramas cíclicos obtidos com o ECV-LIGs em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,5. (B) Variação de I_P ($I_{P,A}$ e $I_{P,C}$) como função da velocidade de varredura de potencial, v . Condições experimentais: $0,2 \text{ V} \leq E_{apl} \leq 0,7 \text{ V}$ e 3º ciclo de cada série de voltamogramas obtidos usando $v = 25, 50, 100, 225, 400, 625$ e 900 mV s^{-1}58

Figura 11. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos com ECV-LIGs após a primeira varredura até E_{lim} (B) Gráfico de $E_{p,a}$, $E_{p,c}$ e ΔE_p em função do E_{lim} aplicado na varredura anterior e (C) Gráfico de $I_{p,a}$ e $I_{p,c}$ em função do E_{lim} aplicado na varredura anterior. Condições experimentais: $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$; tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,5; Primeira Varredura: $0,1 \text{ V} \leq E_{apl} \leq -0,8; -0,9; -1,0; -1,1; -1,2; \text{ ou } -1,5 \text{ V}$. Segunda Varredura: $-0,3 \text{ V} \leq E_{apl} \leq 0,7 \text{ V}$ 59

Figura 12. Imagens de microscopia óptica do (A) ECV-Limpo; (B) ECV-LIGs; (C) ECV-LIGs após varreduras do eletrodo em potenciais acima de $0,8 \text{ V}$. Ampliação 20x.....60

Figura 13. Gráfico de I_p em função do E_{lim} . Corrente medida a partir do 5 ciclo. Condições experimentais: $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$; tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,5; $-0,3 \text{ V} \leq E_{apl} \leq 0,8; 0,9; 1,0; 1,1; 1,5 \text{ V}$61

Figura 14. Variação de $E_{p,a}$ (●●●) e $E_{p,c}$ (■ ■ ■) como função pH do meio. Voltamogramas obtidos em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 3,0; 4,5; 6,5; 8,0; 10. ($E_{p,a} = 0,640 - 0,0569 \text{ pH}$ e $E_{p,c} = 0,470 - 0,0582 \text{ pH}$). Condições experimentais: $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ e $-0,3 \text{ V} \leq E_{apl} \leq 0,7 \text{ V}$ 62

Figura 15. Voltamogramas cíclicos obtidos com ECV-LIGs contendo, separadamente, soluções de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$ e $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+/+}$. Condições Experimentais: $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$; $-0,4 \text{ V} \leq E_{apl} \leq 0,6 \text{ V}$; $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8,2 e, $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+/+}$ em $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8,2 ajustado com $\text{NaOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$63

Figura 16. Voltamogramas cíclicos obtidos com ECV-Limpo (-■-) e ECV-LIGs (-●-) em solução 1,0 mmol L⁻¹ de [Ru(NH₃)₆]^{3+/2+} em 0,2 mol L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, pH 8,2 ajustado com NaOH 0,1 mol L⁻¹. Condições Experimentais: $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$, $-0,4 \text{ V} \leq E_{apl} \leq 0,7 \text{ V}$66

Figura 17. (A) $I_{p,a}$; $I_{p,c}$ e relação $I_{p,c}/I_{p,a}$ obtidas em (NH₄)₂SO₄ 0,2 mol L⁻¹, pH 8,2 com ECV-LIGs como função do número de ciclos, após a utilização do eletrodo em soluções contendo [Ru(NH₃)₆]^{3+/2+} e, (B) Voltamogramas cíclicos obtidos com o ECV-LIGs em (NH₄)₂SO₄ 0,2 mol L⁻¹, após utilização em solução do complexo de Rutênio (ciclos 1,3,5). Condições experimentais: $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$ e $-0,4 \text{ V} \leq E_{apl} \leq 0,7 \text{ V}$67

Figura 18. Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de 1,0 mmol L⁻¹ de [Fe(CN)₆]^{3-/4-} em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH = 6,0 com eletrodo de ouro modificado com: (A) (●●●) LIG e (—) LIGs-oxi ambos com secagem de filme por uma noite. (B) LIGs-oxi com secagem de filme (—) secagem de filme por uma noite, (---) em estufa por 3h a 60°C e (●●●) sob fluxo de ar quente.....70

Figura 19. Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de 1,0 mmol L⁻¹ de [Fe(CN)₆]^{3-/4-} em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH = 6,0 com (—) EAU- LIGs-oxi e (●●●) ECV-LIGs-oxi ambos com secagem por uma noite.....70

Figura 20. Espectros na região do infravermelho para (1) Lignina comercial não oxidada; (2) Lignina comercial após oxidação química72

Figura 21. Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,1 contendo 1,0 mmol L⁻¹ [Fe(CN)₆]^{3-/4-} com (A) EAU limpo e (B) EAU-LIGs-oxi(SP1N). Condições Experimentais: $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$; $E_i = -0,7 \text{ V}$, $E_\lambda = +0,7 \text{ V}$, $E_f = -0,7 \text{ V}$. Os voltamogramas representados correspondem às varreduras 1, 2, 4, 6, 8 e 10.....74

Figura 22. Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,1 para concentrações de 0,1; 0,2; 0,3 e 0,4 mmol L⁻¹ de H₂O₂ com: (A) EAU sem modificação e com (B) EAU-LIGs-oxi(SP1N). Condições Experimentais: $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$; $E_i = -0,7 \text{ V}$, $E_\lambda = +0,7 \text{ V}$, $E_f = -0,7 \text{ V}$. Os voltamogramas representados correspondem à terceira varredura para cada valor de concentração.....75

Figura 23. (A) Solução de $\text{Cu}(\text{SO}_4)$ $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em tampão ácido acético/acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,7 (B) Solução de íons Cu^+ após adição de solução de lignina 1 g L^{-1} (DMF) e (C) Após adição de $\text{KI}_{(s)}$ seguido da adição de algumas gotas de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ para eliminar o excesso de I_276

Figura 24. Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,0 com: (-■-) EPC; (-○-) EPC-LIGs e (-Δ-) EPC-LIGs-Au. Inseto: Voltamograma cíclico obtido com EAU em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,0; $E_i = -0,1 \text{ V}$, $E_\lambda = 1,2 \text{ V}$, $E_f = -0,1 \text{ V}$. Condições Experimentais: Eletrólito Suporte, KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$, $E_i = -0,1 \text{ V}$, $E_\lambda = 1,4 \text{ V}$, $E_f = -0,1 \text{ V}$. Os voltamogramas ilustrados correspondem a 1ª varredura. EPC = Eletrodo de pasta de carbono e EPC-LIG = Eletrodo de Pasta de Carbono preparado com grafite contendo apenas lignina adsorvida.....77

Figura 25. Voltamogramas cíclicos obtidos com EPC-LIGs-Au em solução de (-■-) KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,0 e (-○-) tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,0. Inseto: Voltamograma cíclico obtido com Eletrodo de Au limpo em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,0. Condições Experimentais: $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$, $E_i = -0,1 \text{ V}$, $E_\lambda = 1,4 \text{ V}$, $E_f = -0,1 \text{ V}$. Os voltamogramas ilustrados correspondem a 1ª varredura.....78

Figura 26. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão do compósito 2 (A e C) e do compósito 3 (B e D) em ordem decrescente de magnificação. O diâmetro de partícula formada está por volta de 100 nm. A tabela 4 mostra os tipos de compósitos preparados (seção III.4, pag)79

Figura 27. Voltamogramas cíclicos obtidos com EPC-LIGs-Au nas condições apresentadas.....81

Figura 28. Voltamogramas cíclicos obtidos com EPCM-2b (1), LIGs-oxi-EPC* (2) e AuNp-EPC (3) em solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,0 contendo $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Condições experimentais: $E_i = -0,2 \text{ V}$, $E_\lambda = +0,7 \text{ V}$, $E_f = -0,2 \text{ V}$ e $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$. *LIGs-oxi-EPC: 12,5 mg de lignina oxidada; 500 mg de grafite e 250 mg de óleo mineral.....84

Figura 29. Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,0, contendo $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ DA com EPCM-2b (1) e com EPC (2). Condições experimentais: $E_i = -0,2 \text{ V}$, $E_\lambda = +0,7 \text{ V}$, $E_f = -0,2 \text{ V}$ e $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$85

Figura 30. Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 6,0, contendo 1,0 mmol L⁻¹ AA com (1) ECPM-2b e com (2)EPC. Condições Experimentais: E_i = -0,2 V, E_λ = +0,7 V, E_f = -0,2 V e v = 20 mV s⁻¹.....86

Figura 31. Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de H₂SO₄,0,5 mol L⁻¹contendo 1,0 mmol L⁻¹ NO₂⁻ com (1) EPCM-2b e (2) EPC. Condições Experimentais: E_i = +0,7 V, E_λ = -0,1 V, E_f = +0,7 V e v = 20 mV s⁻¹.....87

Figura 32. Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de H₂SO₄,0,5 mol L⁻¹contendo 0,1 mmol L⁻¹ IO₃⁻ com (1) EPCM-2b e (2) EPC. Condições Experimentais: E_i = +0,7 V, E_λ = -0,1 V, E_f = +0,7 V e v = 20 mV s⁻¹.....88

Figura 33. Voltamogramas cíclicos obtidos com EPCM-2b em solução de H₂SO₄, 0,5 mol L⁻¹contendo 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 e 0,5 mmol L⁻¹ IO₃⁻. Condições Experimentais: E_i = +0,7 V, E_λ = -0,1 V, E_f = +0,7 V e v = 20 mV s⁻¹. Inseto: Curva analítica para iodato: I (μA) = -0,485 μA + 22,4 [IO₃⁻] (mmol L⁻¹); R = 0,992.....88

Figura 34. Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de GEM 100 μmol L⁻¹ em Tampão ácido acético/acetato 0,1 mol L⁻¹, pH 4,5. Os voltamogramas apresentados correspondem a primeira varredura de cada experimento.....90

Figura 35. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com eletrodo de carbono vítreo em tampão ácido acético/acetato 0,1 mol L⁻¹, pH 4,7 em solução 50,0 μmol L⁻¹ de (G) guanina, (dG) Guanosina, (A) Adenina, (dA) Adenosina e (T) Timina.....91

Figura 36. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com eletrodos de carbono vítreo modificados com DNA em tampão ácido acético/acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 4,5 para (linha preta) dsDNA sem danos oxidativos e (linha lilás) dsDNA com danos oxidativos.....92

Figura 37. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com eletrodos de carbono vítreo em solução tampão ácido acético/acetato 0,1 mol L⁻¹, pH 4,5, de 50 μg mL⁻¹: (—) dsDNA, (↗↗) poli-G, (•••) poli-A e (—) 50,0 μmol L⁻¹ de GEM : A) linha de base não corrigida e B) linha de base corrigida. Velocidade de varredura: 5 mV/s.....93

Figura 38. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com eletrodos de carbono vítreo com linha de base corrigida em solução de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$: A) poli-G e B) poli-A, em tampão ácido acético/acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 4,5$, (—) antes (controle) e depois incubação com $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ GEM durante (—) 0 h, (---) 2 h e (•••) 4 h.....94

Figura 39. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com eletrodos de carbono vítreo com linha de base corrigida em solução de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$: A) poli-G e B) poli-A, em solução tampão ácido acético/acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 4,5$, (—) antes (controle) e depois incubação com $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ GEM durante (—) 0 h, (---) 2 h e (•••) 4 h.....95

Figura 40. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com eletrodos de carbono vítreo com linha de base corrigida em solução tampão ácido acético/acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 4,5$, contendo $25,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ guanosina (—) antes e (---) após 4h de incubação com $25,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ citidina e (•••) após 4h de incubação com $25,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ GEM.....96

Figura 41 Espectros UV-Vis de: (—) $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA, (—) $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ GEM, e após incubação de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA e $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ GEM durante (—) 0 h e (•••) 24 h.....97

Figura 42. Voltamograma de pulso diferencial obtidos com eletrodos de carbono vítreo em tampão ácido acético/acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 4,5$: (—) sensor eletroquímico controle de dsDNA e; sensor eletroquímico de dsDNA após incubação com $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ GEM durante (—) 15 min, (---) 2 h e (•••) e 4 h.....99

Figura 43. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com eletrodos de carbono vítreo em tampão ácido acético/acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 4,5$: (A) Poli-G e (B) Poli-A (—) sensor eletroquímico controle; sensor eletroquímico após incubação com $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ GEM durante (—) 15 min, (---) 2 h e (•••) 4 h.....101

Figura 44. Voltamogramas cíclicos obtidos com obtidos com eletrodos de carbono vítreo em solução de $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de SSZ (A) solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ $\text{pH} 7,4$ a velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} (—) primeiro e (---) segundo ciclo, (B) em solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ $\text{pH} 8,0$ a diferentes velocidades de varredura.....104

Figura 45.(A) Voltamogramas de pulso diferencial em 3D com linha de base corrigida obtidos com eletrodos de carbono vítreo em solução de $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de SSZ para primeira varredura, (B) Gráfico de parâmetros do pico 1^a (■) $E_{p,a1}$ e (□) $I_{p,a1}$ em função do pH.....106

Figura 46.Voltamogramas de pulso diferencial obtidos obtidos com eletrodos de carbono vítreo com linha de base corrigida em solução de $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de SSZ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8,0; (- - -) primeira, (●●●) segunda e (—) terceira varredura.....108

Figura 47.(A) Voltamogramas de pulso diferencial em 3D com linha de base corrigida obtidos com eletrodos de carbono vítreo em solução de $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de SSZ para segunda varredura, (B) Gráfico de parâmetros do pico 2a (■) $E_{p,a2}$ e (□) $I_{p,a2}$ em função do pH.....109

Figura 48.Voltamogramas de onda quadrada obtidos obtidos com eletrodos de carbono vítreo em solução de $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ SSZ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8,0: (A) primeiro e (B) segunda varredura; correntes I_t - total, I_d - direta e I_r - reversa.....111

Figura 49.Espectros Uv-Vis de $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$: (A) (—) SSZ e (- - -) ácido salicílico em pH 7,4 e (B) SSZ em pH (linha vermelha) 3,4, (—) 7,0, (●●●●) 10,0, (- - -) 13,0.....113

Figura 50.Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com eletrodos de carbono vítreo com linha de base corrigida em solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0, para 10,0, 20,0, 25,0, 30,0, 40,0 e $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de SSZ. Inseto: Curva analítica.....115

Figura 51. Espectros UV-Vis de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ LFM: (A) vs. pH; (B) para valores de pH: (—) 10, (---) 11, (●●●) 12 e (---) 13.....117

Figura 52.Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodos de carbono vítreo em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 7,0 contendo $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ LFM a A) $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ (—) primeira e (---) segunda varredura e B) a diferentes velocidades de varredura.....119

Figura 53.(A) Voltamogramas de pulso diferencial em 3D com linha de base corrigida obtidos obtidos com eletrodos de carbono vítreo em $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ of LFM em diversos pH; e (B) Gráfico de (■) $E_{p,a1}$ e (□) I_p vs. pH.....122

Figura 54.Voltamogramas de pulso diferencial obtidos obtidos com eletrodos de carbono vítreo com linha de base corrigida em em solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4 contendo $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ LFM (—) primeira, (— — —) segunda e (●●●) terceira varredura.....123

Figura 55.Voltamogramas de onda quadrada obtidos obtidos com eletrodos de carbono vítreo em solução de tampão fosfato contendo $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ LFM; I_t – corrente total, I_d – corrente direta e I_r – corrente reversa.....124

Figura 56.Voltamogramas de pulso diferencial em (—) eletrólito suporte e (—) $75,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ LFM em: A) ácido sulfurico $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ pH = 2,0 com c-EDDB, e B) diferentes pH com a-EDDB.....126

Figura 57. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em (●●●) eletrólito suporte, (---) $75,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ LFM e (—) $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de α -TFAT em solução de de H_2SO_4 10 mmol L^{-1} , pH 2,0 com (A) ECV e (B) a-EDDB.....128

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações limítrofes totais de metais em um corpo d'água para potabilidade.....	9
Tabela 2. Reagentes utilizados.....	24
Tabela 3. Percentagens de elementos C, N, H, e S nas amostras de lignina.....	42
Tabela 4. Massa e percentagem dos componentes no compósito (expressa em função da massa de grafite em mg), e denominação do eletrodo de pasta de carbono modificado correspondente (EPCM).....	80
Tabela 5. Parâmetros eletroquímicos obtidos com eletrodos EPC-LIGs-Au e EPC-LIGs-oxi-Au como função da percentagem dos componentes presentes no compósito – Sonda eletroquímica: solução 5,0 mmol L ⁻¹ de [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH 6.0.....	82
Tabela 6. Parâmetros eletroquímicos obtidos com eletrodos e EPC-LIGs-oxi-Au como função da percentagem dos componentes presentes no compósito – Sonda eletroquímica: solução 5,0 mmol L ⁻¹ de [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH 6,0.....	83

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1. Fluxograma de precipitação de lignina com $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$	32
Fluxograma 2. Procedimento de preparo dos Eletrodos Quimicamente Modificados (EQM).....	35
Fluxograma 3. Esquema de oxidação da lignina.....	36

Sumário

1. Introdução	2
I.1 – Lignina: Propriedades químicas e aplicações.....	2
I.1.1. - Aplicações.....	8
- Lignina como adsorvente de metais.....	8
- Lignina como precursor na síntese de carvão ativado	11
- Lignina como precursor na síntese de bioóleos, resinas e plásticos.....	12
- Lignina como agente modificador de eletrodos no desenvolvimento de sensores eletroquímicos.	13
I.2 – Estrutura e Eletroquímica do DNA.....	14
Artrite reumatóide: características principais e tratamento	19
I.3 – Objetivos.....	22
II – Materiais e Métodos	23
II.1- Reagentes e Soluções	23
II.2 – Instrumentação	27
Precipitação das amostras de lignina	27
Análise Elementar	28
Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR)	28
Termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial.....	28
Microscopia óptica.....	29
Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	29
Caracterização eletroquímica	29
Espectroscopia UV-Visível	30
II.3 – Procedimentos Experimentais	30
II.3.1 – Eletrodos modificados com lignina.....	30

II.3.1.1 – Obtenção da lignina a partir do licor negro	30
- Procedimentos de precipitação da lignina com CO ₂ / H ₂ SO ₄	30
II.3.1.2 - Modificação superficial de eletrodos sólidos com filme de lignina	33
- Tratamento Superficial Prévio dos Eletrodos de CV, Au e Cu.	33
- Estudo sistemático das condições experimentais utilizadas nas modificações de eletrodos sólidos com filmes de lignina.....	34
II.3.1.3 - Procedimentos de síntese	36
- Procedimento para oxidação química da lignina	36
- Procedimento para incorporação de lignina e ouro em grafite.....	37
II.3.2 –Comportamento eletroquímico de fármacos	38
II.3.3. – Estudo de interação in-situ fármaco-DNA	39
- <i>Soluções Incubadas de GEM-DNA</i>	39
- Interação DNA-GEM sensor eletroquímico – Procedimento de preparo e incubação.	40
III - Resultados e Discussão.....	41
III.1 - Lignina e derivados de lignina obtidos a partir do Licor Negro	41
III.1.1– Caracterização da Lignina.....	41
III.1.1.1 - Análise Elementar	41
III.1.1.2 - Análise Espectroscópica	44
- Espectro na Região do Infravermelho.	44
III.1.1.3 - Análise Térmica.....	47
- TG/DTG	47
- DSC – Calorimetria Exploratória Diferencial	51
III.1.1.4 - Caracterização Eletroquímica.	52
- Mecanismo de Oxidação Eletroquímica de Lignina	53
- Resposta Eletroquímica a Complexos de Transferência de Carga.	62
III.1.2 – Utilização de lignina Alkali como agente modificador para desenvolvimento de sensores voltamétricos	68

III.1.3 - Avaliação do caráter redutor das soluções de lignina - Formação de nanopartículas.....	76
III.1.4 - Comportamento eletroquímico de eletrodos de pasta de carbono modificados com lignina e nanopartículas de ouro EPC-LIGs-Au.....	80
III.2. – Comportamento eletroquímico de fármacos em eletrodos de carbono vítreo e interação in-situ fármaco-DNA.....	89
III.2.3 –DNA e Gemcitabina	89
III.2.3.1 - Comportamento eletroquímico de GEM, bases nitrogenadas, nucleotídeos, ds-DNA, poli-A e poli-G.	89
III.2.3.2 – Avaliação da interação GEM-dsDNA em soluções incubadas.	94
III.2.3.3 – Avaliação da interação GEM-dsDNA usando Espectroscopia UV-Vis	97
III.2.3.4 - Sensor voltamétrico de dsDNA para avaliação <i>in situ</i> da interação GEM-dsDNA	98
III.2.1 – Comportamento eletroquímico da sulfasalazina em eletrodo de carbono vítreo	102
- Voltametria Cíclica	103
- Voltametria de Pulso Diferencial (VPD)	105
- Voltametria de Onda Quadrada	110
- Espectroscopia UV-Vis	112
- Determinação analítica de SSZ	113
- Mecanismo de Oxidação da SSZ	115
III.2.2 – Comportamento eletroquímico da leflunomida sobre eletrodo de carbono vítreo e eletrodo de diamante dopado com boro.....	115
– Espectroscopia Uv-Vis	115
- Voltametria Cíclica.....	117
- Voltametria de Pulso Diferencial.....	120
- Voltametria de Onda Quadrada	123

- Comportamento Eletroquímico de LFM em eletrodos de diamante dopados com boro (EDDB).....	124
- Mecanismo de oxidação eletroquímica da LFM.....	127
IV – Conclusões	129
Referências	134

1. Introdução

1.1 – Lignina: Propriedades químicas e aplicações.

O meio ambiente é, no atual contexto global, a maior fonte de preocupações de diversos ramos da sociedade, seja pela escassez de matérias prima ocasionada por séculos de exploração econômica desmedida, ou pelas condições biológicas adequadas para a manutenção da vida no planeta. A indústria talvez seja, nesse âmbito, considerada umas das principais atividades econômicas causadoras de impacto ambiental devido ao alto índice de efluentes e resíduos produzidos e à escala de magnitude dos mesmos.

A indústria de papel e celulose se insere nessas atividades utilizando-se de madeira para a obtenção de celulose. Desde a obtenção da madeira, até a obtenção da celulose em si e a confecção do papel, há a eliminação de diversos resíduos ao longo da cadeia produtiva. É claro que estas indústrias eliminam seus resíduos de acordo com a legislação ambiental recente, porém ao longo dos últimos anos, as legislações têm se enrijecido constantemente, o que obriga as indústrias a buscarem alternativas tecnológicas viáveis para tratamento dos efluentes produzidos.

Na industria da celulose, o processo de deslignificação, ou obtenção da celulose a partir da casca de madeira é aquele que produz a maior quantidade de efluentes. A madeira possui como constituintes principais celulose e lignina, sendo a última a responsável pela resistência mecânica da madeira. Um dos processos para separação da celulose da madeira e talvez o mais utilizado até hoje, é o processo Kraft, utilizado

por cerca de 93% das indústrias de celulose (PAPER TASK FORCE, 1995). Esse processo consiste em uma hidrólise alcalina da madeira, em que lascas demadeira são adicionadas a um reator contendo uma mistura de hidróxido de sódio e Sulfeto de sódio, em temperaturas de 130 a 180°C(SJOSTROM, 1993). A reação ocorre de acordo com o mecanismo(SJOSTROM, 1993) abaixo, Esquema 1.

Esquema 1: Mecanismo da reação principal do processo Kraft.

<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/9d/KraftEq.png>

Acessado em 25/12/2014

A posterior separação da celulose deixa como resíduo um líquido de aparência escura e altamente viscoso chamado de licor Kraft ou Licor Negro que contém um alto teor de ligninas solubilizadas, além de frações de ligninas hidrolisadas durante o processo de polpação da madeira (HON; SHIRAISHI, 2001; INDUSTRIAL EFFICIENCY TECHNOLOGY DATABASE). O caráter fortemente alcalino deste licor se deve à presença de grande quantidade de hidróxido de sódio e de íons sulfeto.

Boa parte das indústrias de papel já tem tecnologia para reutilizar o licor negro, concentrando-o em evaporadores e queimando-o para gerar energia para a própria indústria e, 50% de toda energia consumida em todas as etapas de fabricação do papel já é obtida à partir da queima do licor negro (INDUSTRIAL EFFICIENCY TECHNOLOGY

DATABASE) . Ainda sim, uma enorme quantidade de gás carbônico e compostos orgânicos voláteis nocivos é emitido durante a queima do licor Negro.

As ligninas são substâncias amorfas, de natureza aromática, extremamente complexas, contendo os álcoois p-cumarílico, coniferílico, e sinapílico (HON e SHIRAISHI, 1993) como componentes básicos da estrutura macromolecular. O Esquema 2 mostra as fórmulas estruturais destes três álcoois.

Esquema 2. Estruturas química dos álcoois dos componentes básicos da lignina.

No mundo, são produzidas anualmente mais de cinquenta mil toneladas de lignina provenientes do processo de polpação da madeira (MOHAN; PITTMAN JUNIOR; STEELE, 2006). A massa molar da lignina macromolecular pode variar de 2000 a 15000 g/mol (SARKANEN; LUDWIG, 1971; HAYASHI *et al*, 2000), e 90 a 95% da lignina considerada reativa (que sofreu hidrólise no processo de extração) acaba sendo solubilizada na forma de oligômeros contribuindo para a quantidade de carga poluidora no corpo d'água, Esquema 3

Esquema 3: Um Oligômero de Lignina

<http://en.wikipedia.org/wiki/File:LigninStructure.png>

Acessado em 10/12/2014

Por possuir uma estrutura tridimensional bem extensa e com um grande número de grupos fenoxil, hidroxil, metoxil, carboxil e aldólicos (KADLA *et al*, 2002; NADJI *et al*, 2009), a lignina pode ser considerada um material potencialmente útil como adsorvente de metais de transição em corpos aquáticos, seja pelo processo de adsorção física ou química.

Há na literatura diversos procedimentos de isolamento da lignina Kraft do licor negro, mas predominam os procedimentos de precipitação do material com borbulhamento de CO₂ (LISPERGER; PEREZ; URIZAR, 2009; GARCIA *et al*, 2009), adição de H₂SO₄ (BRODIN, 2009; TOLEDANO *et al*, 2010; GHATAK; KUNDU, KUMAR,

2010) ou HCl diluído (TEJADO *et al*, 2007; SUHAS; CARROT, 2007), embora diferentes metodologias de precipitação e a origem da madeira possam fornecer ligninas com propriedades químicas, como capacidade de adsorção, completamente distintas (SUHAS; CARROT, 2007). A caracterização do material obtido pela metodologia de precipitação é efetuada principalmente por métodos térmicos e espectroscópicos, mais comumente por termogravimetria e espectroscopia vibracional na região do infravermelho.

A espectroscopia vibracional na região do infravermelho permite identificar a presença de álcoois constituintes básicos da lignina e o tipo de ramificações e “crosslinking” estabelecidos, que modificam o perfil espectroscópico do material. Ligninas ricas em unidades guaiacil e com baixo teor de unidades siringuil e p-Hidroxil são características em madeiras moles e apresentam bandas em 1270, 1125, 855 and 810 cm^{-1} enquanto que madeiras mais duras e com teores maiores de unidades Siringuil apresentam bandas em 1326, 1115 and 825 cm^{-1} (BOERIU *et al*, 2004). As unidades siringuil permitem o estabelecimento de um maior número de ligações cruzadas (*crosslinking*), enrijecendo a estrutura da lignina e, por consequência, a da madeira (SHEN *et al*, 2013). Além disso, quando o processo de obtenção de celulose empregado é o processo Alkali, grupos carbonílicos conjugados e liberação de álcoois primários aromáticos decorrentes da clivagem são observados e identificados pela presença de bandas definidas na faixa entre 1600 e 1700 cm^{-1} . Em contrapartida, quando o processo de polpação aplicado é o processo Kraft, as estruturas β -O-4 e α -O-4 da lignina são rompidas o que aumenta a proporção de grupos carbonílicos não conjugados, caracterizados por uma larga banda em 1600 cm^{-1} (SHEN *et al*, 2013). Bandas comuns aos dois tipos de ligninas obtidos correspondem ao estiramento O-H presente em

3400cm⁻¹ e bandas de estiramento C-H alifático presentes em 2960, 2925, 2850 and 1460 cm⁻¹.

Os ensaios de termogravimetria dos derivados de lignina obtidos proporcionam informações importantes sobre a estabilidade térmica do material e auxiliam na compreensão nos processos de decomposição envolvidos. Na decomposição térmica da lignina extraída por meio do método organosolvente sob atmosfera inerte, ocorre um primeiro processo de perda de massa proeminente entre 200°C a 700°C fornecendo um resíduo final de 36.34% durante o estágio de perda de massa dominante (LIU *et al*, 2008), atingindo taxa máxima de perda de massa de 0.40%/°C a 360°C, enquanto que para lignina Kraft a taxa máxima foi atingida a 410°C (BENÍTEZ-GUERRERO *et al*, 2014; FERNANDES; HECHENLEITNER; PINEDA, 2006). Em atmosfera oxidante, há a ocorrência de um segundo processo de perda de massa correspondente à formação de CO, que ocorre antecipadamente (por volta de 620°C) devido a conversão do material carbonáceo pela presença de O₂ na composição da atmosfera (BREBU; TAMMINEM; SPIRIDON, 2013; ZHOU *et al*, 2013), fenômeno que se torna proporcionalmente mais pronunciado com o aumento do teor de O₂. A presença de CO₂ é justificada pela conversão do CO liberado em CO₂ após reação com O₂ da atmosfera (CAO *et al*, 2013; SANTOS *et al*, 2014; BURANOV; MAZZA, 2008). Há ainda a liberação de CH₄ em menores quantidades, mas todos os produtos de decomposição podem ser caracterizados por TG-MS/FTIR (BREBU; TAMMINEM; SPIRIDON, 2013). A origem da madeira e os processos de obtenção da celulose envolvidos se relacionam diretamente com as propriedades químicas e comportamento químico do material avaliado (SANTOS *et al*, 2014, BURANOV; MAZZA, 2008), tornando necessária sua caracterização. Os processos de decomposição térmica ocorrentes em lignina Kraft são bastante similares aos observados para a lignina obtida pelo método organosolvente e

as diferenças estruturais observadas pouco influem nos produtos de decomposição térmica formados.

As análises por difração de raios X comprovam a natureza amorfa da macromolécula de lignina seja qual for a origem da mesma, visto que ligninas obtidas do licro negro usando ácido sulfúrico ou clorídrico apresentaram apenas a presença de estruturas cristalinas dos respectivos sais de sódio formados, sulfato de sódio e cloreto de sódio (CAO *et al*, 2013).

1.1.1. - Aplicações

- Lignina como adsorvente de metais

Junto à atividade industrial, a atividade científica e de ensino são grandes fontes produtoras de resíduos tóxicos, altamente impactantes no bioma terrestre, em especial laboratórios de graduação e pesquisa. Efluentes contendo íons metálicos e inserem nesse aspecto como a mais comum fonte de poluição ambiental. O acúmulo desses metais ao longo da cadeia alimentar pode provocar os mais diferentes impactos e prejuízos à flora e fauna. Concentrações da ordem de $\mu\text{g/L}$, já são suficientes para causar danos ambientais muitas vezes irreversíveis. Chumbo, cádmio, cobre, ferro, manganês, zinco, níquel e tantos outros metais são frequentemente encontrados em quantidades acima das permitidas pela legislação ambiental. A tabela 1 mostra as concentrações limítrofes impostas pela Portaria 518 do Ministério da Saúde publicada em 2004 para diversos metais pesados (BRASIL, 2004)

Tabela 1: Concentrações limítrofes totais de metais em um corpo d'água para potabilidade.

Metal	Concentração do metal no efluente (µg/L)
Bário	0,7
Cádmio	5
Chumbo	10
Cobre	2000
Ferro	300
Mercúrio	1
Níquel	70
Zinco	5000

O método mais comum e mais viável de tratamento de efluentes desse tipo é a precipitação dos metais na forma de seus respectivos hidróxidos. Existem trabalhos na literatura descrevendo a utilização de lignina isolada por diversos procedimentos como adsorvente de íons metálicos nas mais diversas condições experimentais. A capacidade adsorvente de lignina de cada tipo de extração difere consideravelmente conforme o método de obtenção, o que dificulta uma padronização do método de obtenção e a utilização de um único modelo que explique os fenômenos químicos e o

mecanismo envolvido nos processos de adsorção. Suhas et al. (2007) levantaram dados sobre a capacidade adsorptiva de ligninas provenientes de diferentes métodos e estabeleceram tabelas de comparação.

Maior eficiência da lignina na remoção de metais bivalentes como Cu(II), Cd(II), Pb(II), Zn(II), Ca(II), Sr(II) foi observada. As capacidades para adsorção de Cu(II) encontradas variam e podem ser baixas, da ordem de algumas unidades de mg/g de lignina (MERDY *et al*, 2002; ACEMIOGLU *et al*, 2003; SCIBAN; KLASNJA, 2004) até centenas de mg/g de Cu(II) para ligninas funcionalizadas com grupos amino (DIZHBITE *et al*, 1999; SCIBAN; KLASNJA, 2011) e a lignina kraft (DEMIRBAS, 2004). As mesmas discrepâncias na capacidade de adsorção de Cu(II) foram encontradas para Cd(II) (DEMIRBAS, 2004; MOHAN; PITTMAN JUNIOR, STEELE, 2006), Cr(III) (HOJAJI, 2012; WU *et al*, 2008) e Pb(II) (MOHAN; PITTMAN JUNIOR, STEELE, 2006; HOJAJI, 2012). O mecanismo de adsorção proposto dos íons metálicos se baseia nas interações eletrostáticas do metal com os grupos carboxílicos do adsorvente que é coerente com o comportamento adsorptivo preferencial da lignina por íons bivalentes. Quando o comportamento adsorptivo foi avaliado como função do pH, observou-se uma maior eficiência de adsorção para meio com valores de pH acima de 4,0 (WU *et al*, 2008), valor coincidente com valores de pKa de ácidos carboxílicos insaturados e conjugados (CLAYDEN; GREAVES; WARREN, 2012). A formação de grupos carboxilatos com caráter duro, segundo a caracterização de duro ou mole de Pearson, faz com que os mesmos interajam preferencialmente com cátions com alta relação carga/raio, ou seja, também de caráter duro, Pb(II) e outros íons não bivalentes mas com caráter duro como Cr(III) (PEARSON, 1963).

- Lignina como precursor na síntese de carvão ativado

Suhas et al(2007) também estabeleceram comparações entre diferentes tipos de lignina como precursor na síntese de carvão ativado. A área ativa do material variou de acordo com o tipo de lignina e com o procedimento de ativação. As maiores áreas superficiais foram obtidas para ativações químicas e foram maiores que 1000 m²/g, em materiais ativados com H₃PO₄(GONZALES-SERRANO *et al*, 2004; FIERRO; TORNÉ-FERNANDEZ; CELZARD, 2006; HAYASHI *et al*, 2000), ZnCl₂, (HAYASHI *et al*, 2000; GONZALES-SERRANO *et al*, 1997) e KOH (HAYASHI *et al*, 2000; ZOU; HAN, 2001; GAO *et al*, 2013). Os tempos médios de ativação química para produção de carvão ativado são aproximadamente de 1 h com temperaturas oscilando entre 450°C a 800°C.

No que tange aos procedimentos de ativação física, as áreas obtidas para os materiais oscilaram entre 500 a 1500 m²/g de acordo com o tipo de lignina e procedimento de ativação aplicado. A combinação entre lignina Kraft e um procedimento de carbonização em atmosfera inerte (N₂) seguido de ativação do produto formado em atmosfera de CO₂ forneceu áreas de 1613 e 1853 m²/g a tempos de ativação de 40 e 20 horas, respectivamente(RODRIGUEZ-MIRASOL; CORDERO; RODRIGUEZ, 1993). Outros processos de ativação física como carbonização em atmosfera de N₂(BAKLANOVA *et al*, 2003), carbonização em N₂ com ativação em atmosfera inerte de Argônio e vapor d'água. (DONG *et al*, 2014), e carbonização na presença de N₂(BAKLANOVA *et al*, 2003) forneceram áreas abaixo de 1000 m²/g mostrando que, nestes casos, a ativação química é a metodologia mais indicada para obtenção de altas relações área/ por g de carvão ativado.

A porosidade do carvão ativado está diretamente relacionada ao tipo de ativação utilizado. Quando há ativação física, ocorre a predominância de microporos (RODRIGUEZ-MIRASOL; CORDERO; RODRIGUEZ, 1993), enquanto na ativação química em que se podem ser obtidos mesoporos e macroporos, de acordo com temperatura aplicada no procedimento de ativação. Gonzalez-Serrano et al. (2004) observaram que carvões ativados produzidos no intervalo de temperatura entre 350°C e 600°C mostraram valores limitrofes de dimensão de poro entre micro e mesoporo, e que tal comportamento também promove o aumento da área superficial. Os mesmos autores sugeriram ainda que o aumento da temperatura, bem como o aumento das relações de impregnação (maior quantidade do reagente de impregnação) levam ao alargamento da distribuição de tamanho de poros contribuindo para a obtenção de um material mesoporoso.

- Lignina como precursor na síntese de bioóleos, resinas e plásticos.

Nos últimos 10 anos, têm crescido o número de trabalhos a investigar a formação de bioóleo a partir da pirólise da lignina e a possível aplicação desse material composto majoritariamente de derivados de fenóis, 4-(metóxi)-ácido benzóico (LU *et al*, 2012; BAI *et al*, 2014) e derivados de unidade guaiacil (NAIK; ROZMAN; BHAT, 2013; NARAPAKDEESAKU; SRIDACH; WITTAYA, 2013; WAN *et al*, 2014; FU *et al*, 2014; KARAGOZ *et al*, 2005). Mohan, Pittman Junior e Steele (2006) descreveram possíveis aplicações do bioóleo como substituto do combustível fóssil em caldeiras industriais, dado seu menor poder calorífico em comparação aos combustíveis fósseis, ou na mistura ao diesel para uso em motores. Os procedimentos de obtenção de bioóleo a

partir da pirólise são realizados à baixa temperatura ($< 200^{\circ}\text{C}$) afim de se evitar a grafitização e carbonização do material e promover uma maior eficiência à liberação do bioóleo. As técnicas de caracterização do bioóleo incluem GC-MS(WAN *et al*, 2014; SCHOLZE; MEIER, 2001), RMN C^{13} (SCHOLZE; MEIER, 2001; GOOTY *et al*, 2014) FTIR (CHAUHAN *et al*, 2014; HILBURG *et al*, 2014) em que se caracterizam a fração volátil composta de água, ácido acético, acetona, e a fração mais densa ou viscosa chamada de “*tar*”que é constituída de fenóis e derivados fenólicos de maiores massas moleculares. Recentemente, procedimentos de pirólise de lignina a temperaturas mais altas, por volta de 450°C , permitiram a separação do bioóleo por volatilização e posterior condensação, já realizando uma separação prévia do material carbonizado.

A utilização de derivados de lignina no preparo de termoplásticos e resinas melhoram as características finais dos produtos obtidos. Blendas de lignina e poliuretanos mostraram uma maior temperatura de transição vítrea devido ao enovelamento e estabelecimento de ligações cruzadas (crosslinks) entre os componentes (KONG *et al*, 2014; SILVA *et al*, 2009). O mesmo tipo de comportamento foi observado quando a lignina foi componente de outras blendas poliméricas como PMMA(SASAKI *et al*, 2013) (poli metil metaacrilato) ou no preparo de resinas do tipo epoxi (CHENG *et al*, 2013; SUN *et al*, 2007; HUO *et al*, 2014).

- Lignina como agente modificador de eletrodos no desenvolvimento de sensores eletroquímicos.

Milczarek (2007) utilizou eletrodos modificados com lignina e lignosulfonatos caracterizando os processos eletroquímicos sob superfície de ouro para lignina Alkali.Os

grupos fenólicos da lignina foram oxidados envolvendo 1 próton e 1 elétron culminando na formação de radicais fenoxil, conforme mecanismo proposto por Enache e Oliveira-Brett (2011) para a oxidação de fenóis para-substituídos. Os autores demonstraram também a aplicabilidade de eletrodos modificados na redução eletrocatalítica de NO_2^- (MILCZAREK, 2008), e oxidação do co-fator enzimático NADH (MILCZAREK, 2009; MILCZAREK 2009). Lignosulfonatos, também, foram utilizados no preparo de eletrodos modificados com nanopartículas de níquel visando a oxidação eletrocatalítica de metanol (CISZEWSKI *et al*, 2014). No entanto, as propriedades e parâmetros relevantes de formação destes filmes como por exemplo, espessura, tempo de formação, metodologia de preparo e transdutor a ser empregado não foram sistematizados e não forneceram informações sobre como a relação entre as propriedades químicas do agente modificador e do transdutor influenciaram a resposta eletroquímica obtida pelos autores.

1.2 – Estrutura e Eletroquímica do DNA

O DNA é uma molécula biológica composta de quatro bases nitrogenadas; citosina e timina que são bases pirimidínicas oxidáveis a potenciais extremamente positivos, guanina e adenina que são bases purínicas oxidáveis a potenciais menos positivos. No DNA nativo, estas bases se encontram ligadas a uma pentose (açúcar de 5 carbonos) e íons fosfato recebendo então a denominação de nucleotídeo e formando uma estrutura de fitas com as bases ligadas em sequência (SAENGER, 1984; ALBERTS *et al*, 2002; BUTLER, 2005). As bases de uma fita de DNA interagem com as bases de uma outra fita de DNA complementar, a organização conformacional do DNA na forma

helicoidal (dsDNA), estabelecendo-se o pareamento entre as bases guaniana e citosina (G-C), e adenina e timina (A-T), Esquema 4.

Das 3 possíveis conformações do dsDNA, (A, B, Z), a conformação B é mais comumente encontrada em organismos, sendo possível observar também a conformação Z, em que ambas as conformações A e B dispõem a molécula de DNA na forma helicoidal estendida (WATSON; CRICK, 1953). A conformação preferencial do DNA depende diretamente do grau de hidratação, proporção de bases nitrogenadas, força iônica e presença de íons metálicos que possam se coordenar na estrutura e modificar sua conformação final (GHOSH; BANSAL, 2003; BASU *et al*, 1988).

Esquema 4. Estrutura química do dsDNA. http://en.wikipedia.org/wiki/DNA#mediaviewer/File:DNA_chemical_structure.svg
Acessado em: 24/09/2014

Palecek e Duskocil (1974) demonstraram que o DNA é uma molécula eletroquimicamente ativa sob eletrodos de mercúrio, com os resíduos de citidina e timidinas sendo reduzidos eletroquimicamente a potenciais muito negativo. Outro fator

determinante é o estado conformacional do DNA que, quando desnaturado, tem seus nucleotídeos mais disponíveis para serem reduzidos a potenciais menos negativos (BRABEC; PALECEK, 1976; WANG *et al*, 1998). Foi demonstrado ainda que estes resíduos também são oxidáveis em potenciais mais positivos que suas respectivas bases nitrogenadas (OLIVEIRA-BRETT *et al*, 2004; BRETT; OLIVEIRA-BRETT; SERRANO, 1994). Os nucleosídeos podem interagir com outras moléculas e/ou radiação sofrendo danos oxidativos, razão das principais mutações existentes no dsDNA (BRETT, 2006; PEDANO; RIVAS, 2004; OLIVEIRA-BRETT; DICULESCU; PIEDADE, 2002; DICULESCU, PAQUIM; BRETT, 2005; CHIORCEA-PAQUIM *et al*, 2002). Adenosina e Guanosina são os principais biomarcadores para se avaliar danos oxidativos ao dsDNA devido ao fato de possuírem produtos de oxidação que também são eletroativos (OLIVEIRA-BRETT *et al*, 2002; ABREU; GOULART; BRETT, 2002; OLIVEIRA; OLIVEIRA-BRETT, 2012).

A extensão da interação de um determinado agente danoso ao dsDNA pode ser avaliada monitorando-se a liberação de guanina ou adenina livre, evidenciada pela oxidação das mesmas sobre o eletrodo. Tanto guanina como adenina inexitem no dsDNA como bases nitrogenadas, indicando uma lesão de menor extensão dada pela clivagem da ligação entre ribose e base nitrogenada. Quando há o aparecimento de 8-oxoguanina e 2-8 dihidroxiadenina (BRETT; CHIORCEA, 2003; OLIVEIRA *et al*, 2009), produtos de oxidação de guanosina e adenosina, respectivamente, que também são oxidáveis, sugere-se a ocorrência de danos oxidativos ao dsDNA (OLIVEIRA-BRETT; DICULESCU, 2004). O aparecimento dos produtos de oxidação leva à diminuição das correntes de pico referentes aos dois nucleosídeos com o surgimento e aumento das correntes de pico de espécies como guanina e 8-oxoguanina (BRETT, 1996).

Espécies reativas de oxigênio como radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio são os principais responsáveis por danos ao dsDNA, embora, em algumas ocasiões, essa interação possa também se limitar à alteração conformacional do dsDNA, diminuindo as correntes de pico de oxidação da guanosina e adenosina (CHIORCEA; BRETT, 2004, BRETT; PAQUIM, 2005). Nestes casos, a diminuição das correntes é motivada pela menor disponibilidade dos nucleosídeos para serem oxidados na superfície eletródica devido a fenômenos de agregação (aglomeração de múltiplas moléculas de dsDNA) e/ou condensação (o dsDNA se enrola em sua própria estrutura) (PONTINHA *et al*, 2011; PONTINHA *et al*, 2011).

Geralmente, os polímeros de um único nucleosídeo como a poliguanosina e poliadenosina (Poli-G e Poli-A, respectivamente) são utilizadas com o intuito de estabelecer se há algum tipo de interação específica entre o agente danoso e um dos nucleosídeos (SATANA, OLIVEIRA-BRETT, 2011; SATANA *et al*, 2012). Eletrodos de carbono vítreo têm sido muito utilizados para se avaliar esse tipo de interação devido a sua inércia, reprodutibilidade e estabilidade do dsDNA e seus produtos de oxidação sob a superfície eletródica, tanto em medidas em solução quanto no preparo de eletrodos modificados com dsDNA. Justamente por esses motivos, para se garantir resultados reprodutíveis, a manutenção e limpeza do eletrodo de carbono vítreo é fundamental.

Gemcitabina (GEM), 2,2 difluorodeoxicitidina, Esquema 5, é um análogo de nucleosídeo de citidina aplicada no tratamento de tumores sólidos, atuando no tratamento de câncer da bexiga e da mama (GALMARINI; MACKEY; DUMONTET, 2002; CHARMICHAEL; WALLING, 1997), no câncer do pulmão de células não pequenas (protocolo GemCarbo) e como amenizador de efeitos colaterais no tratamento do câncer do pâncreas (SHELLEY *et al*, 2011; WALTER *et al*, 2013). GEM é transportada por proteínas transportadoras de nucleosídeos através da membrana para ser fosforilada e,

em seguida, competir com os análogos de citidina na síntese de DNA. Em seguida, GEM é incorporada no DNA inibindo sua síntese conduzindo a apoptose (WALTER *et al*, 2013). Uma segunda via de inibição da síntese de DNA é através da inibição da ribonucleotídeo reductase, bloqueando a síntese da nova cadeia. Além disso, a alta concentração de trifosfato de GEM também inibe a síntese de citidina tri-fosfato (CTP) e a enzima citidina mono fosfato desaminase (CMP-desaminase), mantendo CTP em baixas concentrações (WALTER *et al*, 2013).

Esquema5.(A) Estrutura química da Gemcitabina e (B) estrutura química da citidina

O comportamento eletroquímico e interação de derivados purínicos, como a clorafabina (SATANA *et al*, 2011), claribidina (PONTINHA *et al*, 2011) e fludarabina (SATANA, OLIVEIRA-BRETT, 2011) com DNA foram estudados, mostrando que estes fármacos promovem alterações conformacionais na estrutura do DNA, promovendo a agregação e condensação da macromolécula.

Artrite reumatóide: características principais e tratamento

A artrite reumatóide (AR) é uma doença autoimune provocadora de uma inflamação sistêmica e desordenada das juntas sinoviais, afetando muitos outros tipos de tecido e órgãos, em especial pulmões, pericárdio e esclera (MAJITHIA; GERACI, 2007; BOISSIER *et al*, 2012; LAWRENCE *et al*, 2008). Os dolorosos e incapacitantes efeitos da doença, em estágios mais avançados, podem levar a uma perda de mobilidade e funcionalidade, impedindo o ser humano de realizar suas atividades e permanecer economicamente ativo.

O tratamento mais comum da AR envolve a administração de anti-inflamatórios não estereoidais e drogas com efeito antireumáticos capazes de retardar o desenvolvimento e progressão da doença, permitindo a manutenção de um indivíduo economicamente ativo. Metotrexato é a primeira linha de tratamento uma vez feito o diagnóstico da AR e é administrado em concomitância com outras drogas em estágios mais avançados (LAWRENCE *et al*, 2008; DONAHUE *et al*, 2007).

Sulfasalazina, Ácido 2-hidroxi-5-[4-(2-piridilsulfamoi)fenildiazenil]benzoico (SSZ), Esquema 6, é um composto farmacológico pertencente a classe dos antiinflamatórios derivados de ácidos azo-salicílicos usada no tratamento da AR (LAWRENCE *et al*, 2008; DONAHUE *et al*, 2007). SSZ é também recomendada para outros tipos de processos inflamatórios decorrentes de outros tipos de artrite, como a artrite psoriática, e é administrada no tratamento da doença de Crohn e colite ulcerativa. SSZ tem baixa absorção sendo encontrada em sangue em níveis abaixo de 50 mgL⁻¹, níveis considerados seguros para se evitar efeitos colaterais. No que tange ao comportamento eletroquímico da SSZ, sabe-se que ela sofre redução eletroquímica

envolvendo 2 elétrons e 2 prótons sobre o grupo azo, com um etapa subsequente de clivagem da ligação N-N e liberação do ácido 5-aminosalicílico (5-ASA)(MANDIC; NIGOVIC; HMUNIC, 2007; ERIKSSON; NYHOLM, 1999; ERIKSSON; NYHOLM, 2001).

Esquema 6. Estrutura molecular da sulfasalazina.

Leflunomida [N-(4-trifluorometilfenil)-5-metilisoxazol-4-carboxamida] (LFM, esquema 7) é uma droga é uma “disease modifying antirheumatic drug” (DMARD), ou “medicamento anti-reumático modificador da doença” com atividade imunoreguladora aplicada ao tratamento da AR (GOLDENBERG, 1999) e artrite psoriática com função de reduzir os efeitos e sintomas destas doenças, visando retardar danos estruturais em juntas sinoviais e erosões nas articulações (BERTOLINI *et al*, 1997; ROZMAN, 2002).

Esquema 7. Estrutura química da leflunomida, metabólito ativo (A771726) e α - TFAT.

Desde sua aprovação pela FDA em 1998(UNITED STATES OF AMERICA. FEDERAL DRUG AGENCY – FDA, 1998), a LFM tem sido aplicada em estágios de desenvolvimento avançados da doença e alcançando bons resultados quando aplicada diretamente como primeira linha de tratamento, ou quando metotrexato já não possui mais efeito. O efeito imunomodulador e anti-inflamatório de LFM são observados após a rápida conversão para seu metabólito ativo, uma malononitrilamida A77 1726(WEINBLATT *et al*, 1999; SANOFI-AVENTIS CAMADA INC., 2012), esquema 7,

que atua inibindo a ação da dihidro-orotato desidrogenase, promovendo a captura de linfócitos autoimunes. Acerca do comportamento eletroquímico de LFM, não há muitas informações conhecidas na literatura, e portanto, os mecanismos eletroquímicos de LFM foram comparados ao α,α,α -trifluoro-p-acetotoluida (α TFAT), que possui estrutura semelhante a observada na LFM, com exceção do anel isoxazólico, Esquema 7.

1.3 – Objetivos

Considerando a relevância das moléculas de lignina e DNA no contexto global atual, o objetivo desta tese foi avaliar e explorar superfícies eletródicas modificadas com as mesmas no desenvolvimento de sensores voltamétricos, avaliando parâmetros experimentais relevantes para o preparo dos mesmos, o desenvolvimento de sensores eletroquímicos modificados com DNA visando subseqüente estudos de interação DNA-Gemcitabina e caracterização eletroquímica dos fármacos sulfasalazina e leflunomida.

II–Materiais e Métodos

Para maior detalhamento, esta seção será dividida em subseções.

II.1- Reagentes e Soluções

A tabela 2 informa os reagentes utilizados no preparo das soluções utilizadas nos procedimentos de extração, caracterização eletroquímica, e preparo dos eletrodos modificados com lignina extraída a partir do licor Kraft e os reagentes utilizados nos estudos de caracterização eletroquímica de fármacos e estudos de interação *in-situ* com DNA.

Tabela 2. Reagentes utilizados.

Nome	Procedência
Acetona	Merck
Ácido Sulfúrico-98%	Merck
Ácido desoxirubonucleico obtido de timo de bezerro.	Sigma-Aldrich
Ácido Tetracloroáurico (HAuCl ₄)	Sigma Aldrich
Ácido Clorídrico 37%	CRQ
Adenina	Sigma-Aldrich
Adenosina	Sigma-Aldrich
Citidina	Sigma-Aldrich
Citosina	Sigma-Aldrich
Cloreto de hexaminrutênio(III) (Ru(NH ₃) ₆ Cl ₃)	Sigma Aldrich
Cloreto de Potássio P.A.KCl	Merck
Dimetilformamida (DMF)	Carboerba
Etanol Absoluto	Synth
Fosfato de potássimonobásico, A.C.S (K ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich
Fosfato de sódio dibásico monohidratado, (NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O)	Merck
Guanina	Sigma-Aldrich
Guanosina	Sigma Aldrich

Hexacianoferrato(II) de potássio - Tridratado ($K_4Fe(CN)_6$)	Merck
Hidróxido de Amônio 25%	Merck
Hidróxido de Sódio pastilhas	Sigma-Aldrich
Leflunomida	Sigma-Aldrich
Lignina Alkali (Mw = 28000)	Sigma Aldrich
Membrana de Celulose Benzoílada de 32 mm.	Sigma-Aldrich
Perhidrol 30%	Merck
(Água Oxigenada)	
Sulfasalazina	Sigma-Aldrich
Sulfato de Amônio P.A. $(NH_4)_2SO_4$	Quimis
Sulfato de Cobre Pentahidratado $(CuSO_4 \cdot 5 H_2O)$	Merck
Timina	Sigma-Aldrich

Preparo das Soluções Utilizadas:

As soluções de dsDNA, nucleosídeos e bases nitrogenadas foram preparadas pela dissolução de quantidade apropriada do reagente com água deionizada de alta pureza ($18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) obtida pelo sistema de ultrapurificação de água Milli-Q (Millipore, Bedford, USA)

As demais soluções foram preparadas com água deionizada ($18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) obtida com sistema de osmose reversa OS10 LX (GEHAKA).

- **Solução estoque de lignina 1 g L^{-1} :** massa apropriada das respectivas amostras de lignina comercial e amostras de lignina precipitada foram pesadas e dissolvidas em volume apropriado de dimetilformamida (DMF), obtendo-se uma solução com concentração 1 g L^{-1} .

- **Solução estoque complexo $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4^{2+} 20 \text{ mmol L}^{-1}$:** massa apropriada de sulfato de cobre(II) penta hidratado para foi adicionada a um volume apropriado de solução de amônia 2 mol L^{-1} , obtendo-se solução final com concentração final de $\text{Cu}^{2+} 20 \text{ mmol L}^{-1}$ e que foi armazenada sob refrigeração.

- **Solução estoque de complexo $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-} 50 \text{ mmol L}^{-1}$:** massa apropriada de $\text{K}_4\text{FeCN}_6 \cdot 3 \text{ H}_2\text{O}$ foi pesada e solubilizada em solução de KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ para obtenção de solução com concentração final de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ de 50 mmol L^{-1} .

- **Solução estoque de $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+} 20 \text{ mmol L}^{-1}$:** massa apropriada de $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ foi pesada e solubilizada em solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \text{ mol L}^{-1}$ pH 8.1, com pH previamente ajustado com base, para obtenção de solução com concentração final de $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ de 20 mmol L^{-1} .

- A solução de **H₂O₂ 50 mmol L⁻¹** foi preparada por diluição de volume apropriado de solução estoque, **Merck, 30%**, em água. A solução de **HAuCl₄** foi preparada por dissolução de quantidade apropriada do sólido em **HNO₃ 1%**, de modo a obter uma concentração de **5,1 mmol L⁻¹ de HAuCl₄**.

Cloridrato de Gemcitabina - GEMZAR (GEM) foi obtido a partir de laboratórios Lilly LLC. Uma solução de estoque de 100 µmol L⁻¹ Gemcitabina livre foi preparada em água Milli-Q e armazenada a 5 ° C.

As soluções de diferentes concentrações de GEM foram preparadas pela diluição de volume apropriado de solução estoque em eletrólito de suporte. Solução de estoque de 187 µg mL⁻¹ de dsDNA, 504 µg mL⁻¹ de sal de poliguanosina (poli-G) e 521 µg mL⁻¹ de sal poliadenosina (poli-A) foram preparadas em água Mili-Q e armazenadas a 5 ° C. Soluções mais diluídas foram preparadas a partir da solução estoque por diluição em tampão ácido acético/acetato 0,1 mol L⁻¹, pH 4,5.

II.2 – Instrumentação

Precipitação das amostras de lignina

Para o monitoramento e medições de pH durante as etapas de precipitação das amostras de lignina em ambos os procedimentos, foi utilizado um **pH-metro** modelo 654 acoplado ao eletrodo de vidro 6.0203.100(OE), ambos da Metrohm. Para as etapas de centrifugação das ligninas sólidas precipitadas, utilizou-se uma Centrífuga Dupont Sorvall RC-5B com rotor GSA a 1000 rpm.

Análise Elementar

A análise elementar foi realizada pela central analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. C, H, N, S foram determinados pelo monitoramento da variação de condutividade térmica provocada pelas espécies CO_2 , H_2O e N_2 ao se aquecer amostra de lignina sólida até 925°C . Enxofre foi determinado pela coleta de SO_2 proveniente de uma combustão de 15mg de amostra de lignina em solução de H_2O_2 e posterior inserção em um espectrômetro Arcos ICP OES.

Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR)

A caracterização espectroscópica foi realizada utilizando-se um espectrômetro Bomem MB100 com resolução de 4 cm^{-1} em 64 “scans” na faixa espectral de $400 - 4000\text{ cm}^{-1}$. Uma amostra de lignina foi prensada a 7 toneladas de pressão com KBr seco originando uma pastilha de 13mm de diâmetro.

Termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial

As curvas termogravimétricas foram obtidas usando da termobalança modelo TGA-51 (Shimadzu), cadinho de porcelana contendo cerca de 100 mg de amostra, sob atmosfera dinâmica de ar (50 mL min^{-1}), razão de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$ e intervalo de temperatura de 25 a 900°C .

As curvas DSC foram obtidas em um calorímetro Shimadzu usando uma célula DSC-50 utilizando-se 2,0 mg de amostra em uma cápsula fechada de alumínio sob

atmosfera dinâmica de N₂ (50mL min⁻¹), razão de aquecimento de 10°C min⁻¹ e intervalo de temperatura de 25 a 500°C.

Microscopia óptica

As imagens de microscopia óptica foram registradas com um microscópio óptico Olympus com ampliação óptica máxima de 1000x e câmera digital Olympus SC-30. O software empregado na captura de imagens foi Olympus AnalySIS GHMB.

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Um microscópio eletrônico de transmissão (Cs 1.4 mm, resolução 0.25 nm) a 200 kV foi utilizado para a obtenção das imagens que foram registradas com uma câmera CCD (Gatan SC1000 ORIUS). As amostras foram dispersas em álcool isopropílico e introduzidas em um filme de carbono poroso em uma grade de Cu de 400 mesh.

Caracterização eletroquímica

Utilizou-se potenciostato PGStat 20 da EcoChemie (Autolab) com Módulos IME663 e ECD e software NOVA versão 1.6 com um sistema de três eletrodos: eletrodo de carbono vítreo – ECV (Trabalho) de diâmetro de 3mm, eletrodo de fio de platina (Auxiliar), eletrodo de referência de Ag/AgCl em meio de KCl_{sat} e cela de 20mL de volume. Para o estudo de interação in-situ entre fármaco-DNA, utilizou-se um potenciostato PGStat 10 da EcoChemie (Autolab) com interface usb e software GPES 4.9.007 e um sistema de três eletrodos: um eletrodo de carbono vítreo como eletrodo de

trabalho (diâmetro de 1 mm), um fio de platina como eletrodo auxiliar e um fio de Ag/AgCl em meio de $\text{KCl}_{(\text{sat})}$ como eletrodo de referência, imersos em cela de 3 mL de volume.

Espectroscopia UV-Visível

Os espectros de absorção foram registrados utilizando-se um UV-vis espectrofotômetro SPECORD S100 Tecnologia Carl Zeiss com Win-Aspect software. As condições experimentais foram: tempo de integração 25 ms e acumulação de 1000 pontos. Uma cubeta de quartzo de 1.0 mm de caminho óptico foi utilizada nas medidas.

II.3 – Procedimentos Experimentais

II.3.1 – Eletrodos modificados com lignina.

II.3.1.1 – Obtenção da lignina a partir do licor negro

- Procedimentos de precipitação da lignina com $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$

Nestes procedimentos, 0,5 L de licor negro resultante do processo Kraft foram diluídos a 2,0 L com água destilada, obtendo-se uma mistura resultante com pH 12,5. Borbulhou-se, então, CO_2 nesta solução, sob forte agitação, até que o pH resultante atingisse o valor de 9,0. Quando o reagente utilizado para precipitação da lignina foi o ácido sulfúrico 98%, o reagente foi adicionado de maneira lenta e sob agitação

vigorosa para que houvesse tempo necessário para que ocorresse a reação de neutralização. Em ambas as metodologias, o pH final alcançado foi 9,0.

A suspensão resultante foi centrifugada a 1000 rpm e a temperatura ambiente, com posterior descarte do sobrenadante. O material sólido, advindo da centrifugação, foi ressolubilizado por adição de NaOH 0,1 mol L⁻¹ até que o pH do meio chegasse a 12. A mistura obtida foi então filtrada, para eliminar possíveis resíduos de materiais celulósicos, e, posteriormente, a lignina foi precipitada por adição de H₂SO₄ 1,0 mol L⁻¹, sob forte agitação, até que o valor de pH alcançasse 7,0.

A nova suspensão obtida foi centrifugada a 5000 rpm à temperatura ambiente, o material sólido suspenso em água deionizada e submetido à diálise, também em água deionizada, empregando-se uma membrana de celulose benzoilada. A água do processo de diálise foi substituída de 6 em 6 horas, por 6 vezes. Ao material resultante da diálise, foram adicionados 50 mL de uma mistura de 9:1 v/v de etanol e acetona, deixando-o, posteriormente, para secagem em estufa a 80°C até completa evaporação do solvente. O fluxograma 1 mostra o processo acima descrito.

Fluxograma1: Fluxograma de precipitação de lignina com CO₂/H₂SO₄.

II.3.1.2 - Modificação superficial de eletrodos sólidos com filme de lignina

- Tratamento Superficial Prévio dos Eletrodos de CV, Au e Cu.

A superfície dos eletrodos foi polida com alumina de porosidades 1 e 0,3 μm , respectivamente e nessa ordem, em feltro metalográfico. Após lavagem com água deionizada, os eletrodos foram submetidos ao banho de ultrassom por 5 minutos em água deionizada / álcool 1:1 (v/v). Em seguida, os eletrodos foram secos e recobertos com solução de lignina 0,1 g L⁻¹, preparada em DMF, Esquema 2.

Para caracterização eletroquímica de filmes de lignina, eletrodos de carbono vítreo e ouro foram recobertos com 15 μL de solução 1 g L⁻¹ das amostras de lignina dissolvidas em Dimetilformamida (DMF), efetuando-se, posteriormente, a eliminação do solvente sob fluxo de ar quente. O Esquema 8 ilustra a metodologia empregada na modificação dos eletrodos.

Esquema 8. Procedimento de modificação de eletrodos sólidos com filmes lignina.

- Estudo sistemático das condições experimentais utilizadas nas modificações de eletrodos sólidos com filmes de lignina.

Condições experimentais como tempo de secagem, temperatura na qual solvente foi eliminado, substrato eletródico, estado de oxidação da lignina foram avaliados em eletrólito suporte, usando como sonda eletroquímica $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, NO_2^- e H_2O_2 , Fluxograma 2. O objetivo foi obter as melhores condições de preparo de sensores voltamétricos visando a determinação das espécies supracitadas.

Fluxograma 2. Prodecimento de preparo dos Eletrodos Quimicamente Modificados (EQM)

II.3.1.3 - Procedimentos de síntese

- Procedimento para oxidação química da lignina

O procedimento aqui descrito para oxidação da lignina extraída do licor negro é um procedimento adaptado de metodologias de oxidação já descritas na literatura (XIANG; LEE, 2000; MAZIERO *et al*, 2012; MANCERA *et al*, 2010). A massa de 100 mg de lignina foi solubilizada em 50 mL de solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ contendo Peróxido de Hidrogênio 3%, como proporção final.

A mistura foi aquecida a 60°C sob agitação durante 2 horas. Em seguida, adicionou-se ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹ até precipitação do material. A suspensão foi centrifugada a 700 rpm descartando-se o sobrenadante. O material resultante foi lavado com água deionizada e posteriormente seco em estufa a temperatura de 60°C, conforme fluxograma 3.

Fluxograma 3: Esquema de oxidação da lignina

- Procedimento para incorporação de lignina e ouro em grafite

O procedimento descrito foi adaptado de um procedimento de síntese de nanopartículas de ouro a partir de hidroxifenóis, com adição de NaOH (SIRAJUDDIN *et al*, 2010; KIM; KANG; KANG, 2008; LEE; PARK, 2011). A massa de 25,0 mg de lignina Kraft extraída do licor negro (por precipitação com ácido sulfúrico) foi misturada com 500 mg de grafite, relação ($m_{LIG}/m_{grafite}$) de 5%. A esta mistura, adicionaram-se 20 mL de dimetilformamida (DMF), seguida de homogeneização e roto-evaporação sob vácuo até a eliminação do solvente. O material resultante foi grafite contendo com lignina adsorvida, que foi suspenso em 10,0 mL de uma solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ HCl contendo $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de HAuCl_4 . Em seguida, 5,0 mL de solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ foram adicionados sob vigorosa agitação durante 15 minutos. Efetuou-se, então, a filtração sob pressão reduzida e lavagem do material sólido com água deionizada eo mesmo foi seco em estufa à 60°C durante 12h.

Em um primeiro momento, as massas de lignina e grafite foram medidas de maneira a se estabelecer as seguintes relações de massa m_{Lig} / m_{graf} : 1%, 2.5% e 5% para LIG e Ligoxi fixando-se a relação de $m_{Au} / m_{graf+lig}$ em 0.1%. Em sequencia, variou-se a relação $m_{Au} / m_{graf+lig}$ nas proporções 0.1, 0.2, 0.4 e 0.8%, fixando-se a massa de lignina impregnada na melhor condição anteriormente encontrada.

II.3.2 –Comportamento eletroquímico de fármacos

A superfície do eletrodo de carbono vítreo foi polida com suspensão de diamante de granulometria 1 e 0,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente e nessa ordem, em feltro metalográfico. Um sistema de três eletrodos foi utilizado com um eletrodo de carbono vítreo (com diâmetro de 1 mm) como eletrodo de trabalho, um fio de platina como eletrodo auxiliar e um eletrodo Ag/AgCl em meio de $\text{KCl}_{(\text{sat})}$ como eletrodo de referencia, imersos em cela de 3 mL de volume.

O eletrodo de diamante dopado com boro (BDDE) foi previamente lavado com etanol e água Milli-Q e submetido a uma limpeza eletroquímica em 1,0 mol $\text{L}^{-1} \text{HNO}_3$ a qual consistiu na realização de voltamogramas cíclicos no intervalo de potencial entre $E_1 = -2,5 \text{ V}$ e $E_2 = +3,0 \text{ V}$ até se obter um voltamograma estável, 15–20 voltamogramas cíclicos a uma velocidade de varredura de 150 mV s^{-1} foram necessários.

Após essa etapa de limpeza, o eletrodo foi tratado conforme duas condições:

- Procedimento 1 (pré-tratamento catódico): 20 voltamogramas cíclicos foram registrados entre $E_1 = 0$ e $E_2 = -2,5 \text{ V}$, seguido de lavagem com água.

- Procedimento 2 (pré-tratamento anódico): 20 voltamogramas cíclicos foram registrados entre $E_1 = 0$ e $E_2 = +3,0 \text{ V}$, seguido de lavagem com água.

II.3.3.–Estudo de interação in-situ fármaco-DNA

A superfície do eletrodo de carbono vítreo foi previamente polida com suspensão de diamante de granulometria 1 e 0,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente e nessa ordem, em feltro metalográfico. Um sistema de três eletrodos de acordo com descrito no item II.3.2 foi utilizado.

- Soluções Incubadas de GEM-DNA

As soluções GEM-dsDNA, GEM-poli-G e GEM-poli-A foram preparadas por incubação de 50,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA em tampão ácido acético/acetato 0,1 mol L^{-1} pH 4,5 com 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ GEM, durante diferentes períodos de tempo. Visando explicar o mecanismo de interação entre DNA e o análogo de nucleosídeo, soluções contendo 25,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de GEM foram incubadas individualmente com 25,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de citidina, guanosina ou 25,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de adenosina nas mesmas condições experimentais previamente descritas. Duas soluções diferentes foram utilizadas como controle: i) soluções de dsDNA, poli-G, poli-A, citidina, guanosina e adenosina, individualmente preparadas, nas condições previamente descritas e armazenadas durante o mesmo período de tempo em condições semelhantes às soluções incubadas e ii) outras soluções controles, soluções distintas de 50,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ou 25,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de guanosina, incubadas durante 4h com 25,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ citidina.

– Interação DNA-GEM sensor eletroquímico – Procedimento de preparo e incubação.

O eletrodo modificado com dsDNA de múltiplas camadas foi preparado depositando-se, sucessivamente, três gotas de 5 μL de solução de dsDNA $50,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Após a deposição de cada gota, o eletrodo foi seco sob um fluxo constante de ar atmosférico. Eletrodos modificados com poli-G e poli-A foram preparados a partir de soluções individuais contendo $50,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada espécie, utilizando-se o mesmo procedimento utilizado previamente para a preparação do eletrodo modificado com DNA. O eletrodo modificado com dsDNA, Poli-A ou Poli-G foi incubado em solução de GEM $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e lavados posteriormente com água Mili-Q para remover moléculas de GEM não ligadas ao ds-DNA, Poli-A ou Poli-G. Após lavagem, os eletrodos modificados foram transferidos para a solução de eletrólito suporte em que voltamogramas de pulso diferencial foram registrados. Após cada medida, o filme DNA foi removido da superfície do eletrodo por meio de polimento mecânico e um eletrodo modificado com ds-DNA foi preparado para o seguinte período de incubação. Eletrodos controle modificados com dsDNA, Poli-A ou Poli-G realizados foram preparados e incubados durante os mesmos períodos dos eletrodos supracitados, porém em soluções individuais de eletrólito suporte ou $25,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de citidina.

III - Resultados e Discussão.

III.1 - Lignina e derivados de lignina obtidos a partir do Licor Negro

Os procedimentos empregados na extração de lignina a partir do licor Kraft geraram cerca de 10g de lignina sólida, de cor marrom escura. Estabeleceu-se pH 9,0 para a primeira precipitação porque se desejava obter a fração de lignina com maior peso molecular, ou seja, menos hidrolisada. Essa fração possui uma grande quantidade de grupos funcionais livres que permitem uma maior capacidade de adsorção química. Em valores menores de pH, as frações moleculares obtidas teriam pesos moleculares maiores, já que para solubilização completa dessas frações, outros grupos funcionais com caráter mais ácido teriam que ser protonados, como por exemplo, carboxilatos e sulfonatos.

III.1.1– Caracterização da Lignina

III.1.1.1 - Análise Elementar

A Tabela 3 revela uma semelhança notável no que se diz respeito à porcentagem de cada elemento nas amostras. Observou-se uma matriz predominantemente carbônica, com o oxigênio sendo o segundo elemento mais abundante (porcentagem calculada); porcentagem pequena de enxofre e porcentagem pouco significativa de nitrogênio. As diferenças entre as amostras começam com a porcentagem de carbono

entre a amostra LIGs e as ligninas extraídas. A lignina comercial contém cerca de 4% a mais de carbono se comparada às ligninas extraídas, sugerindo uma estrutura menos funcionalizada composta de monômeros p-cumaril e coniferil (guaiaecil) menos oxigenados e com menor capacidade de estabelecer ligações β -O-4 cruzadas.

Tabela 3. Porcentagens dos elementos C, N, H e S nas amostras de lignina.

<i>Amostra de Lignina</i>	%C	*%N	%H	%S
LIG _s	61,22	1,18	5,80	1,45
LIG _{CO2}	57,65	0,48	5,57	2,30
LIG _{H2SO4}	57,63	0,37	5,83	1,45

*As percentagens de nitrogênio não foram consideradas significativas devido à ausência do átomo de N na estrutura polimérica original e ausência de utilização de reagentes nitrogenados durante o processo de purificação.

As ligninas extraídas apresentaram cerca de 4% a mais de oxigênio em relação à LIGs, indicando que a composição monomérica das ligninas extraídas baseia-se principalmente em estruturas coniferílicas e sinapílicas (Siringuil), sugerindo uma estrutura mais funcionalizada com grupos hidroxila alcoólicos e fenólicos. Observa-se também uma pequena percentagem de enxofre presente na LIGs sugerindo a utilização do processo Kraft na obtenção deste material, visto que a estrutura *in natura* não apresenta grupos sulfurados.

O esquema 9 ilustra as reações principais que ocorrem durante o processo Kraft, cuja primeira etapa envolve a formação de um intermediário quinônico. Durante o processo de polpação Kraft, o intermediário 2 é atacado por íons sulfeto (nucleófilos) originando um intermediário tioepóxido, estrutura 4. A eliminação dos íons sulfeto pode

ser promovida pelo aquecimento usado durante o processo de polpação. Apesar disso, observa-se uma percentagem residual de enxofre na estrutura, o que indica a manutenção dos grupos tióis resultantes da abertura do anel tioepóxido, estrutura 5.

Esquema 9. Principais Reações do processo Kraft envolvendo ligações β -aril-éteres. $R=H$, alquil ou aril. (Adaptado de SJÖSTRÖM, 1993)

Quando se comparam as metodologias de precipitação, nota-se uma grande semelhança entre as amostras, especialmente nos teores de carbono. No material obtido com ácido sulfúrico, o teor de enxofre diminuiu de aproximadamente 1%, o que sugere que o ácido sulfúrico empregado na primeira etapa de precipitação promove uma

alteração estrutural que diminui a contribuição do átomo de enxofre calculo da massa relativa do átimo na macromolécula. Outra etapa que deve ser considerada é a demetoxilação, catalisada pela adição de íons sulfeto com posterior liberação de mercaptanas, Esquema 10.

Esquema 10. Mecanismo de saída de grupos metoxil da lignina e formação de grupos fenóis

III.1.1.2 -Análise Espectroscópica

- Espectro na Região do Infravermelho.

Ao se interpretar o Espectro na região do infravermelho das amostras de lignina, Figura 1, observa-se uma banda de intensidade fraca em 1102 cm^{-1} característica de éteres aromáticos, estrutura presente nos álcoois coniferílico e 5-hidroxiconiferílico. Há também uma banda larga e intensa entre 3700 e 3400 cm^{-1} que é característica do estiramento OH. Considerando os monômeros que compõem a estrutura da lignina, este comportamento já era esperado devido à grande presença de grupos OH, tanto de álcoois como de fenóis ou, ainda, retenção de água fisiorida no material.

Em 1646 cm^{-1} e 1628 cm^{-1} , observa-se um pico de alta intensidade característico do estiramento C=O carbonílico conjugado e não conjugado, fornecendo um forte indicativo da presença de grupos quinona. Como os monômeros da lignina podem se

ligar de maneira diversificada, originando anéis com substituintes em número e posições diferentes, fica difícil precisar, através do espectro na região do infravermelho, o grau de substituição e a posição dos substituintes dos anéis aromáticos na estrutura da lignina. Os picos dispostos em 2935 e 2841 cm^{-1} indicam a presença de estiramentos da ligação C-H em carbonos saturados enquanto os picos dispostos em 1607, 1517 e 1423 cm^{-1} correspondem aos estiramentos C-H aromáticos, além do mesmo fenômeno vibracional, estiramento C-H observado para CH_2 e também para CH_3 em 1461 cm^{-1} , este último em menor intensidade.

Figura 1. Espectro vibracional das amostras de lignina (I) Espectro total (II) Faixa espectral de 1900 - 400 cm^{-1}

A diferenciação entre as amostras se dá pelo aparecimento de um pico na região de 1270 cm^{-1} na amostra LIGs (comercial Sigma Aldrich), característico do grupo guaiacil, unidade com predominância do monômero de álcool coniferílico, enquanto as ligninas extraídas apresentaram um pico em 1328 cm^{-1} correspondente à unidade siringuil constituída, predominantemente, de monômero álcool sinapílico. A presença das unidades siringuil indica uma maior capacidade do material em estabelecer as ligações β -O-4 cruzadas oxigenadas, aumentando a rigidez estrutural diferenciando madeiras moles de madeiras duras. Quanto maior a razão siringuil/guaiacil, maior a dureza da madeira.

Ao se comparar os espectros totais sobrepostos das ligninas extraídas, Figura 2, nota-se uma maior intensidade da banda correspondente ao estiramento O-H na amostra $\text{LIG}_{\text{H}_2\text{SO}_4}$, quando comparada à amostra LIG_{CO_2} , sugerindo uma maior quantidade de grupos hidroxila presentes no material sejam eles aromáticos (fenóis) ou alifáticos (álcoois). Uma possível explicação para esse fenômeno surge pela hidrólise de éteres aromáticos promovida pela adição de $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{conc})}$, ainda considerando a possibilidade de uma maior quantidade de água fisiosorvida para lignina extraída na amostra de $\text{LIG}_{\text{H}_2\text{SO}_4}$ em relação a LIG_{CO_2} e LIGs

Figura 2: Espectros Vibracionais de amostra de LIG_{CO2} (—) e LIG_{H2SO4} (—)

III.1.1.3 -Análise Térmica

- TG/DTG

As curvas termogravimétricas obtidas em atmosfera inerte ou em atmosfera de ar apresentaram diferenças visíveis. A amostra LIG_{H2SO4} apresentou 5 eventos de perda de massa mais definidos em relação à amostra de LIG_{CO2} que apresentou 3 eventos de decomposição térmica. Este fato, que pode ser explicado pelo maior grau de fragmentação da amostra LIG_{H2SO4}, resultou numa maior quantidade de grupos hidroxila na estrutura final do material, o que produziu uma lignina com várias frações de diferentes pesos moleculares e comportamento térmico distintos. A hidrólise de éteres aromáticos promovida pela adição de H₂SO_{4(conc)} pode ter fragmentado a estrutura da lignina Kraft liberando mais grupos OH, o que está em concordância com os resultados obtidos com a espectroscopia na região do infravermelho. Houve, ainda, uma massa residual de 8% que pode ser atribuída a resíduos inorgânicos ainda presentes na lignina,

Figura 3. Alguns íons como sódio poderiam ter ficado fortemente adsorvidos ao material devido aos fenômenos de adsorção química, a atmosfera de ar além de promover a combustão da matéria orgânica pode originar a formação de óxidos.

Quando se comparam as duas amostras de lignina Kraft (LIG_{CO_2} e $LIG_{H_2SO_4}$) com a amostra de lignina alkali (LIG_s), é notável que a decomposição térmica da LIG_s acontece praticamente em etapa única e em temperatura superior ($LIG_s T_{pico} = 390\text{ }^{\circ}C$) em relação às amostras de LIG_{CO_2} ($T_{pico} = 310\text{ }^{\circ}C$) e $LIG_{H_2SO_4}$ ($T_{pico} = 290\text{ }^{\circ}C$). Ainda, as amostras de LIG_{CO_2} e $LIG_{H_2SO_4}$ possuem, respectivamente 3 (LIG_{CO_2}) e 5 ($LIG_{H_2SO_4}$) eventos de decomposição térmica, fato este que sugere que estas amostras possuem composições mais heterogêneas do que a lignina padrão. Observa-se também que os resíduos inorgânicos para as amostras de LIG_{CO_2} e $LIG_{H_2SO_4}$ são maiores do que os observados para LIG_s , indicando que a etapa de diálise aplicada para a remoção da fração inorgânica do material não foi eficiente.

Figura 3. Curvas TG/DTG para amostras (A) LIG_s, (B) LIG_{CO2} e (C) LIG_{H2SO4} em atmosfera de ar

Outro aspecto relevante é a diferença da quantidade de massa de água existente entre as ligninas obtidas pelos dois métodos, ilustrada no primeiro evento de decomposição térmica das curvas termogravimétricas de todas as amostras, Figura 4. Esse evento pode ser caracterizado como perda de água fisiosorvida devido à idêntica e baixa temperatura em que se inicia a primeira perda de massa (T_{onset}) para todas as amostras, cerca de 45°C. Essa maior porcentagem de água presente na amostra de lignina precipitada com ácido sulfurico contribui também para a maior intensidade de absorção do estiramento OH observada na espectroscopia na região do infravermelho.

Figura 4. Curvas TG/DTG para amostras (A) LIG_s, (B) LIG_{CO2} e (C) LIG_{H2SO4} em atmosfera de N₂.

A LIG_{H2SO4} (Figura 4) contém cerca de 10% em massa a mais de água em relação às outras amostras de lignina. Esse fenômeno pode ser explicado pelas diferentes interações intermoleculares existentes entre os dois tipos de lignina. Por ser mais hidrolisada, a lignina extraída por precipitação com H₂SO₄ possui mais grupamentos hidroxila, fenólicos ou alcoólicos, disponíveis para formar pontes de hidrogênio com a molécula de água. Dessa forma, há uma quantidade muito maior de água retida em sua estrutura tridimensional, acarretando uma percentagem maior em massa de água.

Outro fato a ser ressaltado é a diferença de massa residual existente ao final da análise em atmosfera inerte. Para as amostras de LIG_s e LIG_{CO2} houve, respectivamente, uma massa residual de 39 e 35% da massa original, figura 4. Já para

as amostras de LIG_{CO_2} e $LIGs$, esse comportamento indica que a massa ao final da análise contém carbono em sua composição.

- DSC – Calorimetria Exploratória Diferencial

As curvas de DSC das amostras de lignina obtidas a partir do licor Kraft mostram dois perfis de curva bem semelhantes. Percebe-se um evento endotérmico no intervalo de temperatura entre 25 e 140°C ($T_{pico} = 54,4^{\circ}C$; $\Delta H = -165$ J/g para a amostra obtida com CO_2 e $T_{pico} = 46,8^{\circ}C$; $\Delta H = -221$ J/g para a amostra obtida com H_2SO_4), Figura 5. Esse primeiro evento de decomposição térmica corresponde à perda de água.

A diferença observada nos valores de ΔH pode ser explicada pela diferença de interações intermoleculares existentes entre os dois tipos de lignina e a água. Por ser mais hidrolisada, a lignina obtida por precipitação H_2SO_4 possui maior número de grupos funcionais OH, aptos a estabelecerem um maior número de pontes de hidrogênio com a água, e, como consequência, necessita-se assim uma quantidade maior de energia para o rompimento dessas ligações. No caso da lignina precipitada com CO_2 , a estrutura menos hidrolisada disponibiliza menos grupos OH para estabelecimento de ligações de hidrogênio. Além disso, as interações intermoleculares predominantes entre a água e a lignina proveniente da precipitação com o CO_2 são do tipo dipolo/dipolo-induzido, devido à predominância da estrutura carbônica.

A predominância de um maior esqueleto carbônico se reflete também no segundo processo (exotérmico) de decomposição térmica da lignina que se inicia em cerca de 290°C e é atribuído a uma degradação estrutural do material. A partir dos valores de ΔH obtidos para ambos os tipos de material, infere-se que a lignina proveniente do

procedimento de precipitação com CO_2 é termicamente menos estável se comparada à obtida com a adição de H_2SO_4 , devido à maior liberação de energia ao se atingir a etapa de decomposição exotérmica.

Figura 5. Curvas DSC de lignina obtida por precipitação com CO_2 e H_2SO_4

III.1.1.4 - Caracterização Eletroquímica.

No primeiro voltamograma cíclico observou-se um processo de oxidação mal definido a 0,4 V, com a intensidade das correntes de picos diminuindo ao longo dos ciclos. Simultaneamente, observou-se um processo catódico, com baixa intensidade de corrente, a aproximadamente + 0,1 V. Já no segundo voltamograma cíclico observou-se um processo anódico em + 0,263V de mesma intensidade do processo catódico observado na varredura anterior. Estes picos parecem estar associados a um processo redox com certo grau de reversibilidade, Figura 8.

Figura 6. Voltamogramas cíclicos obtidos com ECV-LIG_s em eletrólito suporte. Condições experimentais: tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 6,5. $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$; $-0,2 \text{ V} \leq E_{\text{apl}} \leq 0,6 \text{ V}$. Ciclos: 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 de um total de 30 voltamogramas

Estes dados conduziram à proposição de que o mecanismo de oxidação eletroquímica de lignina constitui-se de duas etapas, a primeira uma oxidação eletroquímica de fenóis, com uma subsequente etapa química de adição nucleofílica de água, conforme ilustra o Esquema 8. Após a etapa química há a formação de grupos quinona/hidroquinona (Q/HQ), responsáveis pelo aparecimento do par redox correspondente aos picos anódico (E_{pA}) e catódico (E_{pC}), observados em + 0,263 V e 0,100 V, respectivamente. O Mecanismo proposto é baseado em um mecanismo análogo de oxidação eletroquímica de fenóis *para*-substituídos (ENACHE, OLIVEIRA-BRETT, 2011).

Esquema 11. Mecanismo de Oxidação dos grupos funcionais da lignina

Um fato relevante, que corrobora o mecanismo proposto, é a ausência do par redox Q/HQ quando os voltamogramas cíclicos são obtidos em meio não aquoso, fato que reforça a necessidade da etapa química intermediária para a ocorrência da segunda etapa eletroquímica. A Figura 7 mostra por meio de imagens de microscopia óptica o aspecto físico do filme depositado sobre a superfície do eletrodo.

Figura 7.Imagens de microscopia Óptica do ECV-LIGs antes do tratamento em tampão fosfato (A,C) e após tratamento em tampão fosfato (B,D)

Após a estabilidade das correntes de pico correspondentes ao par Q/HQ e desaparecimento do primeiro processo de oxidação, o ECV-LIGSs se mostrou bastante estável com quase nenhuma variação dos níveis de corrente, Figura 8 e Esquema 12.

Figura 8. Voltamogramas cíclicos obtidos com ECV-LIG_s após estabilização das correntes de pico. Condições experimentais: Tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 6,5. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$; - 0,2 V $\leq E_{\text{apl}} \leq 0,6$ V. Ciclos: 1,3,5,10,15,20,25 e 30 de um total de 30 voltamogramas

Esquema 12. Mecanismo de oxidação eletroquímica do par Q/HQ presente após oxidação eletroquímica da lignina

O comportamento eletroquímico das três amostras de lignina é praticamente idêntico para as três amostras, Figura 9. Optou-se então por continuar a caracterização eletroquímica da macromolécula com a amostra LIGs, devido à maior homogeneidade da amostra possibilitando resultados mais reprodutíveis.

Figura 9. Voltamogramas cíclicos obtidos com o (—) ECV-LIGs, (— — —) ECV-LIGCO₂e (•••) ECV-LIGSH₂SO₄ em Tampão fosfato pH 6,5; 0,1 mol L⁻¹, após estabilização dos sinais. Condições experimentais: 3º ciclo de cada série de voltamogramas registrados com $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ e $-0,2 \text{ V} \leq E_{\text{ap}} \leq 0,7 \text{ V}$.

As intensidades das correntes de pico variaram linearmente com a velocidade de varredura indicando que o par redox observado possui características adsorptivas e não difusionais, Figura 10.

Figura 10.(A) Influência da velocidade de varredura nos voltamogramas cíclicos obtidos com o ECV-LIGs em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,5;. (B) Variação de I_p ($I_{p,A}$ e $I_{p,C}$) como função da velocidade de varredura de potencial, v . Condições experimentais: $0,2 \text{ V} \leq E_{apl} \leq 0,7 \text{ V}$ e 3º ciclo de cada série de voltamogramas obtidos com usando $v = 25, 50, 100, 225, 400, 625$ e 900 mV s^{-1}

O filme de lignina incorporado na superfície de ECV apresenta estabilidade em uma faixa de pH bastante ampla, de 2,0 a 8,0. Para valores de pH superiores a 8,0, as correntes de pico correspondentes ao par Q/HQ decrescem até o desaparecimento completo dos picos, que ocorre em pH 11, valor de pH coincidente com o valor de pKa de grupos fenólicos. Dessa forma, o filme de lignina não pode ser utilizado em soluções com pH 8,0 ou superiores porque é totalmente lixiviado da superfície do eletrodo em pH 11.

Outro parâmetro avaliado foi o intervalo de potencial no qual o eletrodo modificado é estável, ou seja, a delimitação dos potenciais limites, positivos e negativos, em que o ECV-LIGS se mantém estável. Inicialmente o eletrodo foi ciclado em solução tampão em ampla região de potencial negativo de trabalho ao se fazer uma primeira varredura com $0,1 \text{ V} \leq E_{apl} \leq -0,8; -0,9; -1,0; -1,1; -1,2; -1,5 \text{ V}$, com 3 ciclos para cada E_{lim} . Em seguida, para se avaliar os efeitos da primeira varredura com potencial limite “extremado” sobre os picos correspondentes ao par Q/HQ, efetuou-se uma nova varredura no intervalo de $-0,3 \text{ V} \leq E_{apl} \leq 0,7 \text{ V}$. A Figura 11 mostra que, mesmo submetido

a valores extremamente negativos de potencial, o o filme manteve-se estavel, sem qualquer alteração significativa sobre os potenciais de pico ($E_{p,a}$ e $E_{p,c}$) e sobre as correntes de pico ($I_{p,a}$ e $I_{p,c}$). Concluiu-se então, que o filme apresenta boa estabilidade em regiões negativas de potencial, característica que pode vir a ser explorada para identificação e quantificação metais.

Figura 11. (A) Voltamogramas cíclicos obtidos com ECV-LIG_s após a primeira varredura até E_{lim} (B) Gráfico de $E_{p,a}$, $E_{p,c}$ e ΔE_p em função do E_{lim} aplicado na varredura anterior (C) Gráfico de $I_{p,a}$ e $I_{p,c}$ em função do E_{lim} aplicado na varredura anterior. Condições experimentais: $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$; tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,5; Primeira Varredura: $0,1 \text{ V} \leq E_{ap} \leq -0,8$; $-0,9$; $-1,0$, $-1,1$; $-1,2$; $-1,5 \text{ V}$. Segunda Varredura: $-0,3 \text{ V} \leq E_{ap} \leq 0,7 \text{ V}$

O mesmo comportamento, no entanto, não é observado quando se avalia a estabilidade do filme em regiões mais positivas de potencial. O filme é gradualmente lixiviado da superfície do carbono vítreo gradativamente mediante ao aumento do potencial positivo aplicado. Na região positiva de potencial, observou-se um decréscimo nas correntes de pico correspondentes ao par Q/HQ, o que é característico da lixiviação do filme de lignina. O filme é estável somente até Eapl de + 0,7 V e, imagens de microscopia óptica confirmaram esta condição experimental, Figura 12.

Figura 12: Imagens de microscopia óptica do (A) ECV-Limpo; (B) ECV-LIG_s; (C) ECV-LIG_s após varreduras do eletrodo em potenciais acima de 0,8 V. Ampliação 20x

Vale ressaltar que para potenciais positivos mais próximos do potencial limite de estabilidade do filme, a lixiviação acontece ciclo após ciclo e nenhum processo de oxidação é observado para potenciais bem mais positivos, Figura 13.

Figura 13. Gráfico de I_p em função do E_{lim} . Corrente medida a partir do 5 ciclo. Condições experimentais: $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$; tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,5; $-0,3 \text{ V} \leq E_{apl} \leq 0,8; 0,9; 1,0; 1,1; 1,5 \text{ V}$

Os potenciais de pico E_{Pa} e E_{Pc} se deslocaram para potenciais menos positivos com o aumento do pH, demonstrando o envolvimento de prótons no processo, Figura 14. Como a inclinação dos gráficos E_{Pa} e E_{Pc} versus pH apresentam valores muito próximos ao coeficiente de Nernst, $0,0592 \text{ V / pH}$ a 25° , o número de prótons e elétrons envolvidos no processo eletroquímico deve ser o mesmo, corroborando assim o mecanismo proposto para formação de pares Q/HQ.

Figura 14. Variação de $E_{p,a}$ (●●●) e $E_{p,c}$ (■ ■ ■) como função pH do meio. Voltamogramas obtidos em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 3,0; 4,5; 6,5; 8,0; 10. ($E_{p,a} = 0,640 - 0,0569\text{pH}$ e $E_{p,c} = 0,470 - 0,0582\text{pH}$). Condições experimentais: $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$ e $0,3 \text{ V} \leq E_{apl} \leq 0,7 \text{ V}$

- Resposta Eletroquímica a Complexos de Transferência de Carga.

A resposta eletroquímica do ECV-LIGs para $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$ e $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+/+}$ foi bem distinta. Observou-se um bloqueio da resposta eletroquímica em solução de íons $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ em comparação ao ECV-Limpo, em que se observa o par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Este resultado conduziu à hipótese que a superfície modificada pudesse apresentar seletividade por exclusão de carga e então, o mesmo experimento foi realizado em solução contendo os complexos $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ e $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$.

O eletrodo modificado apresentou resposta eletroquímica na solução do complexo de rutênio II, mas não apresentou resposta na solução contendo o complexo de cobre, Figura 15.

Figura 15. Voltamogramas cíclicos obtidos com ECV-LIG_s contendo, separadamente, soluções de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ e $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$. Condições Experimentais: $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$; $-0,4 \text{ V} \leq E_{\text{apl}} \leq 0,6 \text{ V}$; $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8,2 e, $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$ em $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8,2 ajustado com NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$

Os resultados obtidos permitiram concluir que o efeito de exclusão de carga não pode ser usado para justificar a falta de resposta do eletrodo modificado em soluções contendo o $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, visto que situação similar foi observada em solução contendo $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+/+}$. Pode-se discutir, no entanto, o efeito da labilidade dos complexos avaliados quanto a uma possível interação com o filme de lignina. O mecanismo de transferência de carga tanto no complexo de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$ quanto no complexo de

$[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+/+}$ é o de transferência de carga de esfera externa, enquanto no complexo de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ o mecanismo preponderante é por esfera interna. Como o complexo de cobre não apresentou resposta eletroquímica, tem-se a hipótese que o tipo de mecanismo de transferência de carga não é o responsável pela atividade eletroquímica do $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$.

Uma explicação possível para o bloqueio da resposta eletroquímica do eletrodo modificado ao complexo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ é a dificuldade de aproximação do mesmo da superfície eletródica devido a elevada espessura do filme de lignina formado. Como a substituição de ligantes nestes dois complexos é dificultada devido à baixa labilidade de ambos, a estrutura carbônica dificulta a transferência de carga, por tunelamento, através do filme. Para o complexo $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$, o estabelecimento de ligações químicas seria também dificultado pela baixa labilidade do complexo. No entanto, por se tratar de um elemento de transição do quinto período da tabela periódica, orbitais mais externos deste elemento poderiam permitir a ligação química entre o centro metálico e o filme, incorporando o complexo no filme de lignina, conforme proposto e ilustrado no esquema 13.

Esquema 13. Mecanismo proposto par a reação de transferência de carga no complexo $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$ na interface ECV-LIGS/Solução

Ao se sobrepor os voltamogramas obtidos com ECV-Limpo e ECV-LIGS em solução do complexo $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$, observou-se um deslocamento dos potenciais de pico do par $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$ para potenciais mais negativos, Figura 16. A substituição de ligantes na esfera de coordenação do complexo altera a distribuição dos orbitais moleculares envolvidos na reação de transferência de carga e, conseqüentemente, altera os potenciais de oxirredução do complexo.

Figura 16. Voltamogramas cíclicos obtidos com ECV-Limpo (-■-) e ECV-LIG_s (-●-) em solução 1,0 mmol L⁻¹ de [Ru(NH₃)₆]^{3+/2+} em 0,2 mol L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, pH 8,2 ajustado com NaOH 0,1 mol L⁻¹. Condições Experimentais: $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$, $-0,4 \text{ V} \leq E_{\text{apl}} \leq 0,7 \text{ V}$

O fato do ECV-LIG_s apresentar, os picos correspondentes ao par redox Ru(III) e Ru(II) em solução contendo apenas o eletrólito suporte, mesmo após a lavagem da superfície do eletrodo, é um indicativo de que a hipótese de transferência de carga via estabelecimento de ligação química com o filme esteja ocorrendo, Figura 17.

Figura 17. (A) $I_{p,a}$; $I_{p,c}$ e relação $I_{p,c}/I_{p,a}$ obtidas em $(NH_4)_2SO_4$ 0,2 mol L⁻¹, pH 8,2 com ECV-LIGs como função do número de ciclos, após a utilização do eletrodo em soluções contendo $[Ru(NH_3)_6]^{3+/2+e}$, (B) Voltamogramas cíclicos obtidos com o ECV-LIGs em $(NH_4)_2SO_4$ 0,2 mol L⁻¹, após utilização em solução do complexo de Rutênio (ciclos 1,3,5). Condições experimentais: $\nu = 100\text{mV s}^{-1}$ e $-0,4\text{ V} \leq E_{apl} \leq 0,7\text{ V}$

III.1.2 – Utilização de lignina Alkali como agente modificador para desenvolvimento de sensores voltamétricos

Após a caracterização dos 3 tipos de lignina estudados, optou-se por usar lignina Alkali (lignina comercial – LIGs) como agente modificador de eletrodos devido ao menor grau de fragmentação observado para a mesma e, como consequência, maior homogeneidade de amostra.

Na primeira etapa de desenvolvimento da Tese, utilizaram-se basicamente eletrodos de carbono vítreo para obtenção de eletrodos quimicamente modificados com lignina. Este fato limitou nosso conhecimento sobre a real aplicabilidade destes filmes para modificação de eletrodos. Dessa forma não era óbvio, o fato de que a lignina oxidada e não, a lignina conforme extraída do licor negro, seria o agente modificador necessário aos propósitos eletroquímicos desejados.

Durante a etapa correspondente a esta segunda fase de desenvolvimento da tese,deparou-se com situações alternadas onde ora se obtinha resposta para eletrodos recobertos com solução de lignina, por exemplo, em solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, usada como sonda eletroquímica, e ora não. Vale salientar, que anteriormente, de fato nunca se observou tal resposta. O ECV foi substituído consecutivamente por eletrodos de Au (EAu) e Cu (ECu) e, o comportamento aleatório sempre se repetia.

Pensou-se na possibilidade de variação da estrutura da lignina em solução, com o passar do tempo, talvez um processo de envelhecimento, que originasse lignina parcialmente oxidada, uma vez que filmes preparados a partir soluções envelhecidas, aparentemente, sempre apresentavam atividade eletroquímica. Para avaliar esta possibilidade, a lignina sólida foi oxidada com peróxido de hidrogênio em meio alcalino

uma solução deste material em DMF foi então usada como solução modificadora. Todo o processo de modificação do eletrodo de carbono vítreo foi novamente repetido, porém a falta de reprodutibilidade continuou.

Levantou-se a hipótese de que o tempo decorrido entre o recobrimento da superfície do eletrodo e sua utilização pudesse interferir na resposta dos sensores, algo similar ao que ocorre com as autocamadas arranjadas de tióis (do inglês, Self Assembled Monolayers – SAMs). Para avaliar esta possibilidade, eletrodos de Au, CV e Cu foram modificados por recobrimento superficial com 20 μL de solução de Lignina (LIGs) e Lignina oxidada (LIGs-oxi) 1gL^{-1} em DMF. O procedimento de secagem do filme foi avaliado de acordo com o descrito no Fluxograma 3 (página 33) e, íons $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, NO_2^- , além de H_2O_2 , foram usados como sondas eletroquímicas para avaliação da resposta destes sensores.

As Figuras 18 e 19 mostram que apenas eletrodos de Au modificados com solução de lignina oxidada apresentaram sinal redox em soluções de íons ferrocianeto, além do par redox quinona/hidroquinona da própria lignina, que pode ser detectado até em ECV modificado com lignina oxidada ou não. O eletrodo de cobre foi descartado uma vez que o sinal de fundo é elevado devido ao processo redox do próprio metal. Os resultados obtidos indicaram que um parâmetro experimental importante a ser considerado era o estado de oxidação da lignina.

Figura 18. Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 6,0$ com eletrodo de ouro modificado com: (A) (●●●) LIGs e (—) LIGs-oxi ambos com secagem de filme por uma noite. (B) LIGs-oxi com secagem de filme (—) secagem de filme por uma noite, (---) em estufa por 3h a 60°C e (●●●) secagem sob fluxo de ar quente

Figura 19. Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 6,0$ com (—) EAu-LIGs-oxi e (●●●) ECV-LIGs-oxi ambos com secagem por uma noite

A necessidade de utilização da lignina oxidada é facilmente compreendida levando-se em consideração que, se a maior parte dos grupamentos – OH alifáticos for oxidado em etapa prévia, seus carbonos correspondentes passam a ter hibridização sp^2 e passam a estabelecer uma hiperconjugação com os anéis aromáticos, de modo que o material passa de isolante a condutor.

A figura 20 mostra os espectros infravermelho correspondentes a lignina oxidada e a lignina original. As alterações principais a serem destacadas são: a diminuição da transmitância no número de onda correspondente ao estiramento O-H em 3400 cm^{-1} e a intensificação de absorção de radiação no processo atribuído ao estiramento C=O de carbonilas alifáticas em 1717 cm^{-1} , confirmando as expectativas de oxidação química dos grupamentos hidroxil existentes na estrutura da lignina a grupamentos carbonila. Surge também uma banda larga de média intensidade entre 2691 cm^{-1} e 2205 cm^{-1} correspondente a estruturas do tipo 1,3 enol-cetonascujos carbonos tem hibridização sp^2 similar a hibridização dos carbonos pertencentes aos anéis aromáticos, o que permite uma sobreposição mais eficiente dos orbitais π das cadeias alifáticas com os orbitais π dos anéis aromáticos, melhorando, assim, a condutividade eletrônica do filme.

Figura 20. Espectros na região do infravermelho para (1) Lignina comercial não oxidada; (2) Lignina comercial após oxidação química

Outro aspecto importante a ser considerado no processo de formação dos filmes de lignina é o tempo de secagem dos mesmos e a metodologia de secagem. Os resultados obtidos, em solução de íons ferrocianeto, com EAu-Ligs-oxi, mostraram um ΔE_p de 80 mV para eletrodos de Au em que a secagem foi efetuada por uma noite à temperatura ambiente, Figura 18B, em comparação com o valor de 120 mV, obtido para o mesmo tipo de eletrodo quando a secagem foi feita em estufa a 60°C, Figura 19. Além de menor valor de ΔE_p , o eletrodo cuja secagem foi feita durante a noite apresentou ainda menor corrente de fundo. Os resultados também indicam que ocorre participação ativa do metal transdutor na atividade eletroquímica dos eletrodos modificados, e, exatamente por isso, não se obteve resposta em eletrodos de carbono vítreo. Cabe recordar que a lignina utilizada neste trabalho contém 1,45% de enxofre, de modo que a ligação aos eletrodos, no caso do Au e Cu deve estar ocorrendo via grupamentos – SH.

As figuras 21 e 22 apresentam os voltamogramas cíclicos comparativos obtidos em solução contendo íons ferrocianeto e em solução contendo peróxido de hidrogênio, com

o eletrodo de ouro limpo e o eletrodo de ouro modificado com filme de LIGs oxidada, cuja secagem foi efetuada à temperatura ambiente por uma noite.

Aparentemente o perfil voltamétrico é exatamente o mesmo, mas os filmes de lignina impedem a modificação superficial do eletrodo de ouro, figura 21B. No eletrodo modificado, obtém-se reprodutibilidade voltamograma a voltamograma, o que já não acontece com o eletrodo limpo, Figura 21A. Observou-se também, para o eletrodo modificado, uma corrente de fundo menor em solução de peróxido de hidrogênio, figura 22B, e de forma muito nítida, do que aquela observada em eletrodo de ouro sem modificação, Figura 22A.

Figura 21. Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de Tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,1 contendo $1,0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Fe(CN)}_6^{4-}$ com (A) EAu limpo e (B) EAu-LIGs-oxi_(SP1N). Condições Experimentais: $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$; $E_i = -0,7 \text{ V}$, $E_\lambda = +0,7 \text{ V}$, $E_f = -0,7 \text{ V}$. Os voltamogramas representados correspondem às varreduras 1, 2, 4, 6, 8 e 10

Figura 22. Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de Tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,1 para concentrações de 0,1; 0,2; 0,3 e 0,4 mmol L^{-1} de H_2O_2 com: (A) EAu sem modificação e com (B) EAu-LIGs-oxi($\text{SP}_{1\text{N}}$). Condições Experimentais: $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$; $E_i = -0,7 \text{ V}$, $E_A = +0,7 \text{ V}$, $E_f = -0,7 \text{ V}$. Os voltamogramas representados correspondem à terceira varredura para cada valor de concentração

III.1.3 -Avaliação do caráter redutor das soluções de lignina - Formação de nanopartículas.

Observou-se durante os trabalhos experimentais que tanto a solução de lignina quanto a solução de lignina oxidada possuem um forte caráter redutor, sendo capaz de reduzir, visivelmente, íons Fe^{3+} a Fe^{2+} ; Cu^{2+} a Cu^+ , Figura 23. Dependendo do meio pode haver também a redução de Ag^+ a Ag^0 e Au^{3+} a Au^0 , com possibilidade de formação nanopartículas, com a lignina atuando concomitantemente como agente redutor e estabilizante.

Figura 23. (A) Solução de $\text{Cu}(\text{SO}_4)$ $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em Tampão ácido acético/acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,7. (B) Solução de íons Cu^+ após adição de solução de lignina 1 g L^{-1} (DMF). (C) Após adição de $\text{KI}_{(s)}$ seguido da adição de algumas gotas de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ para eliminar o excesso de I_2

As observações experimentais conduziram à proposição modificação o pó de grafite com lignina e então utilizar este compósito para reduzir Au a partir de uma solução de HAuCl_4 . Os voltamogramas obtidos com eletrodo de pasta de carbono modificados com o compósito mostram que o grafite foi, de fato, modificado com o metal, pois em meio de KCl (agente complexante de Au^{3+}), observou-se a antecipação do sinal de oxidação do Au que está ausente quando o branco foi obtido em tampão fosfato, Figura 24.

Figura 24. Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹, pH 6,0 com: (-■-) EPC; (-○-) EPC-LIGs e (-Δ-) EPC-LIGs-Au. Inseto: Voltamograma cíclico obtido com EAu em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹, pH 6,0; $E_i = -0,1$ V, $E_\lambda = 1,2$ V, $E_f = -0,1$ V. Condições Experimentais: Eletrólito Suporte, KCl 0,1 mol L⁻¹, $v = 100$ mV s⁻¹, $E_i = -0,1$ V, $E_\lambda = 1,4$ V, $E_f = -0,1$ V. Os voltamogramas ilustrados correspondem a 1ª varredura. EPC = Eletrodo de pasta de carbono e EPC-LIG = Eletrodo de Pasta de Carbono preparado com grafite contendo apenas lignina adsorvida

A ausência do pico de oxidação a +1.2 V quando o eletrólito suporte (KCl) foi substituído pelo fosfato, pH = 6,0, que não atua como agente complexante de Au^{3+} não deixa dúvidas sobre a origem deste processo eletroquímico. Além disso, o filme evita a oxidação do ouro em tampão fosfato ampliando a janela de trabalho do eletrodo modificado, Figura 25.

Figura 25. Voltamogramas cíclicos obtidos com EPC-LIGs-Au em solução de (-■-) KCl 0,1 mol L⁻¹, pH 6,0 e (-○-) tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 6,0. Inseto: Voltamograma cíclico obtido com Eletrodo de Au limpo em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 6,0. Condições Experimentais: $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$, $E_i = -0,1 \text{ V}$, $E_\lambda = 1,4 \text{ V}$, $E_f = -0,1 \text{ V}$. Os voltamogramas ilustrados correspondem a 1ª varredura

As imagens de microscopia de transmissão eletrônica do compósito foram obtidas e mostram as nanopartículas de ouro formadas com tamanho médio de 120 nm de diâmetro. Pode-se inferir também que os pontos em que foram formadas as nanopartículas correspondem a regiões em que estão presentes os grupos redox ativos capazes de promover a redução de Au^{3+} a Au_0 , Figura 26.

Figura 26. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão do compósito 2 (A e C) e do compósito 3 (B e D) em ordem decrescente de magnificação. O diâmetro de partícula formada está por volta de 100 nm. A tabela 4 mostra os tipos de compósitos preparados (seção III.1.4)

III.1.4 -Comportamento eletroquímico de eletrodos de pasta de carbono modificados com lignina e nanopartículas de ouro EPC-LIGs-Au.

Comprovada a redução do ouro pela lignina e a formação do compósito Grafite/Lignina/Au, sucedeu-se então a etapa de otimização das quantidades de ouro e lignina de maneira a se obter a melhor proporção de massa entre os componentes, visando a melhorar resposta analítica do sensor eletroquímico para o íon $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 5,0 mmol L⁻¹ em tampão fosfato, 0,1 mol L⁻¹, pH 6,0, utilizado como sonda, Tabela 4.

Tabela 4. Massa e percentagem dos componentes no compósito (expressa em função da massa de grafite em mg), e denominação do eletrodo de pasta de carbono modificado correspondente (EPCM)

Compósito	EPCM	Grafite (mg)	Lig(oxi) / mg (% m/m)	HAuCl ₄ / mg (% m/m)	Óleo (mg)	Mineral
1	EPCM - 1	500	5 (1%)	0,5 (0,1%)	250	
2	EPCM - 2	500	12,5 (2,5%)	0,5(0,1%)	250	
3	EPCM - 3	500	25 (5%)	0,5(0,1%)	250	
Compósito	EPCM	grafite (mg)	Lig / mg (% m/m)	HAuCl ₄ / mg (% m/m)	Óleo (mg)	Mineral
4	EPCM – 4	500	5 (1%)	0,5(0,1%)	250	
5	EPCM – 5	500	12,5 (2,5%)	0,5(0,1%)	250	

A partir da relação entre $i_{p,a}$ e $i_{p,c}$ mais próxima de 1 e seus maiores níveis de corrente, concomitantemente com a menor separação entre os potenciais de pico de oxidação aproximando-se de 59mV para um processo reversível, observou-se que a relação $m_{LIGs-oxi}/m_{graf}$ de 2,5% foi melhor condição encontrada, Figura 27 e tabela 5. A maior corrente capacitiva do eletrodo preparado com lignina não oxidada já era esperado, devido à ausência de estruturas que permitissem uma maior conjugação dos orbitais moleculares na estrutura da lignina, e conseqüentemente maior condutividade. Observou-se maior corrente capacitiva para o grafite com impregnado 5% de lignina oxidada impregnada devido uma alteração da consistência da pasta de carbono, apresentando uma característica menos coesa.

Figura 27: Voltamogramas cíclicos obtidos com EPC-LIGs-Au nas condições apresentadas na tabela 5

Tabela 5: Parâmetros eletroquímicos obtidos com eletrodos EPC-LIGs-Au e EPC-LIGs-oxi-Au como função da percentagem de Au presente no compósito – Sonda eletroquímica: solução 5,0 mmol L⁻¹ de [Fe(CN)₆]^{3-/4-} em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 6,0.

Eletrodo	Ep,a ; Ep,c (V)	ΔEp (V)	Ip,a ; Ip,c (μA)	Ip,a/Ip,c
EPCM - 1	0,361 ; 0,191	0,170	100 ; 105	0,95
EPCM – 2	0,325 ; 0,161	0,163	131 ; 138	0,95
EPCM – 3	0,378; 0,180	0,197	87,1 ; 81,4	1,07
EPCM – 4	0,376 ; 0,129	0,247	65,5 ; 66,0	0,98
EPCM - 5	0,388 ; 0,166	0,222	85,5 ; 87,7	0,97

A segunda etapa de otimização do compósito consistiu na determinação da melhor percentagem de ouro a ser reduzido sobre a superfície do grafite/Lignina. Seguindo os critérios e condições experimentais apresentados na tabela 6, a melhor resposta foi obtida na condição de em que se havia 0,2% de massa ouro reduzido em relação a massa de grafite + lignina oxidada. Uma possível explicação para este fato é que, para quantidades menores de ouro, a quantidade de nanopartículas formadas é insuficiente para fornecer condutividade, condição em que se observa uma menor atividade catalítica. No entanto para valores acima de 0,2%, a observação de uma resposta menos eficiente pode decorrer do fato de que o eletrodo passou a se comportar como eletrodo de ouro “bulk”, Tabela 6.

Tabela 6: Parâmetros eletroquímicos obtidos com eletrodos e EPC-LIGs-oxi-Au como função da percentagem dos componentes presentes no compósito – Sonda eletroquímica: solução 5,0 mmol L⁻¹ de [Fe(CN)₆]^{3-/4-} em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 6,0.

Eletrodo (percentagem do ouro no compósito / % m/m)	Ep,a ; Ep,c (V)	ΔEp (V)	Ip,a ; Ip,c (μA)	Ip,a/Ip,c
ECPM 2a (0,1 %)	0,310 ; 0,158	0,152	139 ; 140	0,99
ECPM 2b (0,2 %)	0,334 ; 0,204	0,130	146 ; 150	0,97
ECPM 2c (0,4 %)	0,372 ; 0,185	0,187	107 ; 108	0,98
ECPM 2d (0,8 %)	0,319 ; 0,149	0,170	131 ; 125	1,05

Para se comprovar que o efeito observado na superfície eletródica se deve a um efeito sinérgico entre LIGs-oxi e nanopátículas de ouro, os perfis voltamétricos de um eletrodo de pasta de carbono modificado apenas com nanopátículas de ouro adsorvidas no grafite (AuNp–EPC) e um eletrodo de pasta de carbono modificado apenas com LIGs-oxi (LIGs-oxi-EPC) foram também avaliados e comparados ao EPCM-2b, utilizando-se [Fe(CN)₆]^{3-/4-} como sonda eletroquímica, Figura 28. O comportamento eletroquímico observado para o ECPM-2b se deve, portanto, à ação sinérgica entre ouro e lignina_(oxi) visto que para os ambos os outros eletrodos comparados, a separação entre potenciais de picos para o par redox [Fe(CN)₆]^{3-/4-} foi maior e os valores de correntes de pico obtidos menores.

Figura28. Voltamogramas cíclicos obtidos com EPCM-2b (1), LIGs-oxi-EPC* (2) e AuNP-EPC (3) em solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,0 contendo $5,0 \text{ mmol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Condições experimentais: $E_i = -0,2 \text{ V}$, $E_\lambda = +0,7 \text{ V}$, $E_f = -0,2 \text{ V}$ e $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$. *LIGs-oxi-EPC: 12,5 mg de lignina comercial oxidada; 500 mg de grafite e 250 mg de óleo mineral

Após a otimização das condições de modificação do grafite, a resposta de eletrodos de pasta de carbono preparados a partir deste material foi avaliada frente a diversos analitos: Dopamina (DA), Ácido Ascórbico (AA), nitrito (NO_2^-) e iodato (IO_3^-). O comportamento eletroquímico da molécula de Dopamina (DA) sob superfícies nanoestruturadas está documentada na literatura, com diversos tipos de eletrodos modificados (HU; GUO; SHAO, 2009; HUANG *et al*, 2008). Os autores mostraram uma

antecipação do pico correspondente ao processo de oxidação da (DA) em relação a eletrodos não modificados e propondo a ancoragem da molécula de DA sobre as nanopartículas de ouro por meio do grupamento amino (HUANG *et al*, 2008) presente na DA como possível explicação para este fenômeno. Observou-se comportamento eletroquímico similar para a molécula de dopamina sobre a superfície de EPCM-2b, com um processo redox reversível sendo observado em $E_{p,a} = 0,279$ V e $E_{p,c} 0,154$ V. Este grupo pode orientar a molécula de maneira que os grupos quinona/H-quinona da DA estejam melhor posicionados para serem oxidados pelos grupamentos fenol/quinona presentes no composto, Figura 29.

Figura29. Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,0, contendo $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ DA com EPCM-2b (1) e com EPC (2). Condições experimentais: $E_i = -0,2$ V, $E_{\lambda} = +0,7$ V, $E_f = -0,2$ V e $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$

Para ácido ascórbico, cuja oxidação sobre superfícies nanoestruturadas também já foi reportada na literatura (HUANG *et al*, 2008), observou-se no EPCM-2b uma antecipação do potencial de pico de oxidação em relação ao eletrodo limpo, EPC, de quase 90 mV. Este fato pode ser justificado pela presença de grupos fenol/quinona presentes na lignina, que podem mediar a oxidação do AA, Figura 30.

Figura 30. Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 6,0, contendo 1,0 mmol L⁻¹ AA com (1) EPCM-2b e com (2) EPC. Condições Experimentais: $E_i = -0,2$ V, $E_A = +0,7$ V, $E_f = -0,2$ V e $v = 20$ mV s⁻¹

O ECPM-2b preparado mostrou atividade catalítica perante NO₂⁻ e IO₃⁻ as espécies, Figura 31 e Figura 32 respectivamente, em meio ácido (H₂SO₄), indicando uma boa aplicabilidade do material preparado na região positiva de potencial visto que o início de processo de redução eletroquímica de ambas as espécies se encontra na mesma região de potencial.

Figura 31. Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de H_2SO_4 , $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $1,0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NO}_2^-$ com (1) EPCM-2b e (2) EPC. Condições Experimentais: $E_i = + 0,7 \text{ V}$, $E_A = - 0,1 \text{ V}$, $E_f = + 0,7 \text{ V}$ e $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$

Para altas concentrações de IO_3^- (acima de $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$), foi observado ainda um pico de oxidação após a varredura de potencial no sentido negativo, que supõe-se estar associado à oxidação do produto formado na redução do IO_3^- , sendo este produto I_2 , Figura 33. Há de se ressaltar ainda que não é possível determinar IO_3^- com EPC devido a falta de estabilidade de linha base ao longo das varreduras, havendo o cruzamento das mesmas em diversos pontos da varredura.

Figura 32. Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de H_2SO_4 , 0,5 mol L^{-1} contendo 0,1 mmol L^{-1} IO_3^- com (1) EPCM-2b e (2) EPC. Condições Experimentais: $E_i = + 0,7 \text{ V}$, $E_\lambda = - 0,1 \text{ V}$, $E_f = + 0,7 \text{ V}$ e $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$

Figura 33. Voltamogramas cíclicos obtidos com EPCM-2b em solução de H_2SO_4 , 0,5 mol L^{-1} contendo 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 e 0,5 mmol L^{-1} IO_3^- . Condições Experimentais: $E_i = +0.7 \text{ V}$, $E_\lambda = -0,1 \text{ V}$, $E_f = +0,7 \text{ V}$ e $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$. Inserto: Curva analítica para iodato: $I (\mu\text{A}) = -0.485 \mu\text{A} + 22.4 [\text{IO}_3^-] (\text{mmol L}^{-1})$; $R = 0.992$

Todos os resultados mostram a versatilidade e aplicabilidade de lignina como agente modificador de eletrodos no desenvolvimento de sensores voltamétricos. Uma vez que a literatura carecia de um estudo sistemático acerca de todas as condições experimentais essenciais no preparo destes filmes, os resultados puderam abranger e explorar alguns aspectos essenciais bem como ampliar a compreensão e aplicabilidade do material no desenvolvimento de sensores voltamétricos.

III.2. – Comportamento eletroquímico de fármacos em eletrodos de carbono vitreo e interação in-situ fármaco-DNA.

III.2.3 – DNA e Gemcitabina

O comportamento eletroquímico de GEM e o mecanismo de interação GEM-dsDNA foram investigados em eletrodo de carbono vítreo usando de voltametria cíclica (VC), voltametria de pulso diferencial (VPD) e voltametria de onda quadrada (VOQ).

III.2.3.1 -Comportamento eletroquímico de GEM, bases nitrogenadas, nucleotídeos, ds-DNA, poli-A e poli-G.

O comportamento eletroquímico de GEM foi estudado com eletrodo de carbono vítreo utilizando a técnica de voltametria cíclica, em solução de eletrólito suporte contendo $100\mu\text{mol L}^{-1}$ do fármaco na faixa de pH de 1,0 a 11, e nenhum processo eletroquímico foi observado na região de potencial entre - 0,7 e + 1.4 V, Figura 34.

Figura 34. Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de GEM $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão ácido acético/acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5. Os voltamogramas apresentados correspondem à primeira varredura de cada experimento.

As bases nitrogenadas e nucleosídeos sofrem oxidação eletroquímica em eletrodo de carbono vítreo em potenciais positivos, sendo a guanina a primeira base nitrogenada a ser oxidada por volta de 0,7 V em tampão ácido acético/acetato 0,1 mol L⁻¹, pH 4,7, Figura 35. Na sequência, oxidam-se o nucleotídeo guanosina, a base nitrogenada adenina e seu respectivo nucleosídeo adenosina, e timina, todos no intervalo de potencial entre + 0,2 V e + 1,4 V. Acima de +1,4 V, a corrente de fundo é alta e não foi possível visualizar a oxidação eletroquímica de timidina, citosina e citidina. A partir dos sinais obtidos para as soluções independentes de cada base e nucleotídeo, é possível mapear os picos de oxidação eletroquímica observados para o ds-DNA.

Figura 35. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com eletrodo de carbono vítreo em tampão ácido acético/acetato 0,1 mol L⁻¹, pH 4,7 em solução 50,0 μmol L⁻¹ de (G) guanina, (dG) Guanosina, (A) Adenina, (dA) Adenosina e (T) Timina.

Os voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida obtidos para o dsDNA mostram dois picos correspondentes à oxidação eletroquímica de desoxiguanosina e desoxiadenosina, dGuo e dAdo respectivamente, Figura 36, coincidindo com os picos de oxidação dos nucleotídeos em solução observados previamente. Quando há a degradação do dsDNA, há o aparecimento de picos de oxidação correspondentes a guanina e adenina, provenientes da clivagem das bases do DNA, e de um pico de oxidação eletroquímica por volta de 0,5 V, atribuído à oxidação da 8-oxoguanina, produto primário de oxidação da guanina e marcador biológico de danos oxidativos ao DNA.

Figura 36. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com eletrodos de carbono vítreo modificados com DNA em Tampão ácido acético/acetato 0,1 mol L⁻¹, pH 4,5 para (linha preta) ds-DNA sem danos oxidativos e (linha lilás) dsDNA com danos oxidativos

Os voltamogramas que mostram o comportamento eletroquímico do ds-DNA, poli-G (polidesoxiguanosina) e poli-A (polidesoxiadenosina) foram obtidos como um controle, a fim de elucidar e evidenciar alterações nos perfis voltamétricos e a interação de GEM-dsDNA. O voltamograma de pulso diferencial obtido em solução de dsDNA mostrou dois picos de oxidação bem definidos correspondentes a oxidação de desoxiguanosina (dGuo) em $E_{pa} = + 0,98$ V e desoxiadenosina (dAdo), em $E_{pa} = + 1,25$ V. O Poli-G apresentou apenas o pico dGuo e poli-A apenas o pico dAdo, ambos nos mesmos potenciais de pico observados para o ds-DNA, Figura 37.

Figura 37. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com eletrodos de carbono vítreo em solução de tampão ácido acético/acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5, de $50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$: (—) dsDNA, (— — —) poli-G, (●●●) poli-A e (—) $50,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de GEM : A) linha de base não corrigida e B) linha de base corrigida. Velocidade de varredura: 5 mV/s

III.2.3.2 – Avaliação da interação GEM-dsDNA em soluções incubadas.

O estudo eletroquímico da interação GEM-dsDNA foi conduzido em soluções incubadas contendo $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de GEM e $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA em solução de tampão ácido acético/acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5. O voltamograma de pulso diferencial obtido imediatamente após a adição de GEM à solução de ds-DNA mostra o decréscimo das correntes de pico relacionadas à oxidação de dGuo e dAdo, Figura 38, quando comparadas com as correntes obtidas na solução controle de dsDNA, e diminuem conforme o tempo de incubação aumenta.

Figura 38.-Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida obtidos com eletrodo de carbono vítreo em $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de: dsDNA em tampão ácido acético/acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5 (—) controle e após a incubação com $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ GEM durante (—) 0h, (- - -) 2h e (...) 4h

Um comportamento similar foi observado para soluções incubadas de GEM com poli-A e poli-G. Houve ainda um deslocamento de cerca de 40 mV para potenciais mais positivos do pico da dGuo e um pequeno pico de oxidação surgiu, em $E_{pa} = + 0,76 \text{ V}$, Figura 39^a. Este pico corresponde à oxidação da guanina livre em solução, formada em

decorrência da interação GEM-dsDNA. Deste modo, os resultados indicam uma maior afinidade de GEM pela base guanina, Figura 39A e 39B, fenômeno explicado devido a similaridade estrutural de GEM com nucleotídeo citidina.

Figura 39. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com linha de base corrigida com eletrodos de carbono vítreo em solução de 50 $\mu g mL^{-1}$: A) poli-Ge B) poli-A, em solução tampão ácido acético/acetato 0,1 mol L^{-1} , pH = 4,5, (—) antes (controle) e depois incubação com 10,0 $\mu mol L^{-1}$ GEM durante (—) 0 h, (---) 2 h e (···) 4 h

O voltamograma de pulso diferencial obtido em solução de 25,0 $\mu mol L^{-1}$ de guanosina incubada durante 4 horas com 25,0 $\mu mol L^{-1}$ GEM, mostrou comportamento similar ao observado ao poli-G, com o deslocamento do pico de oxidação de dGUo para potenciais mais positivos e o aparecimento do pico em $E_{pa} = + 0,76 V$, correspondente ao pico de oxidação de resíduos livres de guanina em solução, Figura 40.

Figura 40. Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida obtidos com eletrodos de carbono vítreo em solução tampão ácido acético/acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 4,5$, contendo $25,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ guanosina (—) antes (---) após 4h de incubação com $25,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ citidinae (•••) após 4h de incubação com $25,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ GEM

O aparecimento do pico correspondente a oxidação de guanina livre pode ser explicado considerando um efeito indutivo de clivagem da ligação química entre a guanina e a ribose promovido pela GEM, acarretando a liberação de resíduos livres de guanina que são oxidados em potenciais menos positivos. O mesmo procedimento de incubação foi realizado substituindo-se guanosina por adenosina e nenhuma modificação no perfil voltamétrico foi observada, (dados não mostrados). Uma solução controle de $25,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de guanosina foi incubada com $25,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de citidina nas mesmas condições e observou-se uma diminuição muito pequena do pico correspondente a oxidação de guanosina livre e não houve a liberação de guanina em solução.

III.2.3.3 – Avaliação da interação GEM-dsDNA usando Espectroscopia UV-Vis

O estudo por espectroscopia Uv-Vis da interação GEM-dsDNA foi conduzido em soluções incubadas de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ GEM e $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA, em Tampão ácido acético/acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 4,5$. Os espectros foram obtidos depois de diferentes tempos de incubação, Figura 41. Soluções controle individuais de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA e $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de GEM foram também preparadas e espectros Uv-Vis foram obtidos para os mesmos tempos de incubação.

Figura 41. Espectros UV-Vis de: (—) $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA, (—) $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ GEM, e após incubação de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ dsDNA com $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ GEM durante (—) 0 h e (···) 24 h

O espectro Uv-Vis obtidos em uma solução recém preparada de GEM mostrou uma banda de absorção em $\lambda = 270,2 \text{ nm}$, próxima ao máximo de absorção da solução de dsDNA em $\lambda = 259,9 \text{ nm}$. Os espectros mostram uma diminuição da absorbância total da mistura após 24 horas de incubação. Estes dados estão em concordância com

fenômeno de agregação/condensação das fitas do dsDNA devido interação com GEM previamente observado nos experimentos eletroquímicos.

III.2.3.4 - Sensor voltamétrico de dsDNA para avaliação *in situ* da interação GEM-dsDNA

Para aplicação deste sensor, há necessidade de se garantir o completo recobrimento da superfície do eletrodo de carbono vítreo com dsDNA, a fim de se evitar a formação de camadas finas e incompletas do filme de DNA, o que permitiria a adsorção não específica de GEM sobre a superfície eletródica. O sensor voltamétrico de dsDNA permite a detecção em tempo real de mudanças conformacionais e estruturais ocorridas sobre o dsDNA adsorvido sobre a superfície eletródica em tempo real.

Os voltamogramas de pulso diferencial obtidos com o sensor voltamétrico controle de dsDNA mostraram ambos os picos de oxidação de dGuo e dAdo, Figura 42. Após a incubação em $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ GEM durante 15 minutos, o sensor foi lavado com água Milli-Q para se remover moléculas de GEM não ligadas ao dsDNA, e em seguida transferido para solução de tampão ácido acético/acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 4,5 onde voltamogramas de pulso diferencial foram obtidos. Este procedimento foi repetido para cada tempo de incubação, sempre se utilizando sempre um sensor voltamétrico de dsDNA recém preparado.

Figura 42. Voltamograma de pulso diferencial com linha de base corrigida obtidos com eletrodos de carbono vítreo em tampão ácido acético/acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 4,5$: (—) sensor eletroquímico controle de dsDNA e; sensor eletroquímico de dsDNA após incubação com $10,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ GEM durante (—) 15 min, (---) 2 h e (···) e 4 h

Os picos correspondentes à oxidação de dGuo, $E_{\text{pa}} = +0,98 \text{ V}$, e dAdo, $E_{\text{pa}} = +1,25 \text{ V}$ diminuíram em intensidade após 4h de incubação, em concordância com os resultados obtidos quando a interação ocorreu em solução, corroborando com a hipótese de condensação/agregamento das fitas de dsDNA promovidas pela interação com GEM. A condensação/agregamento das fitas diminui a disponibilidade dos resíduos de dGuo e dAdo para serem oxidados sobre a superfície de carbono vítreo. Como experimento controle, sensores eletroquímicos de dsDNA foram incubados em soluções de $25,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de citidina e nenhuma alteração no perfil voltamétrico do dsDNA foi observada após 4 horas de incubação. Os sensores eletroquímicos de dsDNA incubados em solução de $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ GEM apresentaram o mesmo comportamento descrito anteriormente, e o mesmo efeito de condensação/agregação das fitas descrito previamente foi

observado para períodos menores de incubação. Observou-se também o mesmo deslocamento do potencial de pico de oxidação de dGuo para potenciais mais positivos após incubação com GEM, o que indica uma interação preferencial entre GEM e resíduos de dGuo. A liberação de guanina livre também foi observada devido à ocorrência do pico em $E_{pa} = + 0.76 \text{ V}$.

Nos sensores voltamétricos controle de dsDNA, não houve mudança no perfil voltamétrico do dsDNA mesmo após 24h de incubação em tampão ácido acético/acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5. Não se observou danos oxidativos ao DNA, relacionado ao aparecimento dos marcadores biológicos 8-oxoguanina (8-oxogua) e 2,8-dihidroxiadenina (2,8-oxoAde), significando que a gemcitabina não provoca danos oxidativos ao DNA.

Com o objetivo de se obter mais informações sobre a interação de GEM-dsDNA, a superfície do eletrodo de carbono vítreo foi modificada com os polihomonucleotídeos, poli-G e poli-A, preparando assim os sensores voltamétricos de poli-G e poli-A. Os sensores voltamétricos de poli-G apresentaram o pico de oxidação de dGuo, em $E_{pa} = + 0,98 \text{ V}$, Figura 43A, que diminuiu após a incubação em solução de $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ GEM, e também mostrou o aparecimento do pico correspondente à oxidação de resíduos livres de guanina em $E_{pa} = + 0,76 \text{ V}$, corroborando com os resultados obtidos em soluções incubadas de GEM-Poli-G.

Figura 43 - Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida obtidos com eletrodos de carbono vítreo em tampão ácido acético/acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 4,5$: (A) Poli-G e (B) Poli-A (—) sensor eletroquímico controle; sensor eletroquímico após incubação com $10,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ GEM durante (—) 15 min, (---) 2 h e (···) 4 h

Resultados similares foram observados usando um sensor eletroquímico de poli-A, em que se observou uma diminuição do pico de oxidação correspondente a dAdo, em $E_{pa} = + 1.24$, sem o aparecimento de nenhum outro pico de oxidação, Figura 43B.

Concluiu-se, portanto, que o mecanismo de interação de GEM-DNA ocorre em duas etapas consecutivas, em que a etapa inicial corresponde a ligação de GEM ao dsDNA, promovendo a condesação/agregação das fitas, seguida da interação forte entre os átomos de hidrogênio da guanina e os átomos de fluor existentes na ribose da molécula de gemcitabina. Como o pico de oxidação correspondente a oxidação de guanina livre foi detectado, concluiu-se que os átomos de hidrogenio da guanina que interagem com a molécula de GEM são os mesmos envolvidos no pareamento das bases guanina e citosina no ds-DNA. A clivagem da ligação entre abase nitrogenada e o esqueleto de ribose e fosfato libera guanina livre para se oxidada na superfície do eletrodo.

III.2.1 – Comportamento eletroquímico da sulfasalazina em eletrodo de carbono vítreo

Investigou-se o comportamento eletroquímico da sulfasalazina na região positiva de potencial da sulfasalazina, com o intuito de propor um mecanismo de oxidação eletroquímica e desenvolver um método analítico na quantificação do mesmo.

- Voltametria Cíclica

Os voltamogramas cíclicos foram obtidos em solução de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ SSZ em tampão Britton Robinson $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com intervalo de pH de 2,0 e 12,0, a uma velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . Um pico anódico irreversível foi observado em todos os valores de pH estudados, com $E_{p,a1} = + 0,79 \text{ V}$ a pH 7,4, Figura 44A.

Para eletrólitos com $\text{pH} < 2,0$ e $\text{pH} > 12,0$, nenhuma reação de transferência de carga foi observada. O efeito da variação da velocidade de varredura foi estudado em soluções de $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de SSZ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8,0 em velocidades que variaram de $10 \leq v \leq 400 \text{ mV s}^{-1}$. As correntes do pico 1a aumentaram linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura, em concordância com um processo controlado por difusão, Figura 44B.

Figura 44. Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodos de carbono vítreo em solução de SSZ 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (A) em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,4 a velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} (—) primeiro e (---) segundo ciclo, (B) em solução de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 8,0 a diferentes velocidades de varredura

- Voltametria de Pulso Diferencial (VPD)

O efeito do pH do meio sobre a oxidação eletroquímica da SSZ foi avaliado por VPD em solução de $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de SSZ em eletrólito suporte com valores de pH entre 2,0 e 12,0. Observou-se que, para valores de $\text{pH} < 11,0$, o processo de oxidação da SSZ foi dependente do pH, com $E_{p,a}$ se deslocando para valores de potencial menos positivos com o aumento do pH, de acordo com a relação linear $E_{p,a1} = 1,26 - 0,059 \text{ pH}$, Figura 45A.

A inclinação da curva de $E_{p,a1}$ vs pH, figura 45B, estabelece que o número de prótons envolvido na oxidação eletroquímica é idêntico ao número de elétrons, n , como $W_{1/2} = 98 \text{ mV}$ é próximo ao valor teórico de 95 mV (BRETT; OLIVEIRA-BRETT, 1993) para a transferência de um elétron, propõe-se que o mecanismo de oxidação eletroquímica envolva 1 próton e 1 elétron. Para eletrólitos com valores de $\text{pH} > 11,0$, a oxidação da SSZ não depende do pH em concordância com a desprotonação do grupo fenólico da molécula, tendo um pK_a determinado de ~ 11 (ENACHE; OLIVEIRA-BRETT, 2011.)

A)

B)

Figura 45. (A) Voltamogramas de pulso diferencial em 3D com linha de base corrigida obtidos com eletrodos de carbono vítreo em solução de $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de SSZ para primeira varredura, (B) Gráfico de parâmetros do pico 1^a (■) $E_{p,a1}$ e (□) $I_{p,a1}$ em função do pH

Observa-se também uma variação da corrente de pico em função do pH do meio, que menores picos são observados em meio ácido, justificada pelo equilíbrio ácido base do grupo carboxilato presente no anel aromático. Essa função orgânica se torna negativamente carregada para valores de $\text{pH} > 3,0$, o que aumenta a densidade de carga no anel e facilita a oxidação do grupo fenol. Para valores de $3,0 < \text{pH} < 10,0$, a corrente

se mantém constante e, para valores de $\text{pH} > 10$, a desprotonação do grupo fenólico é a responsável pelo decréscimo observado na corrente, devido a formação do íon fenolato. Quando o grupo fenol se desprotona, o átomo de oxigênio do grupo fenol, que é oxidado quando a sulfasalazina se encontra na forma protonada, adquire um caráter mais duro aumentando a relação carga/raio do átomo, e fazendo com que seus pares de elétrons tenham interações eletrostáticas mais fortes com o núcleo do átomo. Desta forma, a energia necessária para se remover o elétron do grupo fenol nas condições supracitadas é maior, o que dificulta a reação de transferência de carga.

Quando voltamogramas de pulso diferencial sucessivos foram obtidos na mesma solução de $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de SSZ sem a limpeza da superfície do eletrodo entre os voltamogramas, os resultados mostraram a ocorrência de um segundo pico (2a) em $E_{p,a1} = + 0,10 \text{ V}$ correspondente à oxidação de um produto de oxidação da SSZ, Figura 46. Além disso, $E_{p,a1}$ se deslocou para valores de potencial mais positivos com o aumento do número de voltamogramas registrados sem limpeza do eletrodo, evidenciando a formação de um produto de oxidação que adsorve na superfície do eletrodo.

Figura 46. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos obtidos com eletrodos de carbono vítreo com linha de base corrigida em solução de $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de SSZ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8.0; (---) primeira, (•••) segunda e (—) terceira varredura

O processo correspondente ao pico 2a é dependente do pH, Figura 47A, e $E_{p,a2}$ se desloca para potenciais menos positivos com o aumento do pH, Figura 47B. A variação observada para $E_{p,a2}$ com pH, $E_{p,a2} = 0.624 - 0.059 \text{ pH}$, indica um mesmo número de elétrons e prótons envolvidos neste processo. O valor de largura de pico à meia altura correspondente ao pico 2a, $W_{1/2} = 61 \text{ mV}$, é próxima ao valor teórico para a transferência de 2 elétrons e, portanto, o mecanismo de oxidação do produto de oxidação da SSZ envolve 2 elétrons e 2 prótons.

Figura 47. (A) Voltamogramas de pulso diferencial em 3D com linha de base corrigida obtidos com eletrodos de carbono vítreo em solução de 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de SSZ para segunda varredura, (B) Gráfico de parâmetros do pico 2a (■) E_{pa2} e (□) I_{pa2} em função do pH

Para concentrações mais baixas de SSZ (25,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) ou mais altas (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$), a corrente de pico 2a correspondente ao processo de oxidação eletroquímica do produto de oxidação da SSZ se mantém no mesmo nível da observada para a concentração de

50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, indicando saturação da superfície eletródica com o produto de oxidação da SSZ.

- Voltametria de Onda Quadrada

Os voltamogramas de onda quadrada foram obtidos em solução de 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de SSZ em eletrólitos com diferentes valores de pH e há o aparecimento do pico anódico 1a na primeira varredura, com $E_{p,a1} = + 0,75 \text{ V}$, Figura 48A. Na segunda varredura sem efetuar a limpeza da superfície do eletrodo, um pico reversível 2a/2c com $E_{p,a2} = +0,10 \text{ V}$ ocorre, Figura 48B. Ao se decompor o voltamograma de onda quadrada nas componentes direta e inversa, há a ocorrência do pico em ambas as componentes em potenciais de pico similares e com correntes de pico muito próximas, indicando que o processo eletroquímico ocorrido no pico 2a é um processo de transferência de carga reversível.

Figura 48. Voltamogramas de onda quadrada obtidos obtidos com eletrodos de carbono vítreo em solução de $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ SSZ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8,0: (A) primeiro e (B) segunda varredura; correntes I_t - total, I_d - direta e I_r - reversa

- Espectroscopia UV-Vis

Os espectros UV-Vis da sulfasalazina e do ácido salicílico foram obtidos em soluções individuais $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cada composto em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4. O ácido salicílico (AS) auxiliou na atribuição das bandas correspondentes a porção salicílica da molécula. O espectro UV-Vis do AS apresenta duas bandas de absorção em $\lambda_{1\text{AS}}=230 \text{ nm}$ e em $\lambda_{2\text{AS}}=297 \text{ nm}$, que correspondem as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ no grupo carboxílico e no anel aromático, respectivamente, Figura 49A.

O espectro UV-Vis da SSZ apresentou quatro bandas de absorção e todas devido a transições eletrônicas do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$. As bandas de absorção em $\lambda_1=239 \text{ nm}$ e $\lambda_4=360 \text{ nm}$ correspondem ao mesmo tipo de transições eletrônicas observadas no ácido salicílico, embora com um deslocamento batocrômico. A banda de absorção em $\lambda_3=320 \text{ nm}$ é devido a transição eletrônica no anel da sulfonamida p-substituído, enquanto a banda de absorção $\lambda_2=270 \text{ nm}$ corresponde a banda secundária de transição de anel aromático no anel piridínico, deslocada devido à presença do heteroátomo e do grupo sulfonamida com efeito doador de elétrons para o anel aromático (PAVIA; LAMPMAN; KRITZ, 2001).

O grupo azo e o grupo fenólico são os principais responsáveis pelo significativo efeito batocrômico observado nas bandas correspondentes à porção salicílica da SSZ. Quando excitada, a molécula de SSZ possui elétrons n (não ligantes) que podem ser transferidos para o sistema π no anel aromático, resultando em um sistema de transferência de carga excitado. Esse efeito é amplificado devido a orientação na posição para dos substituintes (PAVIA; LAMPMAN; KRITZ, 2001).

O efeito de pH sobre o perfil espectroscópico da SSZ também foi avaliado, figura 49B, e pode-se observar que a banda $\lambda_3=320 \text{ nm}$ decresce em intensidade com o

aumento de pH e desaparece para valores de pH > 8,0. Em soluções fortemente alcalinas, pH>12,0, o espectro UV-Vis muda drasticamente e a banda de absorção em $\lambda_4 = 360$ sofre um significativo deslocamento batocrômico para 460 nm devido a desprotonação e formação do íon fenolato, o que corrobora com os resultados voltamétricos. A desprotonação do grupo fenol permite a deslocalização destes elétrons para o anel aromático por ressonância e aumenta significativamente a contribuição do grupo fenol para a formação do estado excitado de transferência de carga. Percebe-se ainda que a solução muda sua coloração de amarelo para laranja.

Figura 49. Espectros Uv-Vis de 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$: (A) (—) SSZ e (- - -) ácido salicílico em pH 7,4 e (B) SSZ em pH (linha vermelha) 3,4; (—) 7,0; (.....) 10,0 e (- - -) 13,0.

- Determinação analítica de SSZ

A determinação analítica da SSZ foi realizada em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0, na faixa de concentração de 10,0 a 50,0 μmol L⁻¹, Figura 42, obtendo-se uma relação linear entre $I_{p,a}$ e [SSZ] seguindo a equação $I_{p,a1} \text{ (nA)} = 0,948 + 0,966 [\text{SSZ}] \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Os limites de detecção (3 m/s) e quantificação (10 m/s) foram calculados segundo convenção da IUPAC e foram obtidos valores de LOD = 3,43 μmol L⁻¹ e LOQ = 11,39 μmol L⁻¹. Estes valores são comparáveis a eletrodos modificados com filme de bismuto (NIGOVIĆ; IMUNIĆ; HOCEVAR, 2009), porém são menos sensíveis que eletrodos de carbono com filme de antimônio (NIGOVIĆ; HOCEVAR, 2011), e os eletrodos modificados com polímeros molecularmente impressos (RAJABI; ROUSHANI; SHAMSIPUR; 2013). A principal vantagem deste procedimento é o fato de ser rápido e dispensar a necessidade de purga da solução com N₂, visto que os métodos encontrados na literatura se baseiam na reação de redução da SSZ.

Figura50. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com eletrodos de carbono vítreo com linha de base corrigida em solução de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0, contendo 10,0, 20,0, 25,0, 30,0, 40,0e50,0 μmol L⁻¹ de SSZ. Inserto: Curva analítica

- Mecanismo de Oxidação da SSZ

A oxidação da SSZ ocorre no grupo fenol da porção salicílica da molécula produzindo um radical termodinamicamente instável, em diferentes estados isoméricos. Este radical é estabilizado pela adição nucleofílica da água ao anel aromático na posição orto, visto que a posição meta não é favorecida e a posição *para* se encontra ocupada pelo grupo azo. Isto resulta em um derivado de catecol que é imediatamente oxidado e posteriormente reduzido com a inversão do sentido de varredura, Esquema 12. O derivado de catecol sofre uma oxidação reversível envolvendo dois prótons e dois elétrons, picos 2a/2c, com um mecanismo ECE análogo ao observado para a oxidação de fenóis *para*-substituídos (ENACHE; OLIVEIRA-BRETT, 2011).

Esquema 14. Mecanismo proposto de oxidação da SSZ.

III.2.2– Comportamento eletroquímico da leflunomida sobre eletrodo de carbono vítreo e eletrodo de diamante dopado com boro

– Espectroscopia Uv-Vis

O espectro da LFM apresenta uma banda de absorção em $\lambda_1 = 259$ nm, devido a transição $\pi \rightarrow \pi^*$, proveniente do anel benzênico do grupamento α,α,α -trifluoro-*p*-acetotoluidil. O grupamento amino é o responsável pelo efeito batocrômico observado na banda secundária de absorção do anel benzênico, devido a um efeito de deslocalização de elétrons n (não ligantes) do átomo de nitrogênio para o anel aromático, cujo fenômeno é magnificado pela orientação em *para* do grupamento trifluorometila (PAVIA; LAMPMAN; KRITZ, 2001)¹, Figura 51A.

O efeito de pH sobre o perfil espectroscópico da LFM também foi avaliado, Figura 51B, e pode-se observar que a banda $\lambda_1 = 259$ nm se mantém constante em intensidade com o aumento de pH até desaparecer para valores de $\text{pH} > 11$. Em soluções fortemente alcalinas, $\text{pH} > 11,0$, o espectro UV-Vis muda drasticamente e a banda de absorção em $\lambda_1 = 259$ sofre um significativo deslocamento batocrômico para $\lambda_3 = 295$ nm, e mostra uma nova banda de absorção em $\lambda_2 = 245$ nm devido a desprotonação do grupo amino presente no grupamento α,α,α -trifluoro-*p*-acetotoluidil, o que promove o aumento da eficiência de sobreposição de orbitais π e a deslocalização de elétrons sobre a estrutura.

Figura 51. Espectros UV-Vis de $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ LFM: (A) vs. pH; (B) para valores de pH: (—) 10, (---) 11, (···) 12 e (-·-) 13.

- Voltametria Cíclica

Voltamogramas cíclicos foram obtidos com ECV em $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ LFM em solução tampão com valores de pH na faixa de 3,0 a 13,0 com velocidades de varredura de 100 mV s^{-1} . Para todas as condições estabelecidas, um pico anódico irreversível e dependente do pH, 1a, foi observado em $E_{p,a1} = + 1,15 \text{ V}$ em tampão fosfato, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0, figura 52A. No sentido reverso de varredura de potencial, nenhum pico de redução foi observado. Um pequeno decréscimo da corrente de pico 1a foi observado quando se realiza varreduras subsequentes sem a limpeza da superfície do eletrodo. Nenhum outro processo eletroquímico foi observado nas varreduras subsequentes.

O efeito da velocidade de varredura sobre o pico de oxidação 1a também foi avaliado em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 contendo $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ LFM. Voltamogramas cíclicos foram obtidos renovando-se a superfície do eletrodo para cada velocidade avaliada em

uma faixa de velocidade de varredura de 25 mV s⁻¹ a 400 mV s⁻¹. Observou-se uma relação linear entre a corrente de pico observada e $v^{1/2}$, o que indica que o processo de oxidação é controlado por difusão. No entanto para velocidades acima de 200 mV s⁻¹, observou-se um deslocamento do potencial de pico para valores mais positivos e perda de definição do pico, figura 52B.

Figura 52. Voltamogramas cíclicos obtidos com eletrodos de carbono vítreo em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,0$ contendo $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ LFM a A) a $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ (—) primeira e (---) segunda varredura e B) a diferentes velocidades de varredura.

A equação (1) pode ser usada para descrever a corrente para um processo irreversível controlado por difusão,

$$I_{pa}(\text{A}) = 2,99 \times 10^5 n (\alpha_c n')^{1/2} A [R]_{\infty} D_0^{1/2} v^{1/2} \text{ (Equação 1)}$$

em que n é o número de elétrons transferidos no processo de oxidação de LFM ($n = 1$ para $\text{pH} = 7,0$ conforme apresentado na seção – Voltametria de pulso diferencial), α_c é o coeficiente de transferência de carga, n' o número de elétrons na etapa determinante da reação, A é a área do eletrodo em cm^2 , D_0 é o coeficiente de difusão em $\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$,

$[R]_{\infty}$ é a concentração de LFM em mol cm^{-3} , e v é a velocidade de varredura em V s^{-1} [128].

O valor de 0,5 para $\alpha_{cn'}$ foi determinado utilizando a relação $|dE_p/d\lg v| = 29,6/(\alpha_{cn'})$ (mV), em que o gráfico I_{pa} vs. $v^{1/2}$ fornece um coeficiente angular de $5,24 \times 10^{-7} \text{ A} / (\text{V s}^{-1})^{1/2}$.

O coeficiente de difusão de LFM em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0, $D_{\text{LFM}} = 1,00 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, foi calculado pela substituição de $\alpha_{cn'}$ e do coeficiente angular de I_{pa1} vs. $v^{1/2}$ na equação (1), admitindo-se uma área eletroativa do eletrodo de $0,005 \text{ cm}^2$, determinada a partir de $1,0 \text{ mM}$ de ferricianeto de potássio em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0. ($D_0 = 7,35 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$).

- Voltametria de Pulso Diferencial

O efeito do pH sob a oxidação eletroquímica de LFM foi estudado por voltametria de pulso diferencial em soluções tampões numa faixa de pH entre 3,0 a 13,0, contendo $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de LFM, figura 53A. Para valores de pH < 11, o pico de oxidação de LFM 1a é pH dependente e se desloca para valores de potencial menos positivos com o aumento do pH, seguindo uma relação linear de $E_{p,a1} = 1,53 - 0,059 \text{ pH (V)}$, figura 53B. O coeficiente angular da reta obtida mostra um número igual de protons e elétrons envolvidos na reação eletroquímica.

Obtendo-se $W_{1/2} = 104 \text{ mV}$ dos voltamogramas de pulso diferencial que é próximo do valor teórico de $W_{1/2} = 95 \text{ mV}$ para a transferência de 1 elétron, conclui-se que o mecanismo de oxidação de LFM envolve 1 próton e 1 elétron. Para eletrólitos com valores de pH > 11,0, o pico de oxidação 1a é pH independente, Fig. 53B, indicando a

desprotonação do grupo eletroativo da molécula, com $pK_a \sim 11$ em concordância com o encontrado na literatura médica^[135].

Observou-se também que a corrente de pico 1a varia conforme a distribuição da espécie química presente em solução, visto que para o intervalo de $3,0 < pH < 10$, a corrente de pico 1a se manteve constante enquanto a espécie protonada era predominante, figura 45A e 45B. Para o intervalo de $10 < pH < 12$, a molécula de LFM se torna negativamente carregada e a corrente de pico 1a aumenta, o que pode indicar um melhora na transferencia de carga sob a superfície eletródica. Para valores de $pH > 13,0$, a corrente de pico 1a chega a zero e nenhum processo eletroquímico é observado.

Figura 53. (A) Voltamogramas de pulso diferencial em 3D com linha de base corrigida obtidos com eletrodos de carbono vítreo em $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de LFM em diversos pH; e (B) Gráfico de (■) $E_{p,a1}$ e (□) I_p vs. pH

Voltamogramas de pulso diferencial sucessivos foram obtidos em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4 sem se realizar a limpeza da superfície do eletrodo e observou-se o decréscimo das correntes de pico correspondentes ao processo 1a e, nenhum outro

processo eletroquímico foi observado nos voltamogramas subsequentes. em concordância com os resultados obtidos em voltametria cíclica, conclui-se que o produto de oxidação da molécula de LFM não é eletroativo, Figura 54.

Figura 54. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com eletrodos de carbono vítreo com linha de base corrigida em solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4 contendo $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de LFM (—) primeira, (---) segunda e (●●●) terceira varredura

- Voltametria de Onda Quadrada

Voltamogramas de onda quadrada foram obtidos em diversos eletrólitos contendo $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ LFM no intervalo de $3,0 < \text{pH} < 13,0$, e foi observado que apenas um pico foi observado na primeira varredura em $E_{p,a1} = 1,15 \text{ V}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4. Ao se decompor o voltamograma de onda quadrada em suas componentes direta e reversa, observa-se apenas o pico na componente anódica do voltamograma, confirmando a irreversibilidade do processo de oxidação de LFM, figura 55.

Figura 55. Voltamogramas de onda quadrada obtidos com eletrodos de carbono vítreo em solução de tampão fosfato contendo $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ LFM; I_t – corrente total, I_d – corrente direta e I_r – corrente reversa

- Comportamento Eletroquímico de LFM em eletrodos de diamante dopados com boro (EDDB)

A oxidação eletroquímica de LFM foi estudada no intervalo de pH entre 3,0 e 13,0 utilizando voltametria de pulso diferencial em superfícies de DDB com pré tratamento catódico (c-EDDB) e pré tratamento anódico (a-EDDB). Para o eletrodo de diamante dopado com boro com pré tratamento catódico (c-EDDB), o voltamograma de pulso diferencial obtido em solução H_2SO_4 10 mmol L^{-1} pH 2,0 contendo $75,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de LFM não mostrou qualquer processo eletroquímico relacionado a oxidação de LFM, Figura 56A. Além disso, o aumento do pH da solução de eletrólito suporte não promoveu qualquer alteração no perfil voltamétrico observado. Isto pode ser explicado pelas características da superfície doc-EDDB, que devido a alta presença de carbonos sp^3 , dificulta a adsorção da molécula de LFM. A presença do grupo trifluorometila ligado ao

anel aromático promove um efeito de impedimento estérico mais intenso que as fracas interações de London existentes entre a superfície sp^3 do diamante e a estrutura sp^2 do anel aromático, impedindo a adsorção da LFM sob a superfície de diamante.

Como descrito na seção II.3.2, a aplicação de um pré tratamento anódico ao DDB induz à funcionalização de uma superfície mais polar, facilitando a adsorção do fármaco sobre a superfície eletródica. O voltamograma de pulso diferencial obtido com aEDDB em solução de H_2SO_4 10 mmol L^{-1} , pH 2 contendo 75,0 $\mu mol L^{-1}$ de LFM mostrou um pico de oxidação em $E_{p,a1} = + 1,48 V$, Figura 56B. O potencial de pico para este processo é independente do pH e é sobrepujado pela corrente de fundo para eletrólitos com pH acima de 7,0. No que tange a reação química envolvida em EDDB, o mecanismo envolvido neste processo difere do observado em eletrodos de carbono vítreo.

A **B**

Figura 56. Voltamogramas de pulso diferencial em (—) eletrólito suporte e (—) $75,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ LFM em: A) ácido sulfúrico $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ pH = 2,0 com c-EDDB, e B) diferentes pH com a-EDDB.

- Mecanismo de oxidação eletroquímica da LFM

Em eletrodos de carbono vítreo, a oxidação de LFM ocorreu como um processo irreversível e dependente do pH, e em valores de $\text{pH} < 10$, envolveu a transferência de um elétron e um próton, levando a formação de um produto de oxidação não eletroativo.

Já com c-EDDB, cujas propriedades químicas são similares ao EDDB não tratado, o processo de adsorção na superfície do eletrodo é dificultado e, portanto, não há reação eletroquímica envolvendo LFM, sugerindo que o fenômeno de adsorção eletródica sobre a superfície de carbono vítreo é fundamental para que haja transferência de carga. No a-EDDB, observou-se um processo de oxidação justificado pelas terminações mais polares da superfície do eletrodo de diamante dopado com boro.

Estruturalmente, LFM é um anel 4-metil-isoxazólico ligado a um grupamento α,α,α -trifluoro-p-acetotoluidil. Com o objetivo de elucidar o mecanismo de oxidação envolvido, o comportamento eletroquímico de α -TFAT foi investigado em ECVe a-EDDB, Figuras 49A e 49B. Os voltamogramas de pulso diferencial obtidos em $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de α -TFAT mostraram comportamento químico similar ao da com LFM, diferindo apenas em um potencial de pico ligeiramente mais positivo em relação a oxidação da LFM devido a ausência do anel 4-metil-isoxazólico.

Figura57. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em (•••) eletrólito suporte, (---) 75,0 μmol L⁻¹ LFM e (—) 100 μmol L⁻¹ de α-TFAT em solução de de H₂SO₄ , pH 2,0 com (A) ECV e (B) a-EDDB

Portanto, pode-se concluir que a oxidação da LFM ocorre no átomo de nitrogênio do grupamento α,α,α p-trifluorotoluidil formando um derivado de imina N-acetilada pela adição nucleofílica de água na posição para, esquema 14.

Esquema 15. Mecanismo proposto para a oxidação eletroquímica de LFM em ECV

IV – Conclusões

Diante do apresentado, pode-se concluir que 2 métodos utilizados no procedimento de extração de lignina a partir do licor negro fornecem amostras de lignina que diferem estruturalmente entre si e possuem propriedades químicas diferentes que podem ser direcionadas conforme aplicação final do material.

A análise elementar mostra a presença de enxofre na lignina comercial e sugere a existência de um teor natural de enxofre, visto que no processo Alkali aplicado a obtenção da lignina a partir da madeira, não se adiciona Na_2S à mistura reacional. A diferença de percentagem de carbono entre LIGs e as amostras de lignina extraídas sugere uma distribuição monomérica diferente, com predominância de unidades guaiacil em na lignina comercial (LIGs) e unidades siringuil nas ligninas obtidas pelo processo Kraft, confirmada pela espectroscopia vibracional na região do infravermelho.

No que tange a caracterização eletroquímica das ligninas utilizadas, formam-se grupos Q/HQ por um mecanismo composto de duas etapas, uma oxidação eletroquímica e uma etapa química. O filme formado sobre a superfície eletroativa se mostrou estável em uma ampla faixa de pH (2,0 – 8,0) e em uma ampla faixa de potencial, $-1,5 \text{ V} \leq E_{\text{apl}} \leq 0,7 \text{ V}$. Os grupos Q/HQ formados possibilitam a interação do filme de lignina com complexos de metálicos que possam atuar como mediadores de transferência de carga. Os resultados indicam também a espessura do filme como fator relevante para a resposta eletroquímica do eletrodo modificado.

No entanto, a aplicação analítica de derivados de lignina, extraídos do licor negro ou não para o desenvolvimento de eletrodos modificados só é possível se o material for previamente oxidado. O processo de secagem dos eletrodos modificados com lignina oxidada deve ser rigorosamente controlado, podendo ser efetuado por uma noite ou em estufa a 60°C , mas a primeira opção produz melhores resultados. Há ainda a necessidade da utilização de um transdutor metálico, o que indica que a adsorção deve ocorrer via grupos –SH presentes na lignina, enquanto a oxidação prévia do material é necessária para que o mesmo se torne um material condutor. A reação oxidação da lignina (em meio de peróxido de hidrogênio 3% em meio alcalino) foi conduzida de maneira a não romper totalmente a estrutura macromolecular, a fim de se obter condições semelhantes às obtidas com soluções envelhecidas de lignina. Deste modo, a ausência de atividade eletroquímica observada em eletrodos de carbono vítreo modificados com filmes de LIG-oxi está, provavelmente, associada à falta do estabelecimento de uma ligação química entre o filme e o transdutor.

A comparação dos espectros vibracionais da lignina não oxidada e da lignina oxidada mostram diferenças estruturais essenciais que justificam o comportamento distinto do filme de lignina oxidada sob superfície de ouro e sob superfície de carbono

vítreo. O surgimento de uma banda larga em 2530 cm^{-1} correspondente a estiramentos S-H e o aumento significativo de intensidade no espectro vibracional da banda correspondente ao estiramento C-S em 600 cm^{-1} mostram a formação de grupamentos tióis na estrutura da lignina o que promoveriam melhor interação com o ouro segundo a teoria de caráter duro-mole de Pearson. A presença dos estiramentos C-O para fenóis na lignina oxidada sugere ainda que a reação feita não atua completamente nos grupamentos quinona / hidroquinona em que se encontram ainda grupos fenóis capazes de atuar como agentes redutores.

Superfícies de ouro modificadas com filme de lignina já oxidada apresentaram resposta eletroquímica em soluções contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, de peróxido de hidrogênio e de NO_2^- enquanto que a mesma modificação com filme de lignina oxidada realizada sobre superfície de carbono vítreo não produziu eletrodos para aplicações em eletroanálise.

Os resultados obtidos para o eletrodo preparado a partir do compósito AuNp/LIGs-oxi/grafite mostram um processo de oxidação correspondente a oxidação de ouro superficial obtido para AuNp/LIGs-oxi/grafite, processo ausente nos ECP e LIGs-oxi/ECP. As porcentagens de lignina e ouro no compósito foram otimizados utilizando-se $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ como sonda eletroquímica, observando-se parâmetros eletroquímicos relevantes como a diferença de potencial entre os picos de oxidação e de redução, e a relação de proximidade da unidade entre as correntes de pico catódica e anódica encontrando-se 2.5% LIGs-oxi em relação a massa de grafite e 0.2% em massa de ouro em relação a massa do compósito LIGs-oxi/grafite. O eletrodo apresentou atividade catalítica para a oxidação reversível de dopamina, para oxidação do ácido ascórbico com antecipação do potencial de oxidação em 90 mV e permitiu a determinação direta de iodato e nitrito, ainda em regiões positivas de potencial aplicado.

No que tange aos estudos do comportamento eletroquímico de fármacos e estudos de interação in-situ fármaco-DNA, GEM, fármaco amplamente utilizado no tratamento de tumores sólidos, não possui qualquer processo eletroquímico na janela de potencial trabalhada. A interação entre o fármaco e dsDNA promove a condensação e/ou agregação de sua estrutura morfológica, detectadas pela diminuição das correntes de pico de oxidação dos nucleosídeos desoxiadenosina (dAdo) e desoxiguanosina (dGuo) em solução, e um efeito similar quando se trata do sensor eletroquímico de DNA. Há, posteriormente, a clivagem das ligações entre guanina e a estrutura do DNA, liberando a base livre para ser oxidada sobre a superfície eletródica. Isto ocorre devido à interação mais forte entre os átomos de hidrogênio da guanina, envolvidos no pareamento de bases, e os átomos de fluor existentes na ribose da molécula de gemcitabina.

A oxidação da sulfasalazina ocorre no grupo fenol da porção salicílica da molécula produzindo um radical termodinamicamente instável. Este radical é estabilizado pela adição nucleofílica da água ao anel aromático à posição orto, visto que a posição *meta* não é favorecida e a posição *para* se encontra ocupada pelo grupo azo. Isto resulta em um derivado de catecol que é imediatamente oxidado e posteriormente reduzido com a inversão do sentido de varredura. O derivado de catecol sofre uma oxidação reversível envolvendo dois prótons e dois elétrons, picos 2a/2c, com um mecanismo ECE análogo ao observado em fenóis *para*-substituídos.

Em eletrodos de carbono vítreo, a oxidação de leflunomida é um processo irreversível e dependente do pH. Em valores de pH < 10, o mecanismo envolve a transferência de um elétron e um próton levando a formação de um produto de oxidação não eletroativo. Já em c-EDDB, cujas propriedades químicas são similares ao EDDB não tratado, o processo de adsorção à superfície do eletrodo é negligenciável e, portanto, não há reação eletroquímica envolvendo LFM, sugerindo que o fenômeno de adsorção

sobre a superfície de carbono vítreo é fundamental para que haja a reação de transferência de carga. Em a-EDDB, um processo de oxidação independente do pH foi observado e atribuído a uma melhor interação do fármaco com a superfície eletródica, devido as terminações de oxigênio formadas durante a etapa de pré-tratamento eletroquímico.

Referências

1. PAPER TASK FORCE (Estados Unidos da América). Duke University. Environmental Comparison of Bleached Kraft Pulp Manufacturing Technologies. 1995. Disponível em: <https://s3.amazonaws.com/EPNPaperCalc/documents/1626_WP5.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2014.
2. SJÖSTRÖM, Eric. **Wood Chemistry: Fundamentals and Applications**. Estados Unidos da América: Academic Press, 1993.
3. HON, David N. S.; SHIRAISHI, Nobuo. **Wood and Cellulosic Chemistry**. 2. ed. Estados Unidos da América: Marcel Dekker, 2001.
4. INDUSTRIAL EFFICIENCY TECHNOLOGY DATABASE (Org.). Pulp and Paper. Disponível em: <<http://ietd.iipnetwork.org/content/pulp-and-paper>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
5. MOHAN, Dinesh; PITTMAN JUNIOR, Charles U.; STEELE, Philip H.. Pyrolysis of Wood/Biomass for Bio-oil: A Critical Review. **Energy Fuels**, Estados Unidos da América, v. 20, n. 3, p.848-889, mar. 2006
6. SARKANEN, K. V.; LUDWIG, Charles Heberle. Lignins : occurrence, formation, structure and reactions. New York: Wiley-interscience, 1971. 916 p
7. HAYASHI, Jun'ichi et al. Preparation of activated carbon from lignin by chemical activation. **Carbon**, EUA, v. 38, n. 13, p.1873-1878, jan. 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008622300000270>>. Acesso em: 10 dez. 2014
8. KADLA, J.f. et al. Lignin-based carbon fibers for composite fiber applications. **Carbon**, EUA, v. 40, n. 15, p.2913-2920, jul. 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008622302002488>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
9. NADJI, H. et al. Value-added derivatives of soda lignin from alfa grass (*Stipa tenacissima*). I. Modification and characterization. **Journal Of Applied Polymer**, EUA, v. 115, n. 3, p.1546-1554, out. 2009. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/app.31141/abstract>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
10. LISPERGUER, Justo; PEREZ, Patricio; URIZAR, Silvio. Structure And Thermal Properties Of Lignins: Characterization By Infrared Spectroscopy And Differential Scanning Calorimetry. **Journal Of The Chilean Chemical Society**, [s. l.], v. 54, n. 4, p.460-463, out. 2009. Disponível em: <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-97072009000400030>. Acesso em: 10 dez. 2014.

11. GARCIA, A. et al. Characterization of lignins obtained by selective precipitation. **Separation And Purification Technology**, [s. l.], v. 68, n. 2, p.193-198, ago. 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586609002068>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
12. BRODIN, Ida. **CHEMICAL PROPERTIES AND THERMAL BEHAVIOUR OF KRAFT LIGNINS**. 2009. 57 f. Monografia (Especialização) - Curso de Engenharia Química, Kth Royal Institute Of Technology, Stockholm, Swedem, 2009. Disponível em: <<http://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:234300/FULLTEXT01.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2014
13. TOLEDANO, A. et al. Comparative study of lignin fractionation by ultrafiltration and selective precipitation. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 15, n. 1, p.93-99, fev. 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1385894709007499>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
14. GHATAK, Himadri Roy; KUNDU, P.p.; KUMAR, Satish. Thermochemical comparison of lignin separated by electrolysis and acid precipitation from soda black liquor of agricultural residues. **Thermochimica Acta**, [s. l.], v. 502, n. 1-2, p.85-89, abr. 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040603110000730>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
15. TEJADO, A. et al. Physico-chemical characterization of lignins from different sources for use in phenol–formaldehyde resin synthesis. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 98, n. 8, p.1655-1663, maio 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852406002513>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
16. SUHAS, P.j.m. Carrott; CARROTT, M.m.l. Ribeiro. Lignin – from natural adsorbent to activated carbon: A review. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 98, n. 12, p.2301-2312, set. 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852406004056>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
17. BOERIU, Carmen G. et al. Characterisation of structure-dependent functional properties of lignin with infrared spectroscopy. **Industrial Crops And Products**, [s. l.], v. 20, n. 2, p.205-218, set. 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669004000731>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
18. SHEN, Dekui et al. Online evolved gas analysis by Thermogravimetric-Mass Spectroscopy for thermal decomposition of biomass and its components under different atmospheres: Part I. Lignin. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 130, p.449-456, fev. 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852412017762>>. Acesso em: 10 dez. 2014.

19. LIU, Qian et al. Mechanism study of wood lignin pyrolysis by using TG–FTIR analysis. **Journal Of Analytical And Applied Pyrolysis**, [s. l.], v. 82, n. 1, p.170-177, maio 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165237008000351>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
20. BENÍTEZ-GUERRERO, Mónica et al. Comparison of thermal behavior of natural and hot-washed sisal fibers based on their main components: Cellulose, xylan and lignin. TG-FTIR analysis of volatile products. **Thermochimica Acta**, [s. l.], v. 581, n. [], p.70-86, abr. 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040603114000550>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
21. FERNANDES, D. M.; HECHENLEITNER, A. A. Winkler; PINEDA, E. A. Gómez. Kinetic study of the thermal decomposition of poly(vinyl alcohol)/kraft lignin derivative blends. **Thermochimica Acta**, [s. l.], v. 44, n. 1, p.101-109, fev. 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040603105005459>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
22. BREBU, Mihai; TAMMINEN, Tarja; SPIRIDON, Iuliana. Thermal degradation of various lignins by TG-MS/FTIR and Py-GC-MS. **Journal Of Analytical And Applied Pyrolysis**, [s. l.], v. 104, p.531-539, nov. 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165237013001186>>. Acesso em: 10 dez. 2014
23. ZHOU, Hui et al. The pyrolysis simulation of five biomass species by hemi-cellulose, cellulose and lignin based on thermogravimetric curves. **Thermochimica Acta**, [s. l.], v. 566, n. [], p.36-43, ago. 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040603113002669>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
24. CAO, Jun et al. Study on carbonization of lignin by TG-FTIR and high-temperature carbonization reactor. **Fuel Processing Technology**, [s. l.], v. 106, n. [], p.41-47, fev. 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378382012002287>>. Acesso em: 10 dez. 2014..
25. SANTOS, Patrícia S.b. dos et al. Characterisation of Kraft lignin separated by gradient acid precipitation. **Industrial Crops And Products**, [s. l.], v. 55, n. [], p.149-154, abr. 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669014000302>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
26. BURANOV, Anvar U.; MAZZA, G..Lignin in straw of herbaceous crops. **Industrial Crops And Products**, [s. l.], v. 28, n. 3, p.237-259, nov. 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669008000630>>. Acesso em: 10 dez. 2014.

27. BRASIL. Ministério da Saúde. Governo Federal. **PORTARIA N. 518**. 2004. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/agua/legislacao/federal/port-518-25032004.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
28. MERDY, Patricia et al. Copper sorption on a straw lignin: experiments and EPR characterization. **Journal Colloid Interface Science**, [s. l.], v. 245, n. 1, p.24-31, jan. 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002197970197972X>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
29. ACEMIOGLU, B. et al. Copper(II) removal from aqueous solution by organosolv lignin and its recovery. **Journal Of Applied Polymer Science**, [s. l.], v. 89, n. 6, p.1537-1541, ago. 2003. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/app.12251/abstract>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
30. SCIBAN, Marina; KLASNJA, Mile. Study of the Adsorption of Copper(II) Ions from Water onto Wood Sawdust, Pulp and Lignin. **Adsorption Science & Technology**, [s. l.], v. 22, n. 3, p.195-206, abr. 2004. Disponível em: <<http://multi-science.metapress.com/content/r725728681214471/>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
31. DIZHBITE, Tatiana et al. Lignin — a useful bioresource for the production of sorption-active materials. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 67, n. 3, p.221-228, mar. 1999. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852498800047>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
32. SCIBAN, Marina B.; KLASNJA, Mile T.; ANTOV, Mirjana G..Study of the biosorption of different heavy metal ions onto Kraft lignin. **Ecological Engineering**, [s. l.], v. 37, n. 12, p.2092-2095, dez. 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925857411002692>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
33. DEMIRBAS, Ayhan. Adsorption of lead and cadmium ions in aqueous solutions onto modified lignin from alkali glycerol delignification. **Journal Of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 109, n. 1-3, p.221-226, jun. 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389404001906>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
34. GUO, Xueyan; ZHAN, Shuzhen; SHAN, Xiao-quan. Adsorption of metal ions on lignin. **Journal Of Hazardous Materials**, [s. l.], v. 151, n. 1, p.134-142, fev. 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389407007790>>. Acesso em: 10 dez. 2014.

35. MOHAN, Dinesh; PITTMAN JUNIOR, Charles U.; STEELE, Philip H.. Single, binary and multi-component adsorption of copper and cadmium from aqueous solutions on Kraft lignin—a biosorbent. **Journal Of Colloid And Interface Science**, [s. l.], v. 297, n. 2, p.489-504, maio 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021979705012002>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
36. HOJAJI, Elahe. Investigation of trace metal binding properties of lignin by diffusive gradients in thin films. **Chemosphere**, [s. l.], v. 89, n. 3, p.319-326, set. 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653512005553>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
37. WU, Yun et al. Adsorption of chromium(III) on lignin. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 99, n. 16, p.7709-7715, nov. 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852408001077>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
38. CLAYDEN, Jonathan; GREAVES, Nick; WARREN, Stuart. **Organic Chemistry**. Oxford, Inglaterra: Oxford University, 2012. 1234 p.
39. PEARSON, Ralph G.. Hard and Soft Acids and Bases. **Journal Of The American Chemical Society**, [s. l.], v. 85, n. 22, p.3533-3539, jun. 1963. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ja00905a001>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
40. GONZALEZ-SERRANO, E. et al. Removal of water pollutants with activated carbons prepared from H₃PO₄ activation of lignin from kraft black liquors. **Water Research**, [s. l.], v. 38, n. 13, p.3043-3050, jul. 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135404002167>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
41. FIERRO, V.; TORNÉ-FERNÁNDEZ, V.; CELZARD, A.. Kraft lignin as a precursor for microporous activated carbons prepared by impregnation with ortho-phosphoric acid: Synthesis and textural characterisation. **Microporous And Mesoporous Materials**, [s. l.], v. 92, n. 1-3, p.243-250, jun. 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1387181106000278>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
42. MUSSATTO, Solange I. et al. Production, characterization and application of activated carbon from brewer's spent grain lignin. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 101, n. 7, p.2450-2457, abr. 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852409015296>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
43. HAYASHI, Jun'ichi et al. Preparation of activated carbon from lignin by chemical activation. **Carbon**, [s. l.], v. 38, n. 13, p.1873-1878, jun. 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008622300000270>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
44. GONZALEZ-SERRANO, E. et al. Development of Porosity upon Chemical Activation of Kraft Lignin with ZnCl₂. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, [s. l.], v. 36, n. 11, p.4832-4838, nov. 1997. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ie970261q>>. Acesso em: 10 dez. 2014.

45. ZOU, Yong; HAN, Bu-xing. Preparation of Activated Carbons from Chinese Coal and Hydrolysis Lignin. **Adsorption Science & Technology**, [s. l.], v. 19, n. 1, p.59-72, fev. 2001. Disponível em: <<http://multi-science.metapress.com/content/r3188t1t82483677/>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
46. GAO, Yuan et al. Preparation of high surface area-activated carbon from lignin of papermaking black liquor by KOH activation for Ni(II) adsorption. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 217, n. [], p.345-353, fev. 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1385894712012272>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
47. RODRIGUEZ-MIRASOL, J.; CORDERO, T.; RODRIGUEZ, J. J..Activated carbons from CO2 partial gasification of eucalyptus kraft lignin. **Energy Fuels**, [s. l.], v. 7, n. 1, p.133-138, jan. 1993. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ef00037a021?journalCode=enfuem>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
48. BAKLANOVA, O. N. et al. Preparation of microporous sorbents from cedar nutshells and hydrolytic lignin. **Carbon**, [s. l.], v. 41, n. 9, p.1793-1800, 2003. [Http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008622303001490](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008622303001490). Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008622303001490>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
49. DONG, Chengjian et al. Mechanism on microwave-assisted acidic solvolysis of black-liquor lignin. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 162, n. [], p.136-141, June 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852414003654>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
50. LU, Yao et al. Characterization of a bio-oil from pyrolysis of rice husk by detailed compositional analysis and structural investigation of lignin. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 116, n. [], p.114-119, jul. 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852412006086>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
51. BAI, Xianglan et al. Formation of phenolic oligomers during fast pyrolysis of lignin. **Fuel**, [s. l.], v. 128, n. [], p.170-179, jul. 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016236114002543>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
52. NAIK, Prashantha; ROZMAN, Hj Din; BHAT, Rajeev. Genoprotective effects of lignin isolated from oil palm black liquor waste. **Environmental Toxicology And Pharmacology**, [s. l.], v. 36, n. 1, p.135-141, jul. 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1382668913000537>>. Acesso em: 10 dez. 2014.

53. IBRAHIM, Mohamad Nasir Mohamad et al. Chemical and thermal properties of lignins from oil palm biomass as a substitute for phenol in a phenol formaldehyde resin production. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 86, n. 1, p.112-119, ago. 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861711002724>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
54. NARAPAKDEESAKU, Danupong; SRIDACH, Waranyou; WITTAYA, Thawien. Novel use of oil palm empty fruit bunch's lignin derivatives for production of linerboard coating. **Progress In Organic Coatings**, [s. l.], v. 76, n. 7-8, p.999-1005, ago. 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300944013000398>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
55. WAN, Shurong et al. Multi-step separation of monophenols and pyrolytic lignins from the water-insoluble phase of bio-oil. **Separation And Purification Technology**, [s. l.], v. 122, p.248-255, fev. 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586613006618>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
56. FU, Dongbao et al. Extraction of phenols from lignin microwave-pyrolysis oil using a switchable hydrophilicity solvent. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 154, p.101-108, fev. 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852413018178>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
57. KARAGÖZ, Selhan et al. Comparative studies of oil compositions produced from sawdust, rice husk, lignin and cellulose by hydrothermal treatment. **Fuel**, [s. l.], v. 84, n. 7-8, p.875-884, maio 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016236105000220>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
58. SCHOLZE, B.; MEIER, D.. Characterization of the water-insoluble fraction from pyrolysis oil (pyrolytic lignin). Part I. PY–GC/MS, FTIR. **Journal Of Analytical And Applied Pyrolysis**, [s. l.], v. 60, n. 1, p.41-54, jun. 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165237000001108>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
59. GOOTY, Akhil Tumbalam et al. Kraft-lignin pyrolysis and fractional condensation of its bio-oil vapors. **Journal Of Analytical And Applied Pyrolysis**, [s. l.], v. 106, p.33-40, mar. 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165237013002714>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
60. CHAUHAN, Monika et al. Effect of functionalized lignin on the properties of lignin–isocyanate prepolymer blends and composites. **European Polymer Journal**, [s. l.], v. 52, p.32-43, mar. 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014305713005909>>. Acesso em: 10 dez. 2014.

61. HILBURG, Shayna L. et al. A universal route towards thermoplastic lignin composites with improved mechanical properties. **Polymer**, [s. l.], v. 55, n. 4, p.995-1003, fev. 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032386113011890>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
62. KONG, Xianzhi et al. Study on polyblending epoxy resin adhesive with lignin I-curing temperature. **International Journal Of Adhesion And Adhesives**, [s. l.], v. 48, p.75-79, 2014. Disponível em: <<http://yadda.icm.edu.pl/yadda/element/bwmeta1.element.elsevier-0f77cf2c-2d63-3b9c-8c9e-7953e8cb4609>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
63. SILVA, E.a. Borges da et al. An integrated process to produce vanillin and lignin-based polyurethanes from Kraft lignin. **Chemical Engineering Research And Design**, [s. l.], v. 87, n. 9, p.1276-1292, set. 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0263876209001798>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
64. SASAKI, Chizuru et al. Evaluation of epoxy resins synthesized from steam-exploded bamboo lignin. **Industrial Crops And Products**, [s. l.], v. 43, p.757-761, maio 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669012004888>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
65. CHENG, Shuna et al. Highly efficient de-polymerization of organosolv lignin using a catalytic hydrothermal process and production of phenolic resins/adhesives with the depolymerized lignin as a substitute for phenol at a high substitution ratio. **Industrial Crops And Products**, [s. l.], v. 44, p.315-332, jan. 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669012005961>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
66. SUN, Gang et al. Comparative study on the curing kinetics and mechanism of a lignin-based-epoxy/anhydride resin system. **Polymer**, [s. l.], v. 48, n. 1, p.330-337, jan. 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032386106012201>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
67. HUO, Shu-ping et al. Curing kinetics of lignin and cardanol based novolac epoxy resin with methy tetrahydrophthalic anhydride. **Thermochimica Acta**, [s. l.], v. 587, p.18-23, jul. 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040603114000987>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
68. MILCZAREK, Grzegorz. Preparation and Characterization of a Lignin Modified Electrode,. **Electroanalysis**, [s. l.], v. 19, n. 13, p.1411-1414, jul. 2007. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/elan.200703870/abstract>>. Acesso em: 10 dez. 2014.

69. ENACHE, Teodor Adrian; OLIVEIRA-BRETT, Ana Maria. Phenol and para-substituted phenols electrochemical oxidation pathways. **Journal Of Electroanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 665, n. 1, p.9-16, maio 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1572665711001056>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
70. MILCZAREK, Grzegorz. Lignosulfonate-Modified Electrode for Electrocatalytic Reduction of Acidic Nitrite. **Electroanalysis**, [s. l.], v. 20, n. 2, p.211-214, jan. 2008. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/elan.200704071/abstract>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
71. MILCZAREK, Grzegorz. Preparation, characterization and electrocatalytic properties of an iodine/lignin-modified gold electrode. **Electrochimica Acta**, [s. l.], v. 54, n. 11, p.3199-3205, abr. 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013468608013224>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
72. MILCZAREK, Grzegorz. Lignosulfonate-Modified Electrodes: Electrochemical Properties and Electrocatalysis of NADH Oxidation. **Langmuir**, [s. l.], v. 25, n. 17, p.10345-10353, maio 2009. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la9008575>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
73. CISZEWSKI, Aleksander et al. Nickel (II) lignosulfonate as precursor for the deposition of nickel hydroxide nanoparticles on a glassy carbon electrode for oxidative electrocatalysis. **Electrochimica Acta**, [s. l.], v. 134, p.355-362, jul. 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013468614009323>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
74. SAENGER, Wolfram. **Principles of Nucleic Acid Structure**. New York: Springer-verlag, 1984.
75. ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell**. 4. ed. New York And London: Garland Science, 2002.
76. BUTLER, John M.. **Forensic DNA Typing**. 2. ed. New York: Academic Press, 2005. 688 p.
77. WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C.. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. **Nature**, [s. l.], v. 171, p.737-738, 1953. Disponível em: <<http://www.nature.com/nature/dna50/watsoncrick.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2014
78. GHOSH, A.; BANSAL, M.. A glossary of DNA structures from A to Z. **Acta Crystallographica Section D**, [s. l.], v. 59, n. 4, p.620-626, abr. 2003. Disponível em: <<http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S0907444903003251>>. Acesso em: 10 dez. 2014.

79. BASU, Hirak S. et al. Recognition of Z-RNA and Z-DNA Determinants by Polyamines in Solution: Experimental and Theoretical Studies. **Journal Of Biomolecular Structure And Dynamics**, [s. l.], v. 6, n. 2, p.299-309, 1988. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07391102.1988.10507714?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub=pubmed&#.Vlhv_ivF_ko>. Acesso em: 10 dez. 2014.
80. PALEČEK, Emil; DOSKOČIL, Jiří. Pulse-Polarographic Analysis of Double-Stranded RNA. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 60, n. 2, p.518-530, ago. 1974. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269774902620>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
81. BRABEC, Viktor; PALEČEK, Emil. Interaction of Nucleic Acids With Electrically Charged Surfaces II. Conformational Changes In Double-Helical Polynucleotides. **Biophysical Chemistry**, [s. l.], v. 4, n. 1, p.79-92, jan. 1976. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0301462276800099>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
82. PALEČEK, Emil et al. Electrochemical biosensors for DNA hybridization and DNA damage. **Biosensors And Bioelectronics**, [s. l.], v. 13, n. 6, p.621-628, set. 1998. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566398000177>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
83. WANG, J. et al. DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring. A review. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 347, n. 1-2, p.1-8, jul. 1997. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267096005983>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
84. OLIVEIRA-BRETT, A. M. et al. Voltammetric determination of all DNA nucleotides. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 332, n. 2, p.321-329, set. 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269704005378>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
85. BRETT, Christopher M. A.; OLIVEIRA-BRETT, Ana Maria; SERRANO, Silvia H. P.. On the adsorption and electrochemical oxidation of DNA at glassy carbon electrodes. **Journal Of Electroanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 366, p.225-231, 1994. Disponível em: <http://www1.ci.uc.pt/pessoal/chrisbrett/docs/17_JEAC.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2014.
86. BRETT, Ana Maria Oliveira. Electrochemistry for Probing DNA Damage. In: GRIMES, C. A.; DICKEY, E. C.; PISHKO, M. V. (Ed.). **Encyclopedia of Sensors**. University Park, PA: American Scientific Publishers, 2006. Cap. 1. p. 1-14. (Volume X). Disponível em: <<http://www.aspbs.com/eos/>>. Acesso em: 10 dez. 2014.

87. PEDANO, Maria L.; RIVAS, Gustavo A.. Adsorption and electrooxidation of nucleic acids at carbon nanotubes paste electrodes. **Electrochemistry Communications**, [s. l.], v. 6, n. 1, p.10-16, jan. 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1388248103002844#>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
88. OLIVEIRA-BRETT, A.m; DICULESCU, V; PIEDADE, J.a.p. Electrochemical oxidation mechanism of guanine and adenine using a glassy carbon microelectrode. **Bioelectrochemistry**, [s. l.], v. 55, n. 1-2, p.61-62, jan. 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567539401001475>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
89. DICULESCU, Victor Constantin; PAQUIM, Ana-maria Chiorcea; BRETT, Ana Maria Oliveira. Electrochemical DNA Sensors for Detection of DNA Damage. **Sensors**, [s. l.], v. 5, n. 6, p.377-393, 2005. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1424-8220/5/6/377>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
90. CHIORCEA-PAQUIM, A.-m. et al. Electrochemical and AFM evaluation of hazard compounds–DNA interaction. **Electrochimica Acta**, [s. l.], v. 54, n. 7, p.1978-1985, fev. 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013468608008980>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
91. OLIVEIRA-BRETT, A.m et al. Electrochemical detection of in situ adriamycin oxidative damage to DNA. **Talanta**, [s. l.], v. 56, n. 5, p.959-970, abr. 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914001006567>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
92. ABREU, F. C; GOULART, M. O. F; BRETT, A. M. Oliveira. Detection of the damage caused to DNA by niclosamide using an electrochemical DNA-biosensor. **Biosensors And Bioelectronics**, [s. l.], v. 17, n. 11-12, p.913-919, dez. 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566302000829>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
93. OLIVEIRA, S. Carlos B.; OLIVEIRA-BRETT, Ana Maria. In Situ DNA Oxidative Damage by Electrochemically Generated Hydroxyl Free Radicals on a Boron-Doped Diamond Electrode. **Langmuir**, [s. l.], v. 26, n. 10, p.4896-4901, fev. 2012. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la300070x>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
94. BRETT, Ana Maria Oliveira; CHIORCEA, Ana-maria. Research Article Previous Article Next Article Table of Contents Atomic Force Microscopy of DNA Immobilized onto a Highly Oriented Pyrolytic Graphite Electrode Surface. **Langmuir**, [s. l.], v. 19, n. 9, p.3830-3839, mar. 2003. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la027047d>>. Acesso em: 10 dez. 2014.

95. OLIVEIRA, S. C .b. et al. In situ electrochemical and AFM study of thalidomide–DNA interaction. **Bioelectrochemistry**, [s. l.], v. 76, n. 1-2, p.201-207, set. 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567539409000632>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
96. OLIVEIRA-BRETT, Ana Maria; DICULESCU, Victor C. Electrochemical study of quercetin–DNA interactions Part II. In situ sensing with DNA biosensors. **Bioelectrochemistry**, [s. l.], v. 64, n. 2, p.143-150, set. 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567539404001823>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
97. BRETT, Ana Maria Oliveira et al. Electrochemical Determination of Carboplatin in Serum Using a DNA Modified Glassy Carbon Electrode. **Electroanalysis**, [s. l.], v. 8, n. 11, p.992-995, nov. 1996. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/elan.1140081104/abstract>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
98. CHIORCEA, Ana-maria; BRETT, Ana Maria Oliveira. Atomic force microscopy characterization of an electrochemical DNA-biosensor. **Bioelectrochemistry**, [s. l.], v. 63, n. 1-2, p.229-232, jun. 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567539404000398>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
99. BRETT, Ana Maria Oliveira; PAQUIM, Ana-maria Chiorcea. DNA imaged on a HOPG electrode surface by AFM with controlled potential. **Bioelectrochemistry**, [s. l.], v. 66, n. 1-2, p.117-124, abr. 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567539404002191>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
100. PONTINHA, Ana Dora Rodrigues et al. In situ evaluation of anticancer drug methotrexate–DNA interaction using a DNA-electrochemical biosensor and AFM characterization. **Physical Chemistry Chemical Physics**, [s. l.], v. 13, p.5227-5234, 2011. Disponível em: <<http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2011/CP/c0cp02377a#!divAbstract>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
101. PONTINHA, A. Dora R. et al. Anodic Oxidation of Cladribine and In Situ Evaluation of DNA-Cladribine Interaction. **Electroanalysis**, [s. l.], v. 23, n. 11, p.2651-2657, nov. 2011. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/elan.201100320/abstract>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
102. SATANA, H. Eda; OLIVEIRA-BRETT, Ana Maria. In Situ Evaluation of Fludarabine-DNA Interaction Using a DNA-Electrochemical Biosensor. **International Journal Of Electrochemistry**, [s. l.], v. 2011, p.1-8, 2011. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ijelc/2011/340239/>>. Acesso em: 10 dez. 2014.

103. SATANA, H. Eda et al. Nucleoside analogue electrochemical behaviour and in situ evaluation of DNA–clofarabine interaction. **Bioelectrochemistry**, [s. l.], v. 87, p.3-8, out. 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567539411000910>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
104. GALMARINI, Carlos M.; MACKEY, John R.; DUMONTET, Charles. Nucleoside analogues and nucleobases in cancer treatment. **The Lancet Oncology**, [s. l.], v. 3, n. 7, p.415-424, jul. 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S147020450200788X>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
105. CARMICHAEL, J.; WALLING, J.. Advanced breast cancer: investigational role of gemcitabine. **European Journal Of Cancer**, [s. l.], v. 33, n. 1, p.27-30, jan. 1997. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959804996003929>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
106. SHELLEY, Michael D. et al. Gemcitabine chemotherapy for the treatment of metastatic bladder carcinoma. **Bju International**, [s. l.], v. 108, n. 2, p.168-179, jul. 2011. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1464-410X.2011.10341.x/abstract>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
107. WALTER, Thomas et al. Feasibility and benefits of second-line chemotherapy in advanced biliary tract cancer: A large retrospective study. **European Journal Of Cancer**, [s. l.], v. 49, n. 2, p.329-335, jan. 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959804912006284>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
108. ZIMMERMANN, Adriana Fontes. Tratamento da Artrite Reumatóide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, [s. l.], v. 44, n. 5, p.371-376, out. 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbr/v44n5/a10v44n5.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
109. MAJITHIA, Vikas; GERACI, Stephen A.. Rheumatoid Arthritis: Diagnosis and Management. **The American Journal Of Medicine**, [s. l.], v. 120, n. 11, p.936-939, nov. 2007. Disponível em: <[http://www.amjmed.com/article/S0002-9343\(07\)00361-0/abstract](http://www.amjmed.com/article/S0002-9343(07)00361-0/abstract)>. Acesso em: 10 dez. 2014.
110. BOISSIER, Marie-christophe et al. Rheumatoid arthritis: From autoimmunity to synovitis and joint destruction. **Journal Of Autoimmunity**, [s. l.], v. 39, n. 3, p.222-228, set. 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896841112000881>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
111. LAWRENCE, Reva C. et al. Estimates of the Prevalence of Arthritis and Other Rheumatic Conditions in the United States, Part II. **Arthritis Rheumatoid**, [s. l.], v. 58, n. 1, p.26-35, jan. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3266664/>>. Acesso em: 10 dez. 2014.

112. DONAHUE, K. E. et al. Systematic review: comparative effectiveness and harms of disease-modifying medications for rheumatoid arthritis. **Annals Internal Medicine**, [s. l.], v. 148, n. 2, p.123-134, nov. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18025440>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
113. MANDIĆ, Zoran; NIGOVIĆ, Biljana; HMUNIĆ, Branimir. The mechanism and kinetics of the electrochemical cleavage of azo bond of 2-hydroxy-5-sulfophenyl-azo-benzoic acids. **Electrochimica Acta**, [s. l.], v. 49, n. 4, p.607-615, fev. 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001346860300731X>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
114. ERIKSSON, Alf; NYHOLM, Leif. Coulometric and spectroscopic investigations of the oxidation and reduction of some azosalicic acids at glassy carbon electrodes. **Electrochimica Acta**, [s. l.], v. 46, n. 8, p.1113-1129, jan. 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013468600006903>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
115. ERIKSSON, Alf; NYHOLM, Leif. A comparison of the electrochemical properties of some azosalicic acids at glassy carbon electrodes by cyclic and hydrodynamic voltammetry. **Electrochimica Acta**, [s. l.], v. 44, n. 23, p.4029-4040, jul. 1999. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001346869900170X>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
116. GOLDENBERG, Marvin M.. Leflunomide, a novel immunomodulator for the treatment of active rheumatoid arthritis. **Clinical Therapeutics**, [s. l.], v. 21, n. 11, p.1937-1852, nov. 1999. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149291800867326>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
117. BERTOLINI, Giorgio et al. A New Rational Hypothesis for the Pharmacophore of the Active Metabolite of Leflunomide, a Potent Immunosuppressive Drug. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 40, n. 13, p.2011-2016, jun. 1997. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm970039n>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
118. ROZMAN, Blaž. Clinical Pharmacokinetics of Leflunomide. **Clinical Pharmacokinetics**, [s. l.], v. 41, n. 6, p.421-430, maio 2002. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.2165/00003088-200241060-00003>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
119. UNITED STATES OF AMERICA. FEDERAL DRUG AGENCY - FDA. . **Clinical pharmacology/biopharmaceutics review**. [s. l.]: [s. l.], 1998. 56 p. Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/98/20905_ARAVA_BIOPHARMR.PDF>. Acesso em: 10 dez. 2014.

120. WEINBLATT, M. E. et al. Pharmacokinetics, safety, and efficacy of combination treatment with methotrexate and leflunomide in. **Arthritis Rheumatoid**, [s. l.], v. 42, n. 7, p.1322-1328, jul. 1999. Disponível em: <[http://onlinelibrary.wiley.com/resolve/doi?DOI=10.1002/1529-131\(199907\)42:73.0.>](http://onlinelibrary.wiley.com/resolve/doi?DOI=10.1002/1529-131(199907)42:73.0.>). Acesso em: 10 dez. 2014.
121. SANOFI-AVENTIS CANADA INC. (Canada). **Pr ARAVA**. Laval, Quebec: [s. l.], 2012. 66 p. Disponível em: <<http://products.sanofi.ca/en/arava.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
122. LUND, H.; HAMMERICH, O.. **Organic Electrochemistry**. 4. ed. New York: Marcel Dekker, 2000. 1416 p.
123. XIANG, Qian; LEE, Y. Y.. Oxidative cracking of precipitated hardwood lignin by hydrogen peroxide. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, [s. l.], v. 84-86, n. 1-9, p.153-162, mar. 2000. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1385/ABAB:84-86:1-9:153>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
124. MAZIERO, Priscila et al. Structural features of lignin obtained at different alkaline oxidation conditions from sugarcane bagasse. **Industrial Crops And Products**, [s. l.], v. 35, n. 1, p.61-69, jan. 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669011002020>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
125. MANCERA, A. et al. Physicochemical characterisation of sugar cane bagasse lignin oxidized by hydrogen peroxide. **Polymer Degradation And Stability**, [s. l.], v. 95, n. 4, p.470-476, abr. 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141391010000224>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
126. SIRAJUDDIN et al. The formation of gold nanoparticles using hydroquinone as a reducing agent through a localized pH change upon addition of NaOH to a solution of HAuCl₄. **Colloids And Surfaces A: Physicochemical And Engineering Aspects**, [s. l.], v. 370, n. 1-3, p.35-41, nov. 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927775710004772>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
127. KIM, Jongho; KANG, Sang Wook; KANG, Yong Soo. Partially positively charged silver nanoparticles prepared by p-benzoquinone. **Colloids And Surfaces A: Physicochemical And Engineering Aspects**, [s. l.], v. 320, n. 1-3, p.189-192, maio 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927775708000976>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
128. LEE, Yuhan; PARK, Tae Gwan. Facile Fabrication of Branched Gold Nanoparticles by Reductive Hydroxyphenol Derivatives. **Langmuir**, [s. l.], v. 27, n. 6, p.2965-2971, fev. 2011. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la1044078>>. Acesso em: 10 dez. 2014.

129. HU, Guangzhi; GUO, Yong; SHAO, Shijun. Simultaneous Determination of Dopamine and Ascorbic Acid Using the Nano-Gold Self-Assembled Glassy Carbon Electrode. **Electroanalysis**, [s. l.], v. 21, n. 10, p.1200-1206, maio 2009. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/elan.200804510/abstract>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
130. HUANG, Jianshe et al. Simultaneous electrochemical determination of dopamine, uric acid and ascorbic acid using palladium nanoparticle-loaded carbon nanofibers modified electrode. **Biosensors And Bioelectronics**, [s. l.], v. 24, n. 4, p.632-637, dez. 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566308002704>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
131. BRETT, C. M. A.; OLIVEIRA-BRETT, A. M.. **Electrochemistry – Principles, Methods, and Applications**. 2. ed. Oxford, Inglaterra: Oxford University Press, 1993.
132. PAVIA, D. M.; LAMPMAN, G. L.; KRITZ, G. S.. **Introduction to Spectroscopy**. 3. ed. London: Thomson Learning, 2001.
133. NIGOVIĆ, Biljana; HIMUNIĆ, Branimir; HOCEVAR, Samo. Voltammetric measurements of aminosalicylate drugs using bismuth film electrode. **Electrochimica Acta**, [s. l.], v. 54, n. 24, p.5678-5683, out. 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013468609006446>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
134. NIGOVIĆ, Biljana; HOCEVAR, Samo B.. Antimony film electrode for direct cathodic measurement of sulfasalazine. **Electrochimica Acta**, [s. l.], v. 58, p.523-527, dez. 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013468611014897>>. Acesso em: 10 dez. 2014.
135. RAJABI, Hamid Reza; ROUSHANI, Mahmoud; SHAMSIPUR, Mojtaba. Development of a highly selective voltammetric sensor for nanomolar detection of mercury ions using glassy carbon electrode modified with a novel ion imprinted polymeric nanobeads and multi-wall carbon nanotubes. **Journal Of Electroanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 693, p.16-22, mar. 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1572665713000064>>. Acesso em: 10 dez. 2014.