

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS – DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Davi Marques de Farias

**Desenvolvimento de métodos eletroanalíticos para a determinação de levofloxacina em
formulação farmacêutica e urina utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com
óxido de grafeno reduzido e nanotubos de carbono**

Juiz de Fora

2021

Davi Marques de Farias

**Desenvolvimento de métodos eletroanalíticos para a determinação de levofloxacin em
formulação farmacêutica e urina utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com
óxido de grafeno reduzido e nanotubos de carbono**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Química da Universidade Federal
de Juiz de Fora como requisito
parcial a obtenção do grau de
Mestre em Química

Orientador: Prof. Dra. Maria Auxiliadora Costa Matos (UFJF)

Co-orientador: Prof. Dr. Renato Camargo Matos (UFJF)

Juiz de Fora

2021

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF,

com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Farias, Davi Marques de.

Desenvolvimento de métodos eletroanalíticos para a determinação de levofloxacina em formulação farmacêutica e urina utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno reduzido e nanotubos de carbono. / Davi Marques de Farias.

-- 2021.

74 p. : il.

Orientadora: Maria Auxiliadora C Matos

Coorientador: Renato Camargo Matos

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química, 2021.

1. Eletroquímica. 2. Eletroanalítica. 3. Eletrodos modificados. 4. Levofloxacina. 5. Técnicas Voltamétricas . I. Matos, Maria Auxiliadora Costa , orient. II. Matos, Renato Camargo, coorient. III. Título.

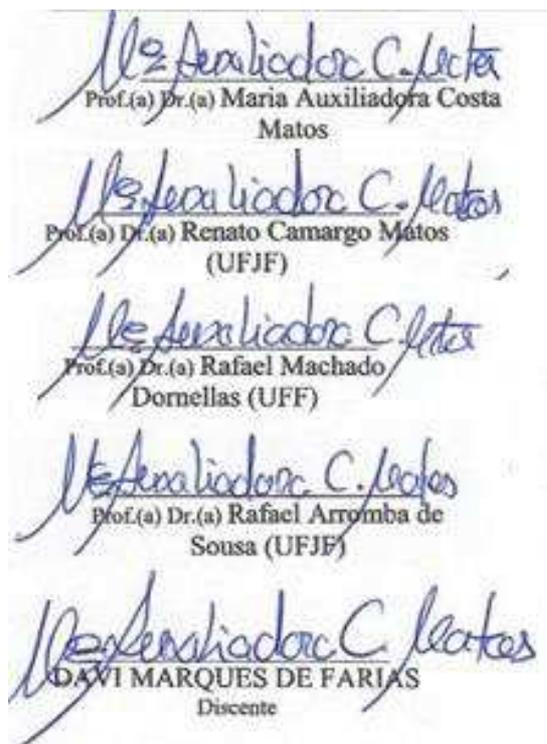
Davi Marques de Farias

Desenvolvimento de métodos eletroanalíticos para a determinação de levofloxacinina em formulação farmacêutica e urina utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno reduzido e nanotubos de carbono

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Química

Aprovada em 10 de fevereiro de 2021.

BANCA EXAMINADORA



Prof.(a) Dr.(a) Maria Auxiliadora Costa Matos

Prof.(a) Dr.(a) Renato Camargo Matos (UFJF)

Prof.(a) Dr.(a) Rafael Machado Dornellas (UFF)

Prof.(a) Dr.(a) Rafael Arromba de Sousa (UFJF)

DAVI MARQUES DE FARIAS
Discente

Dedico este trabalho à comunidade científica que apesar de sofrer duros ataques à cerca de sua credibilidade, segue cumprindo com o seu papel fundamental na elucidação de problemas em diversas áreas do conhecimento.

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer aos Deuses por todas as oportunidades até aqui concedidas e pelo conhecimento adquirido ao longo desses 26 anos.

Agradeço a minha família em suas diversas camadas, meus pais Rosângela e Eduardo por todo amor esboçados na forma de apoio emocional e financeiro. Aos meus tios Jorge e “Qué” e seus filhos Priscila e Alexandre por acreditarem sempre no meu potencial acadêmico.

A minha grande amiga e bióloga Luana que por diversas vezes acreditou em mim, quando eu mesmo não acreditava, suas sábias palavras me guiaram a esse grande momento e por isso serei eternamente grato.

Agradeço aos professores Renato e Maria Auxiliadora pela confiança depositada na elaboração e desenvolvimento do presente trabalho, bem como os ensinamentos acadêmicos e de vida. Levo comigo o carinho de uma amizade e a admiração por dois grandes cientistas que amam o que fazem. Agradeço em especial ao amigo e cientista Lucas por todo seu suporte frente às adversidades laboratoriais e seus ensinamentos em eletroquímica e eletroanalítica, sem ele certamente este trabalho não seria possível.

Agradeço ao NUPIS e suas diversas gerações. Velha: Gustavo e Fausto. Atual: Bruno, Lucas, Guilherme, Stephany, Monisa, Livia e Cristiano. Além do Thales que originalmente pertencia ao laboratório vizinho, mas nunca perdeu a oportunidade de um café “quentinho”. Foram diversos momentos de descontração e troca de conhecimentos ao longo de boa parte da graduação e do mestrado inteiro.

Agradeço aos colegas de graduação (Nicolas, Fernanda e Jéssica) e pós-graduação (Olívia, Nira, Letícia) pelas trocas de conhecimento ao longo de disciplinas e por contribuir de alguma forma na minha formação acadêmica.

Agradeço aos amigos de vida: Matheus, Nicolas, Rodolpho, Danilo, João Marcos e Guilherme por todas as conversas e desabafos ao longo dessa jornada. Os momentos de descontração ao lado destes, certamente contribuíram positivamente a minha saúde emocional e de maneira indireta ao desenvolvimento desse trabalho.

À CAPES, FAPEMIG, CNPq e UFJF pelo auxílio financeiro.

A uns trezentos ou quatrocentos metros da Pirâmide me inclinei, peguei um punhado de areia, deixei-o cair silenciosamente um pouco mais adiante e disse em voz baixa: Estou modificando o Saara. O ato era insignificante, mas as palavras nada engenhosas eram justas e pensei que fora necessária toda a minha vida para que eu pudesse pronunciá-las.

(Jorge Luis Borges,1979)

Resumo

Neste trabalho, foi comparado óxido de grafeno reduzido (OGR) e nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) como modificadores da superfície do eletrodo de carbono vítreo para a determinação de levofloxacin. Ambos nanomateriais foram devidamente caracterizados por espectroscopia Raman, mostrando assim que de fato houve mudanças estruturais após a funcionalização. Experimentos envolvendo a voltametria cíclica, mostraram que o sensor a base de RGO apresentou maior ganho de sinal analítico para a levofloxacin em comparação com os eletrodos modificados com MWCNT (4 vezes) e sem modificação (20 vezes). O processo de oxidação da levofloxacin sobre as diferentes superfícies eletródicas foi controlado pela adsorção das espécies eletroativas e irreversível em aproximadamente + 1,0 V. Voltametria de pulso diferencial (VPD), voltametria de onda quadrada (VOQ), detecção amperométrica usando análise por injeção em fluxo (FIA-AMP) e por injeção em batelada (BIA-AMP) foram avaliadas para determinação da levofloxacin em amostras de formulações farmacêuticas, utilizando o eletrodo modificado com OGR. Os métodos desenvolvidos apresentaram limites de detecção de 1,45; 6,70; 1,90; 0,33 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e níveis de recuperação de 91, 106, 103 e 101 %, respectivamente. Todos os desvios padrão relativos foram inferiores a 7,0 %, indicando precisões adequadas. Os teores de levofloxacin foram concordantes com o valor estabelecido pelo fabricante do medicamento. Para análise da amostra de urina, os métodos dinâmicos FIA/BIA-AMP foram selecionados devido a elevada frequência analítica (cerca de 100 injeções por hora), sendo obtido um nível de recuperação entre 96-98%. Todos os resultados eletroquímicos foram estatisticamente comparáveis com a análise por cromatografia líquida ultra-rápida (UFLC), à um nível de 95 % de confiabilidade, demonstrando que os métodos são promissores para análises de rotina.

Palavras-chave: Levofloxacin. Óxido de grafeno reduzido. Nanotubo de carbono com paredes múltiplas. Voltametria de pulso diferencial. Voltametria de onda quadrada. Amperometria. Análise por injeção em fluxo. Análise por injeção em batelada.

Abstract

In this work, reduced graphene oxide (rGO) and multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) were compared as glass-carbon electrode surface modifiers for the determination of levofloxacin. Both nanomaterials were properly characterized by Raman spectroscopy, thus showing that there were in fact structural changes after functionalization. Experiments involving cyclic voltammetry, showed that the rGO-based sensor showed greater analytical signal gain for levofloxacin compared to electrodes modified with MWCNT (4 times) and without modification (20 times). The oxidation process of levofloxacin on the different electrode surfaces was controlled by the adsorption of the electroactive and irreversible species at approximately + 1.0 V. Differential pulse voltammetry (DPV), square wave voltammetry (SWV), amperometric detection using injection analysis flow (FIA-AMP) and batch injection (BIA-AMP) were evaluated to determine levofloxacin in samples of pharmaceutical formulations using the rGO modified electrode. The developed methods presented detection limits of 1.45; 6.70; 1.90; 0.33 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and recovery levels of 91, 106, 103 and 101%, respectively. All relative standard deviations were less than 7.0 %, indicating adequate precision. Levofloxacin levels were in agreement with the value established by the drug manufacturer. For analysis of the urine sample, the dynamic methods FIA / BIA-AMP were selected due to the high analytical frequency (about 100 injections per hour), with a recovery level between 96-98%. All electrochemical results were statistically comparable with the analysis by ultra-fast liquid chromatography (UFLC), at a level of 95% reliability, demonstrating that the methods are promising for routine analysis.

Keywords: Levofloxacin. Reduced graphene oxide. Multi-walled carbon nanotube. Differential pulse voltammetry. Square wave voltammetry. Amperometry. Flow injection analysis. Batch injection analysis

Lista de Figuras

Figura 1	-	Estrutura em 3D do grafeno.....	20
Figura 2	-	Processo de redução do OG à OGR.....	22
Figura 3	-	Modelos conformacionais para os NTC's: (A) Camada única (SWCNT); (B) Múltiplas camadas (MWCNT).....	23
Figura 4	-	Funcionalização dos NTCs em meio ácido.....	24
Figura 5	-	Estrutura conformacional básica das quinolonas e seus derivados.....	26
Figura 6	-	(A ₀) Diagrama de montagem do sistema em fluxo com detecção amperométrica. Compartimentos: (A) Reservatório para o eletrólito suporte, (B) bomba peristáltica, (C) recipiente contendo a amostra, (D) alça de amostragem, (E) válvula de injeção manual, (F) célula eletroquímica, (G) potenciostato, (H) descarte de solução, (I) computador. (B ₀) Representação ilustrativa de uma célula eletroquímica empregada no sistema FIA. (C ₀) Representação ilustrativa de uma célula eletroquímica empregada no sistema BIA.....	33
Figura 7	-	(A) Eletrodo limpo; (B) Eletrodo modificado com OGR; (C) Eletrodo modificado com MWCNT.....	38
Figura 8	-	Espectros Raman dos materiais sólidos obtidos utilizando um laser de He/Ne (633nm) com potência de saída de 20 mW, objetiva de magnificação de 50x, resolução de 3-5 cm ⁻¹ e tempo de integração de 60 segundos. (A) OG e OGR; (B) SWCNT funcionalizado.....	43
Figura 9	-	Voltamogramas cíclicos para diferentes sensores (eletrodo base + modificador) em meio de tampão BR (0,04 mol L ⁻¹ , pH 6) para 200 µmol L ⁻¹ de levofloxacina. Velocidade de varredura de 100 mV s ⁻¹	44

Figura 10	-	Voltamogramas cíclicos variando a velocidade de varredura de (25-200) mV s ⁻¹ da solução de ferricianeto de potássio 1,00 mmol L ⁻¹ em meio de KCl (0,10 mol L ⁻¹). Utilizando o eletrodo de carbono vítreo (A) limpo, (B) modificado com MWCNT e (C) modificado com OGR.....	45
Figura 11	-	(A) Voltamogramas obtidos a partir da variação do pH (2 a 10) e (B) Potencial vs. Ag/AgCl(sat) / V x pH, para a resposta eletroquímica da levofloxacina 200 µmol L ⁻¹ utilizando o sensor a base de OGR em meio de tampão BR (0,04 mol L ⁻¹).....	47
Figura 12	-	(A) Voltamogramas obtidos a partir do estudo de transporte de massa envolvendo a oxidação da levofloxacina 200 µmol L ⁻¹ utilizando o sensor a base de OGR em meio de tampão BR (0,04 mol L ⁻¹ , pH 6) variando a velocidade de varredura de (25-250) mV s ⁻¹ . (B) potencial de oxidação x logarítmico da velocidade de varredura.....	49
Figura 13	-	Reação de oxidação proposta para a levofloxacina.....	49
Figura 14	-	Resultados obtidos a partir da otimização do (A) tempo de acumulação, (B) amplitude de potencial e (C) incremento de potencial, referente à determinação de levofloxacina (concentração 50 µmol L ⁻¹) por voltametria de pulso diferencial em uma célula eletroquímica utilizando o sensor a base de OGR em meio de tampão BR (0,04 mol L ⁻¹ , pH 6).....	50
Figura 15	-	(A) Voltamogramas de pulso diferencial referentes às concentrações de levofloxacina na faixa de 7 a 30 µmol L ⁻¹ , utilizando eletrodo modificado com OGR, tampão BR (0,04 mol L ⁻¹ , pH 6) (B) Estudo de repetibilidade do sensor desenvolvido, concentração de levofloxacina de 50 µmol L ⁻¹ , tampão BR (0,04 mol L ⁻¹ , pH 6). Condições instrumentais: tempo de acumulação 60 s, amplitude de pulso 70 mV e incremento de potencial 4 mV.....	52
Figura 16	-	Resultados obtidos para a otimização dos parâmetros instrumentais: (A) tempo de acumulação, (B) amplitude de potencial, (C) frequência e (D) incremento de potencial, referente à determinação de levofloxacina (concentração 50 µmol L ⁻¹) por voltametria de onda quadrada em uma célula eletroquímica utilizando o sensor a base de OGR em meio a tampão BR (0,04 mol L ⁻¹ , pH 6).....	53

- Figura 17 - Voltamogramas de onda quadrada referentes às concentrações de levofloxacina na faixa de 17 a 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$, utilizando eletrodo modificado com OGR, tampão BR (0,04 mol L^{-1} , pH 6) (B) Estudo de repetibilidade do sensor desenvolvido, concentração de levofloxacina de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, tampão BR (0,04 mol L^{-1} , pH 6). Condições instrumentais: tempo de acumulação 60 s, amplitude de pulso 70 mV, frequência 10 Hz e incremento de potencial 7 mV.....55
- Figura 18 - (A) Variação do potencial para a oxidação da levofloxacina por amperometria na faixa de 0,8 a 1,2 V; alça de amostragem de 50 μL e vazão do fluxo 1,5 mL min^{-1} . (B) Variação do volume da alça de amostragem de 50 a 200 μL ; potencial de +1,1 V e vazão do fluxo 1,5 mL min^{-1} . (C) Variação da vazão do fluxo de 1,0 a 2,6 mL min^{-1} ; potencial de +1,1 V e alça de amostragem de 150 μL . Concentração de levofloxacina 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em meio de tampão BR (0,04 mol L^{-1} , pH 6).....56
- Figura 19 - (A) Curva analítica com concentrações crescentes e decrescentes levofloxacina, (a) 9,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (b) 18 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (c) 27,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (d) 36,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (e) 43,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Condições instrumentais: potencial +1,1 V, alça de amostragem 150 μL e vazão do fluxo 2,0 mL min^{-1} em meio de tampão BR (0,04 mol.L^{-1} , pH 6).....58
- Figura 20 - (A) Otimização do potencial de oxidação para a levofloxacina por BIA-AMP faixa de 0,8 a 1,2 V; volume de 50 μL de injeção do padrão e velocidade de despejo do padrão 3 (B) Otimização do volume de injeção de 1 a 5; potencial +1,1V e velocidade de despejo 3. (C) Otimização da velocidade de injeção do padrão de 25 μL a 100 μL ; potencial de +1,1 V e velocidade de despejo 5. Concentração de levofloxacina 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em meio a tampão BR (0,04 mol L^{-1} , pH 6).....59
- Figura 21 - (A) Curva analítica com concentrações crescentes e decrescentes levofloxacina utilizando o método desenvolvido por BIA-AMP, (a) 3,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (b) 11,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (c) 20,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (d) 31,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (e) 40,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (f) 50,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Condições instrumentais: potencial +1,1 V, velocidade de injeção 3 e volume de injeção 50 μL em meio a tampão BR (0,04 mol L^{-1} , pH 6).....60

Figura 22 - (A) Voltamograma obtido por VPD para a determinação de levofloxacina em amostras de fármacos (A_0), fármaco fortificado (A_1), (B_0) branco. Condições instrumentais: tempo de acumulação 60 s, amplitude de pulso 70 mV e incremento de potencial 4 mV. (B) Voltamograma obtido por VOQ para a determinação de levofloxacina em amostras de fármacos (A_0), fármaco fortificado (A_1), (B_0) branco. Condições instrumentais: tempo de acumulação 60 s, amplitude de pulso 70 mV, frequência 10 Hz e incremento de potencial 7 mV. (C) Amperograma obtido pelo sistema FIA-AMP para determinação de levofloxacina em amostras de fármaco (A_0), fármaco fortificado (A_1), urina sintética (U_0) e urina fortificada (U_1). Curva analítica com concentrações crescentes de levofloxacina, (a) $9,2 \mu\text{mol L}^{-1}$, (b) $18 \mu\text{mol L}^{-1}$, (c) $27,1 \mu\text{mol L}^{-1}$, (d) $36,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ (e) $43,8 \mu\text{mol L}^{-1}$. Condições experimentais: potencial 1,1 V, alça de amostragem $150 \mu\text{L}$ e vazão do fluxo 2.0 mL min^{-1} . (D) Amperograma obtido pelo sistema BIA-AMP para determinação de levofloxacina em amostras de fármaco (A_0), fármaco fortificado (A_1), urina sintética (U_0) e urina fortificada (U_1). Curva analítica com concentrações crescentes de levofloxacina (a) $3,1 \mu\text{mol L}^{-1}$, (b) $11,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, (c) $20,4 \mu\text{mol L}^{-1}$, (d) $31,4 \mu\text{mol L}^{-1}$, (e) $40,9 \mu\text{mol L}^{-1}$, (f) $50,3 \mu\text{mol L}^{-1}$. Condições instrumentais: potencial +1,1 V, velocidade de injeção 3 e volume de injeção $50 \mu\text{L}$. Todos as análises foram em meio a tampão BR ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6) e utilizando o eletrodo modificado com OGR.....62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	-	Resultados experimentais referentes à superfície eletroativa do eletrodo de trabalho para cada modificador utilizado.....	46
Tabela 2	-	Comparação das figuras de mérito dos três métodos desenvolvidos para determinação de levofloxacin.....	61
Tabela 3	-	Teores de levofloxacin e percentuais de recuperaçã obtidos a partir das amostras de fármacos por VPD, VOQ e FIA-AMP (n=3).....	63
Tabela 4	-	Comparaçã dos métodos desenvolvidos com outros métodos reportados na literatura para a determinaçã de levofloxacin.....	65

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

EQM	Eletrodo quimicamente modificado
CV	Carbono vítreo
BPA	Bisfenol A
OG	xido de grafeno, do <i>inglês Graphene Oxide</i>
OGR	xido de grafeno reduzido, do <i>inglês Reduced Graphene Oxide</i>
NTC	Nanotubos de carbono, do <i>inglês Carbon nanotubes</i>
SWNTCs	Nanotubos de carbono de única camada, do <i>inglês Single-walled carbon nanotubes</i>
MWCNT	Nanotubos de carbono de múltiplas camadas, do <i>inglês Multi-walled carbon nanotubes</i>
ANVIS	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
FIA	Sistema por injeção em fluxo, do <i>inglês Flow injection analysis</i>
FIA-AMP	Sistema por injeção em fluxo- Amperometria
BIA	Sistema por injeção em batelada, do <i>inglês Batch injection analysis</i>
BIA-AMP	Sistema por injeção em batelada- Amperometria
VPD	Voltametria de pulso diferencial, do <i>inglês Pulse differential voltammetry</i>
VOQ	Voltametria de onda Quadrada, do <i>inglês Square wave voltammetry</i>
BR	Britton-Robinson
UFLC	Cromatografia líquida ultra rápida, do <i>inglês Ultra fast liquid Chromatography</i>
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
RSD	Desvio padrão relativo, do <i>inglês Relative standard desviation</i>
ANOVA	Análise de Variância

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	17
1.2 ELETRODOS MODIFICADOS A BASE DE GRAFENO E DERIVADOS	19
1.3 ELETRODOS A BASE DE NANOTUBOS DE CARBONO	22
1.4 ANÁLISE DE LEVOFLOXACINA E URINA SINTÉTICA	25
2 OBJETIVOS	31
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3 PARTE EXPERIMENTAL	32
3.1 INSTRUMENTAÇÃO E CÉLULAS ELETROQUÍMICAS	32
3.2 REAGENTES E SOLUÇÕES	34
3.3 SÍNTESE DE ÓXIDO DE GRAFENO E NANOTUBOS DE CARBONO	34
3.4 MODIFICAÇÃO COM OGR E/OU NTC	36
3.5 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAS	38
3.6 AQUISIÇÃO E PREPARO DAS AMOSTRAS FARMACÊUTICAS E URINA SINTÉTICA	39
3.7 ESTUDOS ELETROQUÍMICO DA LEVOFLOXACINA POR VOLTAMETRIA CÍCLICA, VPD, VOQ, FIA-AMP E BIA-AMP	40
3.8 DETERMINAÇÃO DA LEVOFLOXACINA POR UFLC (MÉTODO OFICIAL)	41
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	42
4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS	42
4.2 ESTUDO ELETROQUÍMICO DA LEVOFLOXACINA	43
4.2.1 Estudo exploratório da levofloxacin por voltametria cíclica.	43
4.2.1.1 Comportamento eletroquímico da levofloxacin em diferentes sensores	43
4.2.1.2 Determinação das áreas eletroativas do eletrodo de carbono vítreo limpo e modificado com MWCNT e OGR	44
4.2.1.3 Otimização do pH do meio e estudo do transporte de massa da levofloxacin	46
4.2.2 Determinação da levofloxacin por voltametria de pulso diferencial utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com OGR	50
4.2.4 Determinação da levofloxacin pelo sistema FIA-AMP	55
4.2.5 Determinação da levofloxacin pelo sistema BIA-AMP	58
4.2.6 Determinação da levofloxacin em formulações farmacêuticas e em urina sintética por voltametria de pulso diferencial, voltametria de onda quadrada e FIA/BIA com detecção amperométrica.	61

5 CONCLUSÕES.....	66
PESPECTIVAS FUTURAS.....	67
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	68
APÊNDICE A - PRODUÇÕES BIBLIOGRÁFICAS.....	76

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A eletroanalítica está na interface da ciência analítica e eletroquímica. A mesma atua no desenvolvimento, caracterização, e aplicação de métodos de análise química empregando fenômenos eletroquímicos, possibilitando o desenvolvimento de novas opções que auxiliam na determinação de analitos orgânicos, inorgânicos e organometálicos em diferentes substratos (AVACA; TOKORO, 2002). As metodologias abrangendo estudos eletroquímicos são vastas e variáveis, tendo aplicabilidade em diversas áreas do conhecimento, tais como, industriais (MEILI et al., 2019; PARNELL et al., 2015), farmacêuticas (THUNYAKONTIRAKUN et al., 2019; YEH; KUO; CHENG, 2008), ambientais (VICENTINI et al., 2016), alimentares (SMART et al., 2020; SUDARVIZHI et al., 2018) e tecnológicas (NIU et al., 2013; PINTER et al., 2007). As técnicas eletroquímicas associadas ao desenvolvimento de métodos eletroanalíticos são importantes ferramentas na quantificação de espécies eletroativas, pois as mesmas oferecem adequadas e atrativas características como, baixo custo instrumental, alta sensibilidade e portabilidade (ZANONI et al., 2017). Uma linha de pesquisa muito explorada nos últimos anos é a construção de novos sensores eletroquímicos a partir da modificação química da superfície de eletrodos convencionais (EDWARDS; BERGREN; PORTER, 2007).

Murray e colaboradores foram os precursores do termo eletrodo quimicamente modificado (EQM), o qual designa eletrodo com espécies quimicamente ativas, imobilizadas em sua superfície, de forma deliberada, com o objetivo controlar a natureza físico-química da interface eletrodo/solução agregando maior sensibilidade, seletividade, reatividade e robustez (MOSES; WIER; MURRAY, 1975). As propostas de aplicação dos EQM podem ser: de caráter excludente, alterando as propriedades de transporte para a superfície do eletrodo; de caráter reacional, onde o modificador provoca reações na superfície do eletrodo; ou com o propósito de melhorar a transferência eletrônica, provocado pelo efeito catalítico de alguns modificadores (PEREIRA; SANTOS; KUBOTA, 2002a). A utilização dos EQM's são associados, geralmente, a técnicas voltamétricas (ALIZADEH et al., 2012; BEITOLLAHI et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2018; YALLAPPA et al., 2018) e amperométricas (ANGGRAINI et al., 2018; RASHID et al., 2019; ZIYATDINOVA; GUSS; BUDNIKOV, 2020).

O substrato, eletrodo de trabalho, onde ocorrem os fenômenos redox relacionados à análise, deve ser eletroquimicamente estável e também se moldar ao método de imobilização selecionado. Dentre esses, os mais usuais são os eletrodos de ouro, platina, carbono vítreo e pasta de carbono. O carbono vítreo recebe destaque devido a características como boa condutividade elétrica, estabilidade térmica e robustez o que o torna atrativo enquanto eletrodo base de possíveis modificadores (MALEKI, 1998). As modificações no eletrodo base podem ser feitas por adsorção, ligação covalente, filmes poliméricos e a formação de compósitos, como mostrados no quadro 1.

Quadro 1. Métodos de modificação de superfícies de eletrodo.

Modificações	Principais Características
Adsorção	Incorporação simples e rápida de compostos quimicamente ativo sobre diversificados eletrodos base.
Ligação Covalente	Associação de diversas substâncias, de maneira estável, através da manipulação da reatividade dos grupos funcionais existentes na superfície do eletrodo com o modificador desejado.
Filmes poliméricos	Imobilização de policamadas de espécies quimicamente ativas ou inertes, sobre a superfície do eletrodo de acordo com o objetivo do sensor.
Materiais Compósito	Combinação de duas ou mais fases de natureza diferente, afim de que as mesmas interajam sinergicamente conferindo ao EQM características únicas.

Fonte: Adaptado de (PEREIRA; SANTOS; KUBOTA, 2002a).

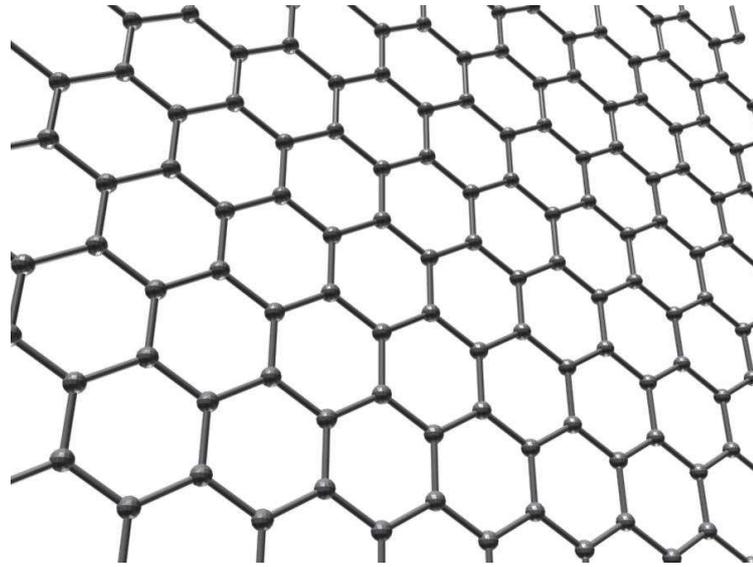
Nos últimos 10 anos, materiais nanoestruturados de carbono (nanotubos de carbono, nano-diamantes, fulereno, grafeno e seus derivados) recebem destaque, tendo em vista que os mesmos incorporam à eletroanálise características adequadas como o aumento do transporte de massa, aumento na área superficial, melhor relação sinal-ruído, ampla janela de potencial, baixo custo, baixa suscetibilidade de interferência do oxigênio dissolvido no meio e, também, por apresentar propriedades eletrocatalíticas em diversas reações redox (BEZZON et al., 2019).

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), o Brasil é o 19º país com maior ingestão de doses diárias de antibióticos no mundo, são 22,5 doses pra cada mil habitantes (CAMBRICOLI, 2018). Dentre os antibióticos disponíveis no mercado, têm-se as fluoroquinolonas (ciprofloxacina, levofloxacina, norfloxacina, moxifloxacina, ofloxacina dentre outras) que são antibióticos de amplo espectro utilizados para o tratamento de diversos tipos de infecções bacterianas em humanos e em animais sob regime de pastejo, podendo ser ministrado com fins terapêuticos e profiláticos (REGITANO; LEAL, 2010).

1.2 ELETRODOS MODIFICADOS A BASE DE GRAFENO E DERIVADOS

O grafeno, figura 1, foi descoberto no ano de 2004 por Andre Geim e Konstantin e prontamente levou a comunidade científica a explorar suas potencialidades, além de que, tal descoberta resultou na obtenção do prêmio Nobel no ano de 2010 (NOVOSELOV et al., 2004). O grafeno é uma das formas alotrópicas do carbono, e consiste em uma camada única de átomos de carbono com hibridização sp^2 em uma estrutura planar hexagonal densamente compacta. As ligações sigma C-C no plano são extremamente forte, enquanto que as interações de van der Waals fora do plano proporcionam interações fracas entre as camadas de grafeno ou entre o grafeno e os substratos (GHUGE; SHIRODE; KADAM, 2017). Tal configuração eletrônica é responsável pela área superficial ($2630 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ – valor teórico), e elevada resistência mecânica, condutividade elétrica, flexibilidade e condutividade térmica (JUSTINO et al., 2017).

Figura 1. Estrutura em 3D do grafeno.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2020).

Dessa forma, o mesmo apresenta potencialidade de aplicação em diversas áreas tecnológicas: biomedicina e indústria farmacêutica (SONG et al., 2020), indústria aeroespacial (DHINAKARAN et al., 2020), construção de supercapacitores (KORKMAZ; KARIPER, 2020), matrizes energéticas alternativas (TSANG et al., 2020), eletroanalítica (DU et al., 2011; PROMPHET et al., 2015) e biossensores (NERAVATHU et al., 2020; ZHENG et al., 2019).

Zhang e colaboradores utilizaram o grafeno como base na construção de um biossensor de tirosinase na determinação de bisfenol A (BPA). O método desenvolvido apresentou faixa linear de 100 nmol L^{-1} a 2000 nmol L^{-1} , limite de detecção de 33 nmol L^{-1} e sensibilidade de $3108,4 \text{ (mA cm}^{-2} \text{ mol}^{-1})$. O mesmo foi validado por cromatografia líquida de alta eficiência o que demonstrou a potencialidade do biossensor na determinação rápida de BPA lixiviado de produtos plásticos de policarbonato e para análises de campo (CUI; ZHANG, 2013).

Luo e colaboradores desenvolveram um sensor não enzimático para a determinação de glicose utilizando nanopartículas de Cu (cobre) com eletrodeposição em folhas de grafeno. Os estudos envolvendo o sensor Cu-grafeno mostraram-se promissores tendo em vista o efeito sinérgico dos materiais na oxidação da glicose em meio alcalino. O método apresentou uma faixa linear até $4,5 \text{ mmol L}^{-1}$ e um limite de detecção de $0,5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, além de apresentar alta

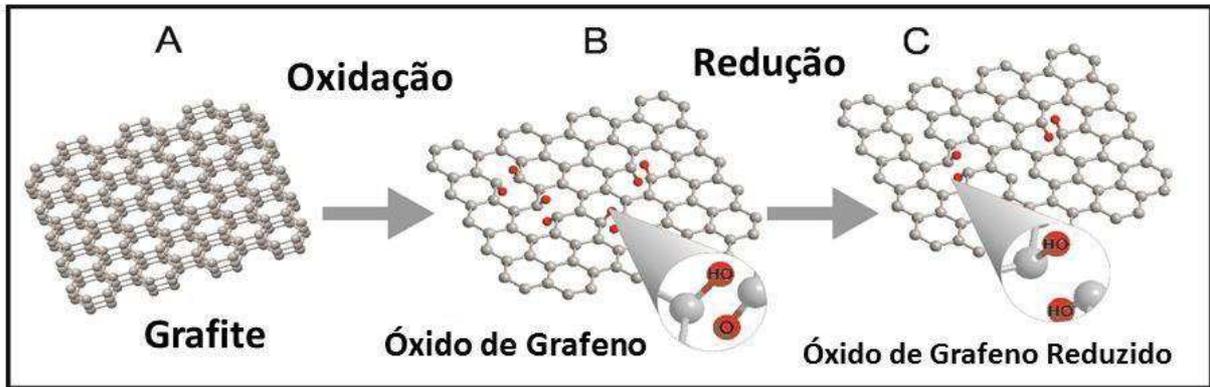
estabilidade e seletividade à glicose frente a interferentes comuns (ácido ascórbico, dopamina, ácido úrico e carboidratos) (LUO et al., 2012).

Kokot e colaboradores desenvolveram um biossensor amperométrico utilizando nanopartículas de prata e nanofolhas de grafeno para a determinação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O método desenvolvido para a redução do H_2O_2 apresentou faixa linear de 0,3 a 1,8 $mmol L^{-1}$ com um limite de detecção de 0,11 $mmol L^{-1}$ e sensibilidade de 2774,8 $\mu A \mu mol L^{-1}$. Além disso, a introdução sucessiva de nanofolhas de grafeno no sistema resultou em um acréscimo no sinal analítico, o que reafirma os possíveis efeitos catalíticos do grafeno, conferido ao biossensor desenvolvido (SONG; NI; KOKOT, 2013).

A obtenção do grafeno pode ser realizada por diferentes rotas sintéticas, tais como a exfoliação mecânica do grafite, exfoliação eletroquímica, exfoliação química do grafite e deposição química a vapor. Entretanto, devido ao caráter hidrofóbico do mesmo, algumas alternativas viáveis para a melhor dispersão em meio aquoso são utilizadas, tais como a funcionalização (inserção de grupos funcionais em sua estrutura) e o uso do ultrassom, tendo em vista que a condutividade elétrica é maior quando o material está melhor disperso. Neste sentido, opta-se por trabalhar com os materiais derivados do grafeno, sendo eles o óxido de grafeno (OG) e o óxido de grafeno reduzido (OGR). (CHEN; FENG; LI, 2012; DA SILVA et al., 2020).

O óxido de grafeno (OG), figura 2, consiste em uma estrutura planar de carbono contendo diversos grupos oxigenados (carbonila, carboxila, hidroxila), os quais atribuem a hidrofiliabilidade e biocompatibilidade ao material. A principal rota de obtenção do OG é o método de Hummers, dispersão do grafite em meio de ácido sulfúrico concentrado, nitrato de sódio e permanganato de potássio sob aquecimento. A grande desvantagem do OG frente ao grafeno é a sua elevada resistência elétrica, tal característica é conferida devido a defeitos na estrutura que interrompem a hibridização sp^2 (planar), ou seja, no OG existem domínios com carbono sp^3 (tetraédrica). A fim de restaurar a condutividade do material, uma grande parte dos grupos funcionais, no OG, podem ser removidos via redução química ou eletroquímica, com a finalidade de obter o óxido de grafeno reduzido (OGR) (figura 2) que agrega porosidade ao sensor desenvolvido, promovendo uma maior aderência ao analito e conseqüentemente uma maior sensibilidade ao método desenvolvido (NARCISO et al., 2017).

Figura 2. Processo de redução do OG à OGR.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor (2020).

A abrangência e a potencialidade na utilização de OGR advêm da cinética de transferência eletrônica e aumento da área superficial, o que permite a elucidação de diversas vias eletroquímicas, além de promover um aumento no desempenho eletrocatalítico do método desenvolvido. Os sensores utilizando o OGR como modificador têm sido utilizados como ferramenta na determinação de diversas moléculas orgânicas em variadas matrizes, tais quais, ambientais, farmacêuticas e biológicas (HAN et al., 2018; WANG et al., 2009; ZHANG et al., 2019).

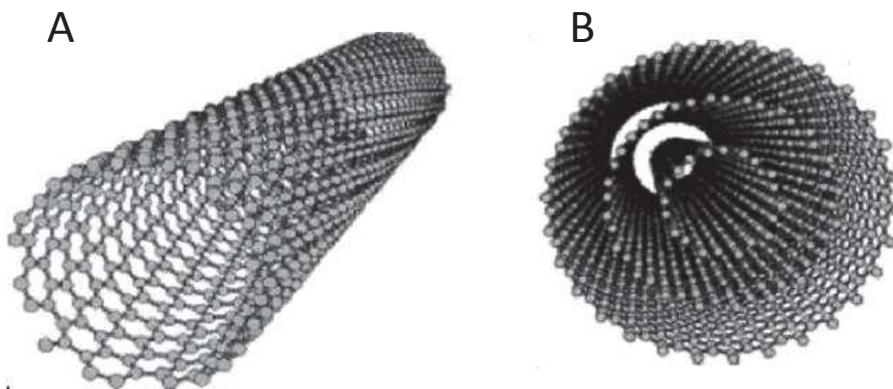
Donini e colaboradores construíram um eletrodo de OGR modificado com nanopartículas de prata para a determinação do hormônio estriol em urina sintética e água de torneira. A técnica voltamétrica utilizada foi a voltametria de onda quadrada (VOQ) e o método obtido apresentou um limite de detecção de $21,0 \text{ nmol L}^{-1}$ (DONINI et al., 2018). Jiang e colaboradores utilizaram um sensor à base de β -ciclodextrina e OGR sobre uma superfície de carbono vítreo para a determinação de gatifloxacina em formulações farmacêuticas e amostras de urina por voltametria de pulso diferencial (VPD), tendo obtidos resultados de recuperação na faixa de 95 a 103 % para ambas as amostras (JIANG; LI; ZHANG, 2016). Outro trabalho realizado por Jiang e colaboradores determinaram ofloxacina em amostras de urina e formulações farmacêuticas utilizando um eletrodo modificado com OGR e nanoclusters bimetálicos de platina e ouro, a recuperação obtida pelo método foi de 96 a 101 % o que confere uma boa exatidão ao método proposto (JIANG et al., 2017).

1.3 ELETRODOS A BASE DE NANOTUBOS DE CARBONO

Nanotubos de carbono (NTC's) são arranjos hexagonais de carbono com hibridização sp^2 , também é uma forma alotrópica do carbono e consiste em folhas de grafeno enroladas em

formato cilíndrico, tendo seu diâmetro na ordem de nanômetros e comprimento na ordem de micrometros. A principal forma de obtenção é a partir da decomposição térmica de fontes gasosas de carbono (CH_4 , C_2H_4 ou outras moléculas orgânicas) na superfície de catalisadores nanoparticulados. As disposições dessas folhas podem ser em uma única camada (do inglês, *single-walled carbon nanotubes*, *SWCNT*) ou em múltiplas camadas (do inglês, *multi-walled carbon nanotubes*-*MWCNT*), conforme mostrado na figura 3 (MCCREERY, 2008). Apesar da semelhança estrutural entre o grafeno e os NTC's dos diferentes tipos (SWCNT e MWCNT), o primeiro possui um caráter semicondutor enquanto que os NTC's podem apresentar caráter condutor ou semicondutor, dependendo da orientação da folha de grafeno sobre a qual é enrolado o nanomaterial. Os SWCNTs e MWCNTs são bastante semelhantes entre si, tendo em vista que os cilindros formadores dos nanotubos de múltiplas camadas possuem interações fracas (FRANK et al., 1998; LIANG et al., 2001).

Figura 3. Modelos conformacionais para os NTC's: (A) Camada única (SWCNT); (B) Múltiplas camadas (MWCNT).



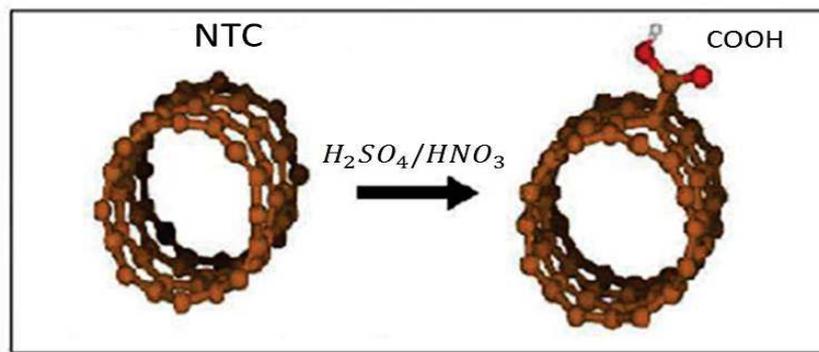
Fonte: Adaptada de (Montes, R.H, 2015).

O grande empecilho na utilização dos NTC's como modificadores é o seu baixo grau de solubilidade em solventes aquosos e orgânicos (STAR et al., 2001). Dessa forma, é necessário o uso de técnicas que permitam superar tais obstáculos, como o uso de ultrassons, agentes tensoativos e modificação química através de funcionalizações e combinações dos mesmos. A utilização do ultrassom tem por objetivo minimizar a agregação do nanomaterial, tendo em vista que a condutividade elétrica do material esta diretamente ligada com o grau de dispersão dos NTC's no meio aquoso ou no meio orgânico (SONG; YOUN, 2005).

A funcionalização inclui modificações em sua morfologia, aumento da área superficial e adição de grupamentos em sua superfície (carboxilatos, hidroxilas, amidas entre outras). O

principal objetivo é potencializar as características eletroquímicas do nanomaterial empregado, bem como melhorar o seu caráter dispersivo. O método mais empregado é aquele que envolve interações covalentes, tendo em vista que a mesma resulta em aprimoramentos drásticos nos NTC's. Os processos oxidativos em meio ácido (figura 4) provocam defeitos na estrutura dos nanotubos, além da inserção de grupos funcionais (como por exemplo, as carboxilas) o que resulta no aumento da reatividade por parte do material nanométrico (PEREIRA; SANTOS; KUBOTA, 2002b).

Figura 4. Funcionalização dos NTCs em meio ácido.



Fonte: Adaptado de (PEREIRA; SANTOS; KUBOTA, 2002b)

As potenciais aplicações dos NTC's na construção de sensores e biossensores advêm de propriedades como: resistência mecânica e estabilidade química, o que confere ao sensor uma boa resistência a pequenos choques mecânicos durante a análise e não perder suas características eletroquímicas; elevada adsorvidade, o que promove uma maior aderência por parte do analito; rápida transferência eletrônica, podendo conferir ao sensor efeitos eletrocatalíticos desejados e por fim excelente quimiocompatibilidade, permitindo associações com outras moléculas quimicamente ativas. (SHERIGARA; KUTNER; D'SOUZA, 2003; ZHAO; LIU; HU, 2006; ZHOU; FANG; RAMASAMY, 2019).

Wang e colaboradores construíram um sensor capaz de monitorar tetraciclina ao combinar um polímero impresso com um compósito de MWCNTs e ouro. A faixa linear do método variou de 0,10 a 40,00 $mg L^{-1}$ e o limite de detecção foi de 0,04 $mg L^{-1}$, o que mostra a potencialidade do modificador em termos de detectabilidade à determinação do antibiótico em questão (WANG; ZHAO; QUAN, 2011). Chen e colaboradores construíram um sensor a base de óxido de cobre nanoparticulado em conjunto com MWCNTs para a detecção de flunitrazepam (sedativo), o método desenvolvido apresentou linearidade na faixa de 0,05 a

350,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e foi aplicado em amostras farmacêuticas e biológicas com recuperações satisfatórias (CHEN et al., 2019).

Fotouhi e colaboradores determinaram ciprofloxacina em amostras de urina e soro sanguíneo utilizando eletrodo modificado com MWCNTs, a técnica utilizada foi a voltametria de pulso diferencial e as recuperações obtidas para ambas matrizes foram próximas a 90 % o que demonstra boa exatidão, levado em consideração a faixa de concentração trabalhada (FOTOUHI; ALAHYARI, 2010). Jiang e colaboradores determinaram ofloxacina utilizando um eletrodo modificado com o-aminofenol e MWCNTs, o efeito sinérgico entre ambos os modificadores conferiram propriedades eletrocatalíticas ao sensor desenvolvido, o método apresentou uma faixa linear de 3 a 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e recuperações de 98 a 103 % (JIANG et al., 2017).

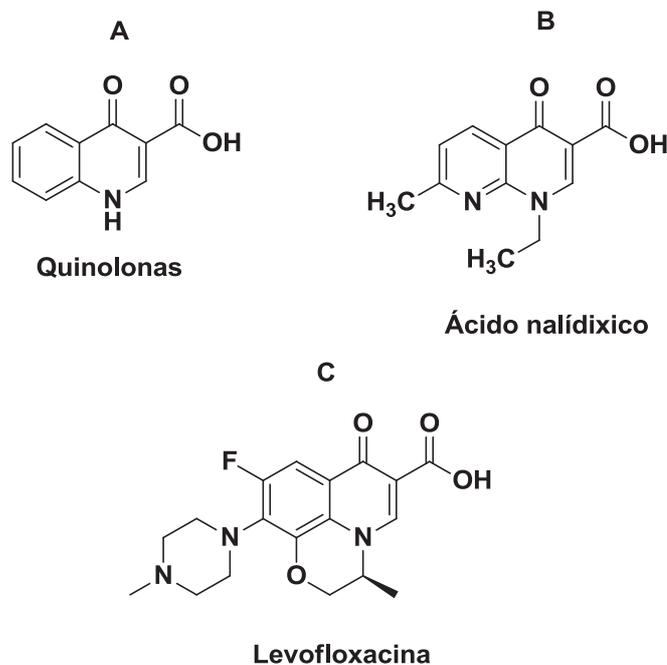
1.4 ANÁLISE DE LEVOFLOXACINA E URINA SINTÉTICA

A síntese da primeira quinolona, estrutura básica mostrada na figura 5A, foi no ano de 1962. A mesma foi obtida a partir do agente antimalárico de atividade antibacteriana comprovada, a cloroquina. O ácido nalidíxico (figura 5B), um subproduto dessa reação que também apresentou atividade antibacteriana, sendo assim, o mesmo foi empregado no combate a doenças urinárias de difícil tratamento (BALL, 2000). A partir das quinolonas surgiram as fluorquinolonas (FQ), a segunda geração desse fármaco possui um átomo de flúor e um grupo piperazinil, tal mudança proporcionou um aumento no espectro de ação, já que as FQ tem maior facilidade em ultrapassar a parede bacteriana e também apresentaram melhor atividade contra essa classe de micro-organismos (HIGGINS; FLUIT; SCHMITZ, 2003).

A indústria farmacêutica segue realizando modificações estruturais nas FQ, o que confere ao grupo amplo espectro de atuação bem como uma boa farmacocinética, permitindo dosagem única. Nesse sentido, tem-se a levofloxacinina (figura 5C) pertencente a 3ª geração das fluorquinolonas (RODRIGUES-SILVA et al., 2014). A mesma apresenta atividade bactericida de amplo espectro contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. Uma das suas principais utilizações é para fins terapêuticos, sendo de extrema importância em infecções causadas por micro-organismos resistentes a outras classes de fármacos, algumas dessas patologias são infecções do trato respiratório superior e inferior, infecções da pele e tecido subcutâneo e infecções do trato urinário (DE SOUZA, 2005). O mecanismo de ação consiste na inibição da atividade catalítica de duas enzimas (DNA girase e a topoisomerase IV)

responsáveis pela replicação e transcrição do DNA bacteriano (RADI; RIES; KANDIL, 2003). A mesma pode apresentar reações adversas como danos nos tendões, problemas cardíacos, perda de massa muscular e síndromes de Stevens-Johnson (WANG; ZHU; ZHANG, 2014).

Figura 5. Estrutura conformacional básica das quinolonas e seus derivados.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2020).

A indústria farmacêutica no Brasil é fiscalizada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a mesma é responsável por toda a regulamentação e pela fiscalização do controle de qualidade. A produção de qualquer medicamento dentro da indústria farmacêutica passa por um conjunto de processos definidos em uma determinada sequência até à obtenção do produto final. Inserido na cadeia produtiva, é importante definir produtos intermediários, além do produto final como ponto crítico no controle de qualidade. Esses pontos críticos são focos de análises, sejam elas físico-químicas ou biológicas. O teor do princípio ativo de uma formulação é um importante parâmetro na determinação da qualidade, segurança e eficácia terapêutica de uma determinada formulação farmacêutica (VALÉCIO, 2019).

Além da questão de saúde humana, é importante ressaltar que estudos reportam a baixa absorção e metabolização da levofloxacin por parte do organismo animal e que após a administração oral é possível encontrar o princípio ativo e os seus metabolitos na urina, sendo este um possível contaminante de esgotos e rios (CESARINO et al., 2014). Sendo assim, o mesmo pode ser considerado um poluente emergente, devido à inserção crescente desses

produtos ao meio ambiente, cujo comportamento, distribuição e efeitos no mesmo ainda não são totalmente compreendidos, de forma a apresentarem risco a todo ecossistema. Ao inseri-los no mesmo, podem causar diversos desequilíbrios devido a sua atividade biológica, possíveis efeitos bioacumulativos e o desenvolvimento de bactérias resistentes ao fármaco em questão, tendo em vista que bactérias expostas a resíduos antimicrobianos presentes em matrizes ambientais podem sofrer mutações em sua carga genética (SUI et al., 2015), o que resulta em micro-organismos mais resistentes ao fármaco em questão. O crescimento da resistência bacteriana tem como principais efeitos negativos a necessidade da utilização de formulações farmacêuticas mais agressivas e onerosas no tratamento de doenças. Uma vez na estação de tratamento, o efluente é submetido a processos físico-químicos e biológicos ineficientes na degradação desses xenobióticos, que atingem os corpos d'água, contaminando-os (VETTORELLO et al., 2017).

Dessa forma, é imprescindível o controle em urina para que se tenham condições de fazer estudos referentes ao monitoramento no aumento da poluição ambiental por parte dessa classe de antibióticos, no caso em específico deste trabalho, a levofloxacina. Além do monitoramento em formulações farmacêuticas, por questões de saúde pública e controle de qualidade (FRADE et al., 2014).

Diversas técnicas são reportadas na literatura como uma possível ferramenta na determinação de levofloxacina em fluídos biológicos e formulações farmacêuticas, dentre elas espectrofotometria (MALEQUE et al., 2012), cromatografia líquida de alta eficiência (LOCATELLI et al., 2015; SZERKUS et al., 2017), eletroforese capilar (FARIA et al., 2006), quimioluminescência (DONG et al., 2015), espectroscopia de fluorescência (EL-HAMSHARY et al., 2019) e a espectroscopia RAMAN (HIDI et al., 2016). Apesar de estas apresentarem características adequadas como, robustez, sensibilidade e seletividade, as mesmas possuem um alto custo instrumental, baixa frequência analítica (em virtude dos dispendiosos tratamentos de amostras) e elevada geração de resíduos. Tendo em vista que a levofloxacina apresenta grupos eletroativos em sua estrutura, metodologias eletroquímicas vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de se estabelecer métodos alternativos com baixo custo instrumental, sensibilidade, adequada frequência analítica e simplicidade operacional (LOWINSOHN; BERTOTTI, 2006).

Cesarino e colaboradores propuseram a análise de levofloxacina por voltametria de pulso diferencial utilizando um eletrodo de trabalho modificado com NTC e óxido de estanho.

O método desenvolvido apresentou linearidade na faixa de 1 a 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e limite de quantificação de 0,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (CESARINO et al., 2014). Borowiec e colaboradores propuseram um sensor utilizando OGR, nanopartículas de ouro e dialil-dimetilcloroeto de amônio para a determinação de levofloxacina em formulações farmacêuticas. O método apresentou-se linear na faixa compreendida de 20 a 40 mmol L^{-1} e os resultados obtidos foram concordantes com os rótulos do medicamento (BOROWIEC et al., 2015). Huang e colaboradores determinaram levofloxacina em amostras de leite com cravo ao utilizar um eletrodo de carbono vítreo modificado com grafeno e “quantum dots” de o-aminofenol. A eletropolimerização desses compostos forneceu um aumento na área superficial e um aumento na corrente de oxidação da levofloxacina. A linearidade do método proposto variou de 0,050 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com limite de detecção de 10 nmol L^{-1} e percentuais de recuperação para as amostras de leite variando de 96 a 101 % (HUANG et al., 2017).

1.5 SISTEMAS POR ANÁLISE EM FLUXO (FIA E BIA)

A análise por injeção em fluxo, FIA (do inglês, Flow Injection analysis), foi inicialmente proposto por Ruzicka e Hansen em 1975, introduziu um novo conceito de análises químicas. Tendo em vista que o mesmo possui vantagens como o uso de instrumentação versátil e simples, baixo custo dos componentes do sistema, elevada frequência de amostragem, consumo reduzido de material (amostras e reagentes) o que diminui a geração de resíduos, além do menor contato e exposição por parte do analista, resultado direto da automatização (CÉSAR; SANTANA; KUBOTA, 2002).

O sistema FIA é composto por uma bomba peristáltica responsável por proporcionar um fluxo transportador e um injetor que é responsável por introduzir a amostra no fluxo para que os analitos atinjam o detector e produzam um sinal analítico. Em relação às condições experimentais do FIA (vazão e percurso analítico), se mantidas constante, obtêm-se resultados confiáveis e reprodutíveis (RŮŽIČKA; HANSEN, 1975). Sua aplicabilidade se faz presente em matrizes ambientais (LANYON et al., 2005; TRAVERSI et al., 2007), alimentares (SÁNCHEZ ARRIBAS et al., 2013; VARGAS et al., 2016) e farmacêuticas (FEIER et al., 2017; RUEDAS RAMA; RUIZ MEDINA; MOLINA DÍAZ, 2004).

Ao longo dos anos, o sistema FIA tem sido acoplado a diversas técnicas analíticas, como a absorção atômica (OLIVEIRA et al., 2014; ZARE-DORABEI; BOROUN; NOROOZIFAR, 2018), espectrometria UV-Visível (ALTIOKKA; ATKOSAR; CAN, 2002; SHAMSIPUR et al., 2009), fluorescência (LI et al., 2010; WANG; SOMBRA;

FERNÁNDEZ, 2012), quimiluminescência (CHRISTODOULEAS et al., 2015; MURILLO PULGARÍN; GARCÍA BERMEJO; CARRASQUERO DURÁN, 2019), espectrometria de massas (BRUNO et al., 2016; JURDÁKOVÁ et al., 2018), potenciometria (SHAMSIPUR et al., 2009; SONG et al., 2011), voltametria (DEJMKOVA et al., 2012; NOUWS et al., 2007) e amperometria (SU et al., 2009; WONG; SANTOS; FATIBELLO-FILHO, 2018). Quando associado à detecção eletroquímica, a maioria de suas aplicações está relacionada à amperometria, técnica que consiste na aplicação de um potencial constante ao longo do tempo e o sinal gerado pela oxidação ou redução (magnitude de corrente faradaica) é proporcional à espécie eletroativa de interesse.

A análise por injeção em batelada, BIA (do inglês, *Batch Injection analysis*), foi introduzida na década de 90, por Wang e Taha. O sistema BIA consiste em um arranjo instrumental dinâmico que recebe atenção devido a atrativas características, além das já mencionadas para o sistema FIA, associadas a características físicas da não necessidade de bomba externa e tubulações fluídicas. O arranjo desta técnica consiste em pequenos volumes de amostras que são injetadas, com o auxílio de uma micropipeta, diretamente na superfície do eletrodo de trabalho, o qual se encontra imerso num aporte grande de eletrólito suporte. Além disso, a fim de se obter resultados mais precisos é utilizada para injeção das amostras uma micropipeta eletrônica, onde o volume e velocidade da injeção são programados (WANG; TAHA, 1991). O sistema BIA quando acoplado a técnicas eletroquímicas, principalmente a amperometria, demonstra-se uma valiosa ferramenta nas análises de amostras alimentares, ambientais e farmacêuticas (OLIVEIRA et al., 2016; SILVA et al., 2012; STEFANO et al., 2012).

Algumas vantagens do FIA-amperometria (FIA-AMP) e do BIA-amperometria (BIA-AMP) frente aos métodos voltamétricos convencionais são: volume de material que chega a superfície do eletrodo, proporcionando um aumento significativo na sensibilidade (transporte de massa convectivo); mínimo envenenamento da superfície do eletrodo já que o tempo de exposição ao analito é menor e o decréscimo significativo na contribuição da corrente capacitiva, que se torna desprezível com o passar do tempo, contribuindo para o aumento significativo da sensibilidade do método desenvolvido (SANTOS et al., 2011). Além das contribuições, aos métodos desenvolvidos, referentes aos arranjos instrumentais do FIA-AMP e BIA-AMP, tem-se a possibilidade da implementação dos EQM's que conferem maior sensibilidade e seletividade aos métodos desenvolvidos. A literatura relata a utilização de derivados do grafeno como modificadores na construção de sensores, tanto o OGR (DE

FARIA et al., 2020a; ISLAM et al., 2019) quanto os SWNTC\MWCNT (HALLAJ et al., 2016; WANG et al., 2017).

Faria e colaboradores desenvolveram e compararam métodos dinâmicos (FIA-AMP e BIA-AMP) capazes de quantificar tetraciclina em formulações farmacêuticas utilizando como plataforma de trabalho eletrodo de carbono vítreo modificado com OGR. Os métodos desenvolvidos apresentaram limite de detecção de $1,17 \mu\text{mol L}^{-1}$ para FIA-AMP e de $0,038 \mu\text{mol L}^{-1}$ para BIA-AMP, além disso, foram reportados valores de recuperação, satisfatórios, que variaram de 87 % a 117 % o que demonstram confiabilidade no estudo, tendo em vista que os resultados foram comparados com a cromatografia de alta eficiência, (método oficial). E por fim, as amostras apresentaram o valor nominal esperado dentro da legislação vigente (FARIA et al., 2019a). Em outro trabalho também realizado por Faria e colaboradores foi desenvolvido um método, por FIA-AMP, semelhante ao relatado anteriormente, entretanto para determinação de ciprofloxacina em formulações farmacêuticas e leite bovino. O modificador escolhido foi o OGR sobre um eletrodo base de carbono vítreo, o método apresentou faixa linear de concentração 1 a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, limite de detecção de $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$, recuperação de 101 % e 113 %, o que demonstraram boa detectabilidade e exatidão. Nas formulações farmacêuticas os teores de ciprofloxacina foram concordantes com os valores fornecidos pelos fabricantes dos medicamentos e no leite bovino as concentrações de ciprofloxacina ficaram abaixo do limite de detecção. Os resultados obtidos foram estatisticamente comparáveis às análises por HPLC a 95 % de confiabilidade (DE FARIA et al., 2020).

A determinação de levofloxacina por FIA-AMP e BIA-AMP ainda é pouco reportada na literatura, ou seja, o desenvolvimento do presente trabalho visando à comparação das técnicas voltamétricas estacionárias com as técnicas dinâmicas, utilizando como plataforma redox um eletrodo modificado com base em alótropos do carbono, são relevantes no cenário científico a fim de obter uma metodologia rápida, simples e eficiente na determinação do mesmo em amostras farmacêuticas e biológicas.

2 OBJETIVOS

Desenvolver diferentes metodologias eletroanalíticas utilizando o eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno reduzido ou nanotubos de carbono para a determinação de levofloxacinina em amostras de fármacos e urina sintética.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Modificar o eletrodo de carbono vítreo com o OGR ou com MWNTC.
- Estudar a resposta eletroquímica da levofloxacinina nos diferentes sensores;
- Estudar o transporte de massa e a faixa linear de trabalho no eletrodo que apresentar melhor resposta analítica;
- Desenvolver e comparar metodologias analíticas por voltametria de pulso diferencial (VPD), onda quadrada (VOQ), FIA-AMP e BIA-AMP para a determinação de levofloxacinina;
- Determinar a levofloxacinina em amostras de fármacos e urina sintética;
- Comparar os resultados obtidos eletroquimicamente com cromatografia líquida ultra rápida com detecção UV-Vis;

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 INSTRUMENTAÇÃO E CÉLULAS ELETROQUÍMICAS

Todas as medidas eletroquímicas foram feitas utilizando um Potenciostato μ Autolab Type III (EcoChemie, Utrecht, Holanda) interfaceado a um microcomputador e a aquisição e tratamento dos dados foram realizadas respectivamente pelos softwares NOVA 2.2.1 e Origin 8.0. A célula eletroquímica, para as análises voltamétricas, foi constituída por um eletrodo de trabalho de carbono vítreo limpo ou modificado, um eletrodo de referência Ag/AgCl(sat), KCl(sat) comercial e um eletrodo auxiliar de platina. Como recipientes para as células eletroquímicas envolvendo as determinações por voltametria cíclica, pulso diferencial e onda quadrada, foram empregados béqueres de 5 mL.

Para as análises envolvendo o sistema FIA (figura 6A), foi utilizado uma bomba peristáltica, um injetor manual, seringas, alça de amostragem e uma célula eletroquímica construída no laboratório, a mesma é constituída de um eletrodo de trabalho de carbono vítreo modificado, eletrodo de platina auxiliar e eletrodo de referência Ag/AgCl(sat), KCl(sat) confeccionado no próprio laboratório de pesquisa NUPIS da Universidade Federal de Juiz de Fora. As soluções foram transportadas por tubo de polietileno de 1 mm de diâmetro interno e 25 cm de comprimento. A célula eletroquímica foi construída utilizando um *ependorf* de polipropileno (diâmetro interno de 0,9 cm, altura de 3,5 cm e volume interno de 1 mL), a qual apresenta configuração “wall-jet”, conforme mostrado na figura 6B, à célula eletroquímica apresenta um orifício inferior de aço inox e outros três para a entrada dos eletrodos de referência, trabalho e saída da solução. O eletrodo de trabalho foi posicionado a uma distância de aproximadamente 2 mm da saída da tubulação, evitando assim, causar uma grande dispersão do analito no fluxo ou difusão sem toda a amostra entrar em contato com o eletrodo de trabalho.

E por fim, para as análises pelo sistema BIA foi utilizada um micropipeta eletrônica (Eppendorf[®], Multipette stream) e uma célula eletroquímica desenvolvida no laboratório de pesquisa NuPE da Universidade Federal de Uberlândia (representação na Figura 6C0). A célula BIA consistiu em um tubo cilíndrico de vidro (diâmetro interno de 7,3 cm, altura de 7,1 cm e volume interno de aproximadamente 200 mL) com extremidade inferior de PVC, possuindo um orifício central onde o eletrodo de trabalho é posicionado na configuração “wall jet”, onde as soluções de análise são injetadas diretamente na sua superfície. A

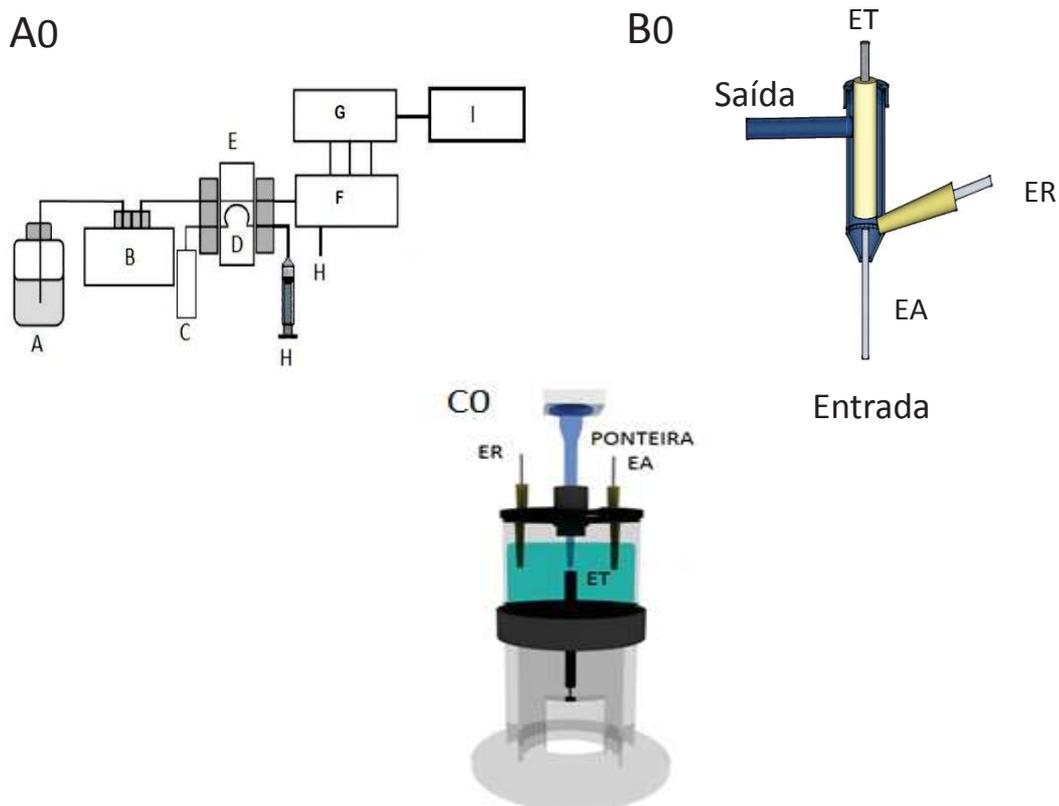
extremidade superior da célula BIA contém 3 orifícios, a abertura central permite o posicionamento da ponteira da micropipeta eletrônica, que é colocada de forma a permanecer a uma distância de aproximadamente 2 mm do eletrodo de trabalho. As outras duas aberturas são destinadas ao posicionamento do eletrodo de referência e auxiliar. As injeções das amostras foram realizadas com uma micropipeta eletrônica que dispõe de cinco níveis de velocidades de injeção distintos, os quais correspondem à quantidade de solução que é injetada por segundo na superfície do eletrodo de trabalho.

Figura 6. (A₀) Diagrama de montagem do sistema em fluxo com detecção amperométrica.

Compartimentos: (A) Reservatório para o eletrólito suporte, (B) bomba peristáltica, (C) recipiente contendo a amostra, (D) alça de amostragem, (E) válvula de injeção manual, (F) célula eletroquímica, (G) potenciostato, (H) descarte de solução, (I) computador.

(B₀) Representação ilustrativa de uma célula eletroquímica empregada no sistema FIA. (C₀)

Representação ilustrativa de uma célula eletroquímica empregada no sistema BIA.



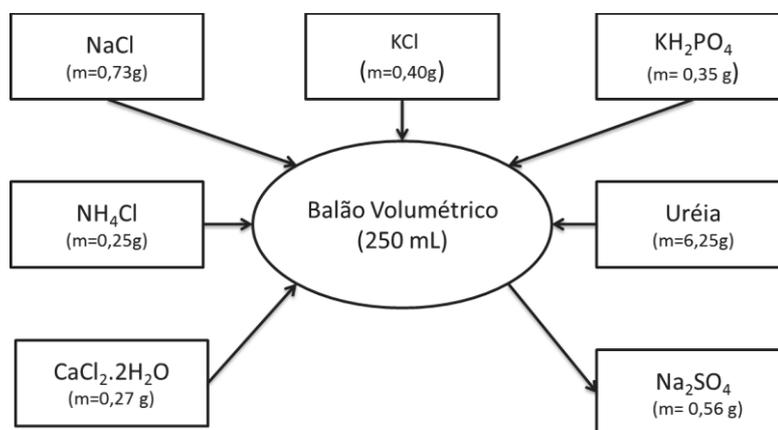
Fonte: Arranjo instrumental do sistema FIA adaptado de (HENRIQUE; MONTES, 2015); célula eletroquímica FIA e BIA adaptado de (FARIA et al., 2019a).

3.2 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todas as soluções foram preparadas utilizando água deionizada (Milli-Q-Quantum EX) com resistividade maior ou igual 18 MΩ cm. O padrão analítico de levofloxacina foi adquirido pela Sigma-Aldrich. Ácido fosfórico, acético e bórico foram utilizados para a preparação do eletrólito suporte tampão Britton-Robinson (BR) 0,04 mol L⁻¹ que tem capacidade tamponante na faixa de pH entre 2 e 12. A solução estoque de levofloxacina (1 mmol L⁻¹) foi preparada em tampão BR (0,04 mol L⁻¹, pH 2).

A amostra de urina sintética foi preparada como descrito por Laube e colaboradores (fluxograma 1) d, 0,73 g NaCl, 0,40 g KCl, 0,27 g CaCl₂.2H₂O, 0,56 g Na₂SO₄, 0,35 g KH₂PO₄, 0,25 g NH₄Cl e 6,25 g uréia foram adicionados em um béquer e dissolvidos com água deionizada, em seguida esta solução foi transferida para um balão volumétrico de 250 mL, o qual foi avolumado com água deionizada. A amostra de urina sintética foi utilizada logo após a preparação da mesma (LAUBE; MOHR; HESSE, 2001).

Fluxograma 1: Preparo da amostra de urina sintética.



Fonte: elaborado pelo próprio autor (2020).

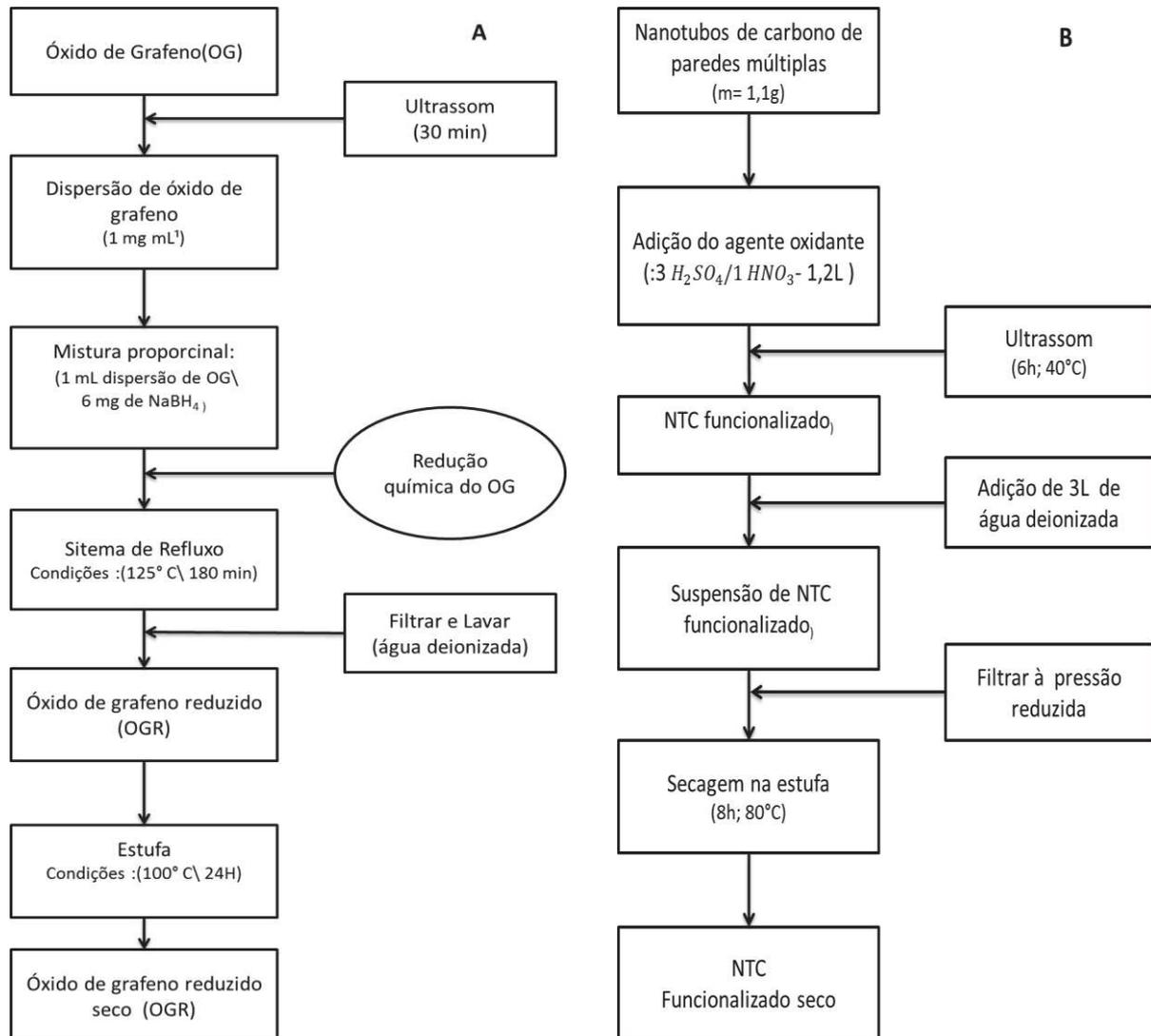
3.3 SÍNTESE DE ÓXIDO DE GRAGENO E NANOTUBOS DE CARBONO

O óxido de grafeno reduzido foi obtido via redução química do óxido de grafeno com borohidreto de sódio, fluxograma 2A. Primeiramente foi preparado uma dispersão de óxido de grafeno em água deionizada (~1 mg mL⁻¹) utilizando o banho ultrassônico por 30 minutos. A redução ocorreu na proporção de 1 mL da dispersão aquosa de óxido de grafeno para 6 mg de borohidreto de sódio em refluxo a 125 °C por 180 min. O sólido preto formado (OGR), foi

filtrado e lavado diversas vezes com água deionizada, posteriormente seco a 100°C em estufa por 24 horas.

Os nanotubos de carbono foram funcionalizados pelo laboratório de pesquisa NuPe da Universidade Federal de Uberlândia, fluxograma 2B, a partir da mistura de 1100 mg nanotubos de carbono de parede múltiplas com 1,2 L de uma solução 3:1 de ácido sulfúrico e ácido nítrico concentrados. Essa mistura foi levada ao ultrassom por 6 h a 40 °C para introduzir os grupos de ácido carboxílico na superfície dos nanotubos de carbono de parede múltiplas. Após o resfriamento à temperatura ambiente, adicionou-se 3 L de água deionizada fria e a suspensão resultante foi então filtrada à pressão reduzida. Então os nanotubos de carbono de múltiplas camadas retidas no filtro foram lavados com água deionizada e levados à secagem em estufa por 8 h a 80 °C.

Fluxograma 2: (A) Síntese do OGR (B) Síntese no NTC funcionalizado.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2020).

3.4 MODIFICAÇÃO COM OGR E/OU NTC

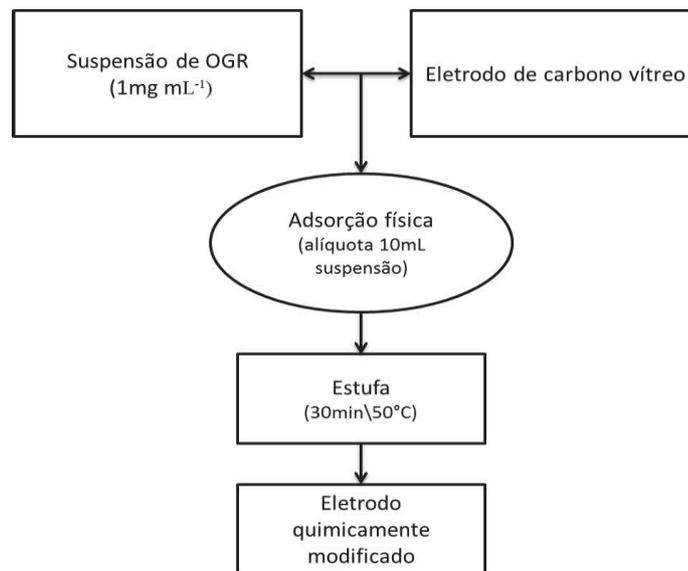
Neste trabalho todos os sensores foram preparados tendo como eletrodo base o carbono vítreo com diâmetro de 3mm, figura 7A.

Primeiramente, foram realizadas a limpeza e condicionamento da superfície do eletrodo. Este processo consistiu no polimento do eletrodo em uma suspensão de alumina (0,3 μm), lavagem com água deionizada, sonicação com solução de etanol e água na proporção 1:1 durante 5 minutos, e posteriormente secagem com pano limpo.

Em seguida, 2 mg de OGR e 2 mL de DMF foram adicionados a um *eppendorf*, e este foi deixado em banho ultrassom por aproximadamente 30 minutos para o preparo da dispersão

de OGR ($\sim 1 \text{ mg L}^{-1}$). Após esse tempo (fluxograma 3), com o auxílio de uma micropipeta, uma alíquota de $10 \text{ }\mu\text{L}$ da dispersão, foi transferida para a superfície do eletrodo de carbono vítreo e posteriormente o eletrodo foi levado à estufa à $50 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 minutos para a evaporação do solvente. Após este processo, foi possível observar a modificação do eletrodo, já que o material carbônico depositado na superfície formou uma fina camada ao longo da superfície ativa e do polímero base do mesmo, figura 7B.

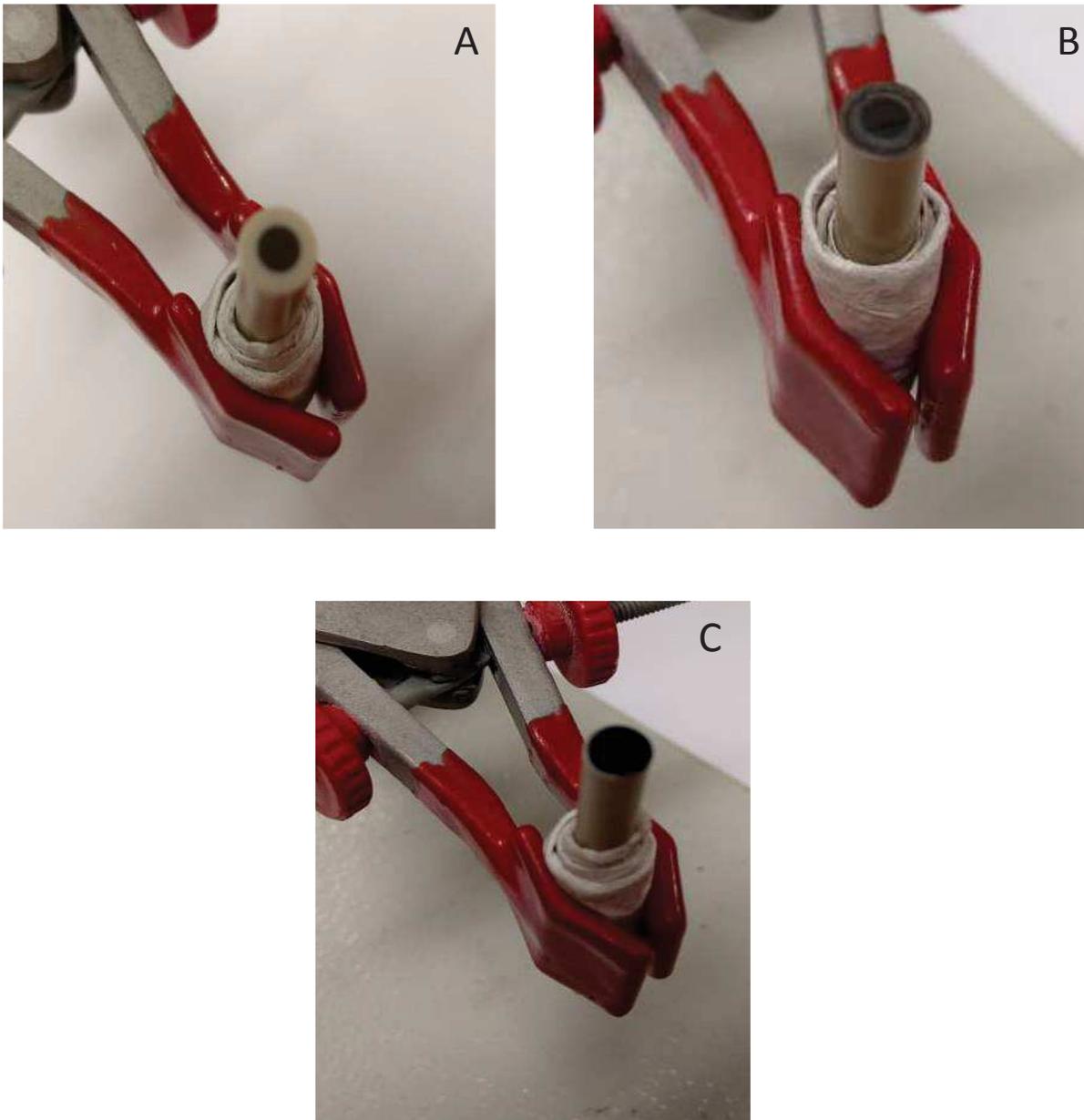
Fluxograma 3: Modificação química com OGR do eletrodo de carbono vítreo limpo.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2020).

O preparo do sensor a base de MWCNT, figura 7C, seguiu as mesmas etapas que o sensor a base de OGR contidas no fluxograma 3 (MASIKINI et al., 2019; YANG et al., 2016).

Figura 7. (A) Eletrodo limpo; (B) Eletrodo modificado com OGR; (C) Eletrodo modificado com MWCNT.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2020).

3.5 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAS

Os materiais no estado sólido (OG, OGR e MWCNT) foram caracterizados por espectroscopia Raman, utilizando um espectrômetro Raman dispersivo da marca Bruker, modelo Senterra. Para obtenção dos espectros de OGR e MWCNT utilizou-se como radiação excitante a linha 633 nm de um laser de He/Ne, no estado sólido, com potência de saída de 20

mW. Os dados espectrais foram coletados usando uma objetiva de magnificação de 50x, resolução de 3-5 cm^{-1} e tempo de integração de 60 segundos.

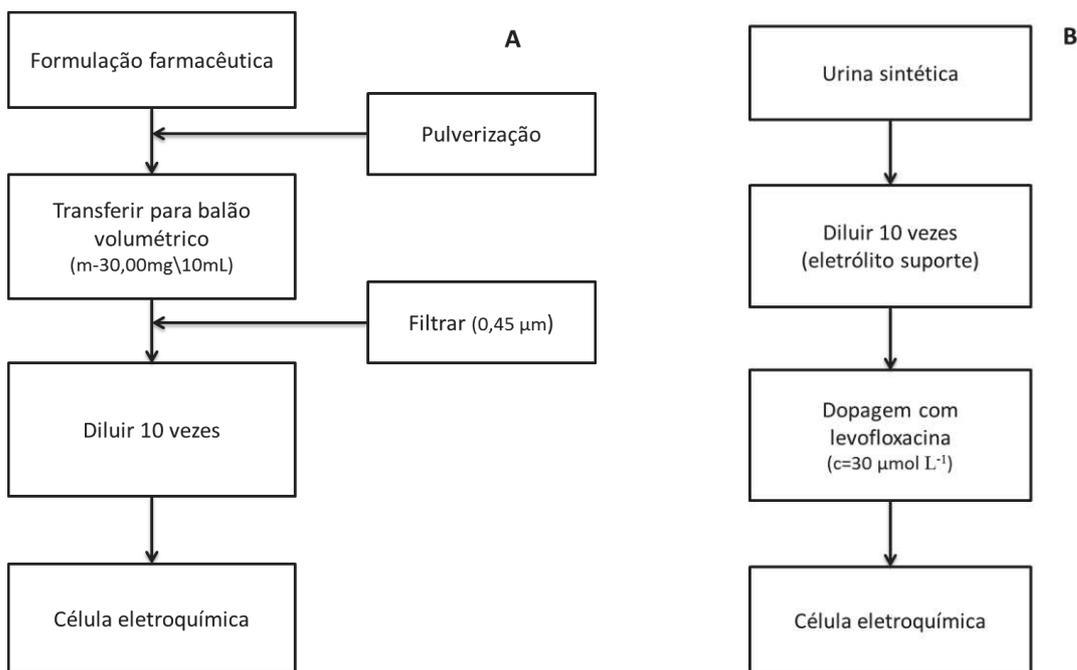
3.6 AQUISIÇÃO E PREPARO DAS AMOSTRAS FARMACÊUTICAS E URINA SINTÉTICA

As amostras farmacêuticas foram cedidas por pacientes que estavam fazendo o uso do antibiótico levofloxacina, e o mesmo segundo a bula do fabricante apresenta 500 mg do princípio ativo.

O tratamento da amostra de comprimido seguiu os passos contidos no fluxograma 4A. Primeiramente, a mesma foi previamente pulverizada com o auxílio de um almofariz e pistilo, então uma alíquota de 30 mg do fármaco foi transferida para um balão volumétrico de 10,00 mL, o mesmo foi dissolvido e homogeneizado e completou-se o volume utilizando uma solução de tampão BR ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$; pH 2). Posteriormente, a solução foi filtrada em filtro de $0,45 \mu\text{m}$ e diluída 10 vezes. Estudos de fortificação e recuperação foram realizados com concentrações de 20, 50, 25 e $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ de levofloxacina para os métodos utilizando a VPD, VOQ, FIA-AMP e BIA-AMP respectivamente.

O preparo da amostra de urina sintética, fluxograma 4B, envolveu uma simples diluição (10 vezes) em eletrólito suporte tampão BR ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$; pH 6). Durante o processo de diluição as amostras foram intencionalmente contaminadas com a concentração final de $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ de levofloxacina. Os processos de dopagens durante o desenvolvimento de novos métodos são amplamente descritos na literatura (AL-AFY et al., 2018; BOROWIEC et al., 2015).

Fluxograma 4: Preparo de amostras:(A) Formulações farmacêuticas; (B) Urina sintética.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2020)

3.7 ESTUDOS ELETROQUÍMICO DA LEVOFLOXACINA POR VOLTAMETRIA CÍCLICA, VPD, VOQ, FIA-AMP E BIA-AMP.

Experimentos iniciais com a voltametria cíclica utilizando os diferentes sensores eletroquímicos na presença de levofloxacina foram realizados com intuito de verificar qual o que apresentava a melhor resposta analítica para a levofloxacina. Além disso, a mesma foi empregada para a otimização do pH do eletrólito suporte e para o estudo do transporte de massa.

À determinação de levofloxacina em formulações farmacêuticas foram desenvolvidas metodologias utilizando VPD, VOQ, FIA-AMP e BIA-AMP. Parâmetros relacionados à VPD (tempo de acumulação, amplitude e incremento de potencial), VOQ (tempo de acumulação, amplitude, frequência e incremento de potencial), FIA-AMP (potencial, alça de amostragem e vazão do fluxo) e BIA-AMP (potencial, volume de amostra e velocidade de injeção) foram otimizados. Subsequente foi utilizada o método desenvolvido, previamente, desenvolvido por FIA-AMP e BIA-AMP, para a determinação de levofloxacina em amostras de urina.

3.8 DETERMINAÇÃO DA LEVOFLOXACINA POR UFLC (MÉTODO OFICIAL)

O cromatógrafo da marca Shimadzu, modelo Prominence UFLC, equipado com software LC solution, coluna C18 Shim-Pack XR-ODS (3,0 mm x 75 mm, 2,2 μm), amostrador automático (SIL-20A UFLC) e detector espectrofotométrico UV-Vis (SPD-20A UFLC) foi utilizado para a validação dos resultados obtidos pelas técnicas eletroquímicas em relação à amostra de formulação farmacêutica. As condições de análise para a determinação de levofloxacina foram: eluição isocrática na proporção (20:80; pH 2,5) metanol/ácido fosfórico, comprimento de onda de 350 nm, volume de injeção de 10 μL e vazão de 1,00 mL min^{-1} . A amostra de fármaco foi dissolvida diretamente em fase móvel e depois filtrada em filtro de membrana PTFE com porosidade de 0,45 μm .

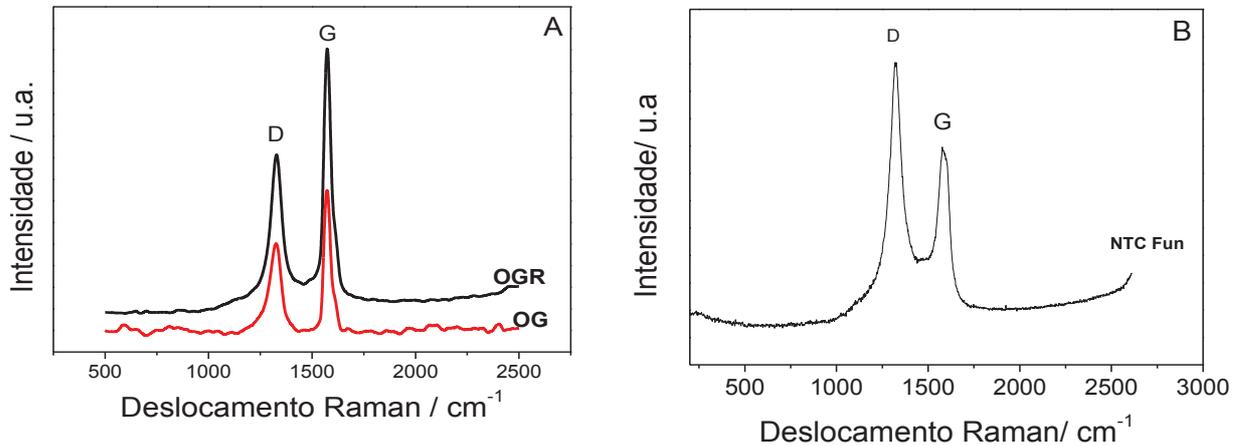
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS

A espectroscopia Raman é uma importante ferramenta na predição da qualidade e na quantidade de defeitos estruturais, tais quais, formação de vacâncias nas estruturas, inserção de heteroátomos e impurezas ricas em carbonos de hibridização sp^3 . Entretanto devido à natureza ressonante da excitação não é possível quantificar a funcionalização, e a mesma tem apenas um caráter qualitativo (LIMA, 2007).

O OGR e o MWCNT foram caracterizados por espectroscopia Raman. Na figura 8A estão representados os espectros do OG e do OGR, nela observam-se duas bandas (D e G). A banda D (1350 cm^{-1}) está relacionada a defeitos estruturais (ligações do tipo sp^3 e sp), presença de heteroátomo e/ou ligações incompletas e a banda G (1650 cm^{-1}) está relacionado a presença de carbono sp^2 (YIĞIT et al., 2016). Após a redução química do OG com borohidreto foi possível perceber o aumento da intensidade relativa de 10 % referente à banda G, o que indica que houve uma recuperação dos carbonos hibridizados em sp^2 , resultando em um material com propriedades elétricas mais atrativas na construção de sensores a base de OGR (FARIA et al., 2019b). Na figura 8B está representado o espectro referente ao NTC funcionalizado (no presente trabalho utilizou-se a MWCNT), e também foi possível observar as mesmas duas bandas encontradas no espectro obtido (D e G), e em termos de intensidade a banda G é um parâmetro indicativo de que a funcionalização aconteceu de forma bem sucedida (FLAHAUT; LAURENT; PEIGNEY, 2005).

Figura 8. Espectros Raman dos materiais sólidos obtidos utilizando um laser de He/Ne (633nm) com potência de saída de 20 mW, objetiva de magnificação de 50x, resolução de 3-5 cm^{-1} e tempo de integração de 60 segundos. (A) OG e OGR; (B) MWCNT funcionalizado.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor (2020)

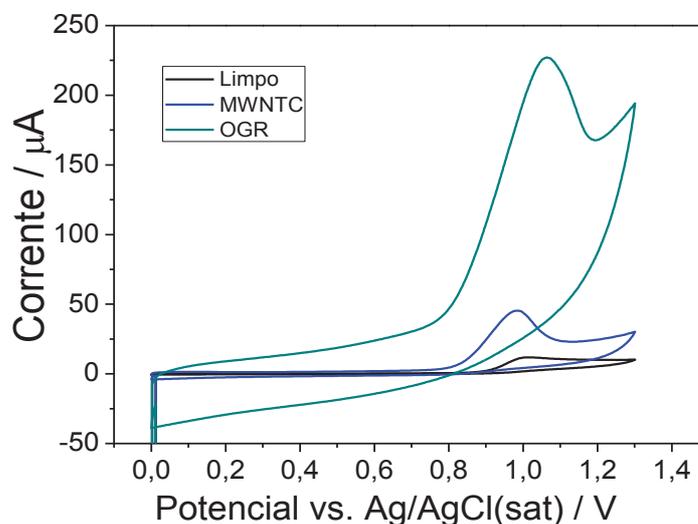
4.2 ESTUDO ELETROQUÍMICO DA LEVOFLOXACINA

4.2.1 Estudo exploratório da levofloxacin por voltametria cíclica.

4.2.1.1 Comportamento eletroquímico da levofloxacin em diferentes sensores

O primeiro estudo consistiu em avaliar a resposta eletroquímica da levofloxacin nos diferentes sensores (OGR e/ou MWCNT), utilizando uma concentração de levofloxacin na célula eletroquímica de $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ em meio de eletrólito suporte, tampão BR ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6). A figura 9 mostra os voltamogramas cíclicos de cada um dos eletrodos estudados para a determinação da levofloxacin.

Figura 9. Voltamogramas cíclicos para diferentes sensores (eletrodo base + modificador) em meio a tampão BR ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6) para $200 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de levofloxacin. Velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} .



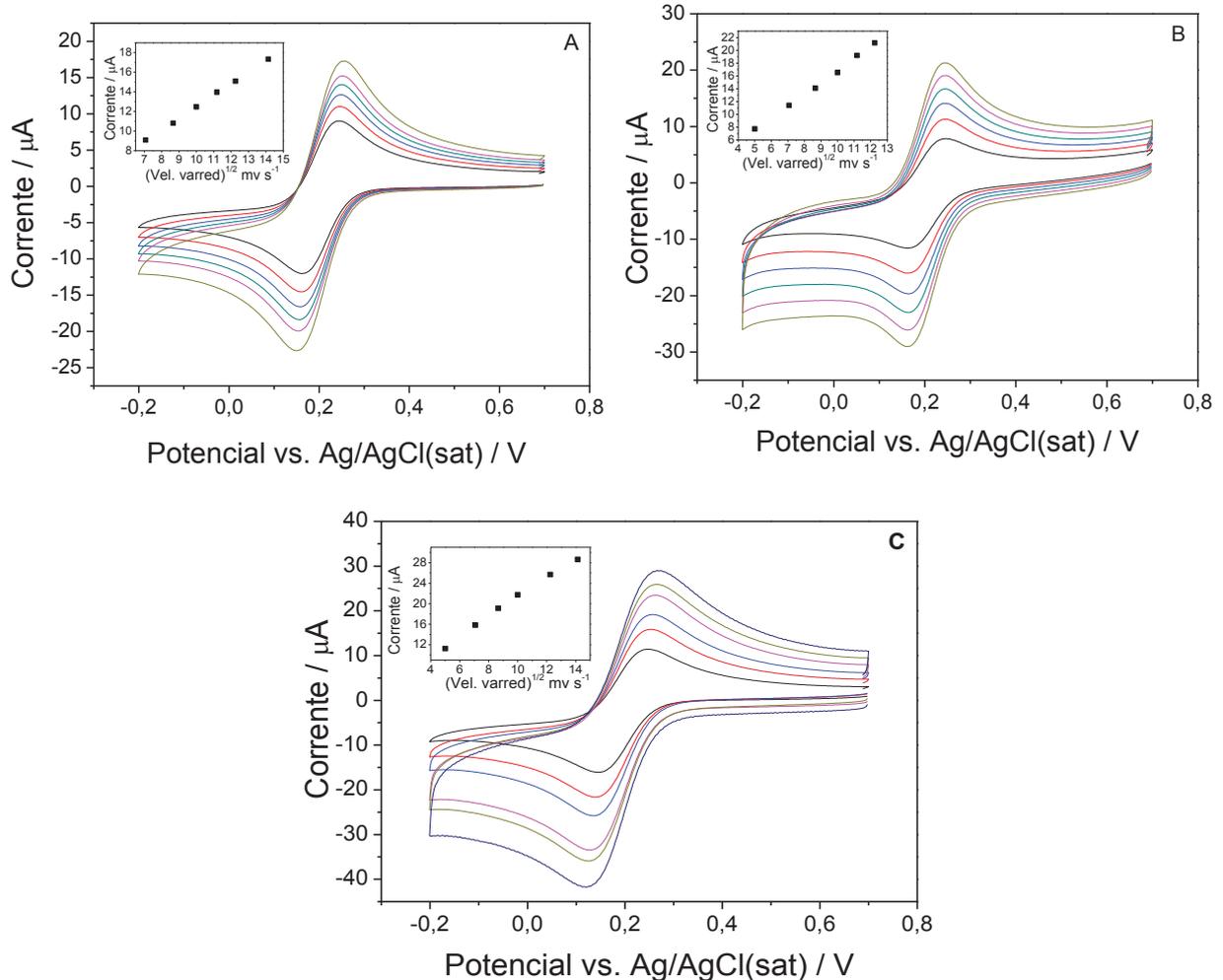
Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2020).

A partir da figura 9, verifica-se que o potencial de oxidação referente a levofloxacin sobre a superfície dos três eletrodos estudados (limpo, OGR, MWCNT), foram de +1,00 V, +1,06 V e +0,98 V, respectivamente. O sinal analítico do eletrodo modificado com OGR foi vinte vezes maior que o eletrodo limpo, o que demonstra a sua potencialidade a cerca de sua atividade electrocatalítica, enquanto que o eletrodo modificado com MWCNT apresentou ganho de sinal analítico na ordem de cinco vezes com relação ao eletrodo limpo de carbono vítreo.

4.2.1.2 Determinação das áreas electroativas do eletrodo do eletrodo de carbono vítreo limpo e modificado com MWCNT e OGR

As áreas electroativas do eletrodo de carbono vítreo limpo e dos sensores com os respectivos modificadores MWCNT e OGR foram determinadas em uma célula electroquímica contendo $1,00 \text{ mmol L}^{-1}$ de ferricianeto de potássio em meio de cloreto de potássio 100 mmol L^{-1} . Os voltamogramas cíclicos do ferricianeto de potássio foram obtidos utilizando diferentes velocidades de varredura ($25\text{-}200 \text{ mV s}^{-1}$), as quais geraram incrementos na corrente de pico, como pode ser observado na figura 10A referente ao eletrodo limpo, 10B ao eletrodo modificado com MWCNT e 10C referente ao eletrodo modificado com OGR.

Figura 10. Voltamogramas cíclicos da solução de ferricianeto de potássio 1,00 mmol L⁻¹ em meio de KCl (0,10 mol L⁻¹) variando a velocidade de varredura de (25-200) mV s⁻¹, utilizando o eletrodo de carbono vítreo: (A) Limpo, (B) modificado com MWCNT e (C) modificado com OGR.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2020)

A equação de Randles-Sevcik (equação 1) auxilia na determinação das áreas eletroativas dos sensores, tendo em vista que o sistema ferricianeto/ferrocianeto de potássio tem o comportamento bem descrito na literatura. O processo redox envolve a participação de um elétron ($n = 1$), conhecendo o coeficiente de difusão ($D = 6,39 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) e a concentração ($C = 1,00 \times 10^{-6} \text{ mol cm}^{-3}$) do sistema $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

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

Onde I_p é a corrente de pico, n é o número de elétrons envolvidos na reação, C é a concentração da espécie eletroativa, D é coeficiente de difusão, v é a velocidade de varredura e por fim o A é a superfície eletroativa do eletrodo.

A corrente de pico varia em função da velocidade de varredura e os demais parâmetros são fixos e conhecidos, é possível determinar a área eletroativa do eletrodo relacionando o coeficiente angular com a área eletroativa do sensor analítico, equação 1, com as equações obtidas experimentalmente. Os valores referente aos coeficientes experimentais para os diferentes sensores encontra-se na tabela 1, bem como os valores referentes as áreas eletroativas encontradas.

Tabela 1. Resultados experimentais referentes à superfície eletroativa do eletrodo de trabalho para cada modificador utilizado.

Eletrodo de trabalho	Coeficiente angular (mol cm s ⁻¹ 10 ⁻⁵)	Área eletroativa (mm ²)
Limpo (CV)	3,72	5,51±0,50
CV-MWCNT	4,84	7,13±0,39
CV-OGR	5,78	8,82±0,42

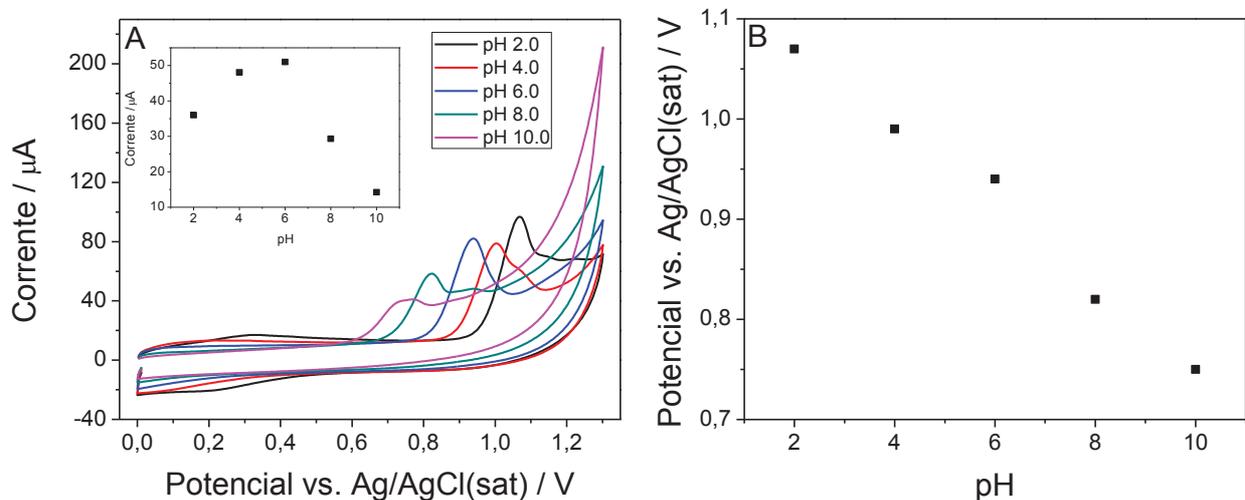
Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2020)

Em termos de ganho de área eletroativa, tabela 1, o eletrodo CV-MWCNT frente ao eletrodo limpo teve um ganho de 29 %, enquanto que o eletrodo de CV-OGR apresentou um ganho de 60 %. A partir dessa diferença, em termos de ganho de área eletroativa, foi observada a notória diferença entre os modificadores com relação ao ganho de sensibilidade conferida por cada um deles, sendo assim, foi selecionado o eletrodo modificado com OGR para os demais estudos envolvendo a levofloxacina.

4.2.1.3 Otimização do pH do meio e estudo do transporte de massa da levofloxacina.

A otimização do pH do meio compreendeu a faixa estudada de 2 a 10 na escala de pH, sendo utilizado para tal estudo o tampão BR 0,04 mol L⁻¹, o qual apresenta capacidade tamponante em toda faixa estudada no presente trabalho. Os voltamogramas cíclicos obtidos, figura 11A, mostram uma dependência do sinal analítico gerado pela oxidação da levofloxacina com o pH do meio, mecanismo pH-dependente.

Figura 11. (A) Voltamogramas obtidos a partir da variação do pH (2 a 10) e (B) Potencial vs. Ag/AgCl(sat) / V x pH, para a resposta eletroquímica da levofloxacin 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ utilizando o sensor a base de OGR em meio de tampão BR (0,04 mol L⁻¹).



Fonte: Elaborada pelo próprio autor (2020).

A figura 11A mostra o deslocamento do potencial no sentido catódico à medida que o pH aumenta, ou seja, em meio alcalino o potencial necessário para a oxidação da levofloxacin é menor, o que agrega seletividade às análises. Entretanto, o maior sinal analítico (corrente) ocorreu em pH igual a 6. A partir dessas informações, o pH 6 foi selecionado para os próximos estudos, visto que em meio fortemente alcalino há um decréscimo significativo da sensibilidade do sensor utilizado.

O coeficiente angular obtido no ajuste linear da figura 11B apresentou um valor experimental de -0,0582 o que condiz com o comportamento nernstiano [$-0,0592 \times (N_p/N_e)$; pH *versus* potencial/V], onde N_p é o número de prótons e N_e é o número de elétrons, ou seja, para esse sistema o número de elétrons e prótons envolvidos na reação de oxidação da levofloxacin são iguais (ALBERTS; SHAIN, 1963).

O transporte de massa de levofloxacin sobre a superfície do eletrodo foi estudado para o sensor modificado com OGR, variando a velocidade de varredura de 25 a 250 mV s^{-1} em uma célula eletroquímica contendo 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de levofloxacin em tampão BR 0,04 mol L⁻¹, pH 6. Conforme mostrado na figura 12A, o eletrodo modificado com OGR apresentou aumento proporcional da corrente x velocidade de varredura, indicando que o processo no meio reacional é controlado por adsorção. Isto sugere que a formação de uma fina camada de OGR sobre o eletrodo base, de caráter rugoso, tem a capacidade de aprisionar

espécies de levofloxacin em seu interior, o que promove ganhos em termos de sensibilidade, e corrobora com os resultados reportados na literatura (ROCHA et al., 2018).

Além disso, foi possível observar uma relação linear entre a variação do logaritmo da velocidade de varredura com o potencial de pico ($E_p \times \log v$), ou seja, o potencial é deslocado para valores mais positivos com o aumento da velocidade de varredura. O segmento linear da curva $\log v \times E_p$ está relacionado com a teoria descrita por Laviron em 1979, que sugere uma relação linear entre o $\log v \times E_p$ em velocidades de varreduras relativamente altas, permitindo-nos determinar parâmetros cinéticos e também o número de elétrons envolvidos na reação (MARCO et al., 2015). A partir do ajuste linear dos pontos contidos na figura 12B foi obtida a equação 2:

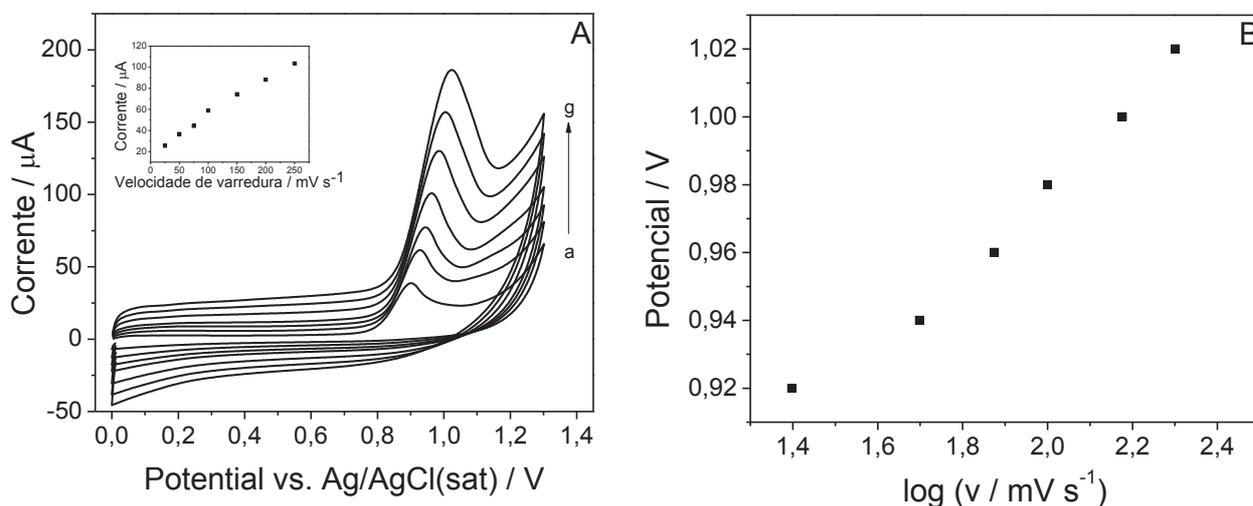
$$E_p(V) = 0,982 + 0,065 \log v (V \cdot s^{-1}); R^2 = 0,988 \text{ (Equação 2)}$$

A equação pode ser descrita da seguinte forma segundo Laviron (Equação 3) (LAVIRON, 1979):

$$E_p(V) = A + \frac{2,30RT}{(1-a)nF} \log v (V \cdot s^{-1}); \text{ (Equação 3)}$$

O coeficiente linear (A) está relacionado ao potencial formal do eletrodo E_0 , a é o coeficiente de transferência eletrônica, n é o número de elétrons envolvidos na reação R, T e F são as constantes do gás, temperatura e constante de Faraday, respectivamente.

Figura 12. (A) Voltamogramas obtidos a partir do estudo de transporte de massa envolvendo a oxidação da levofloxacin 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ utilizando o sensor a base de OGR em meio de tampão BR (0,04 mol L^{-1} , pH 6) variando a velocidade de varredura de 25 a 250 mV s^{-1} . (B) potencial de oxidação x logarítmico da velocidade de varredura.

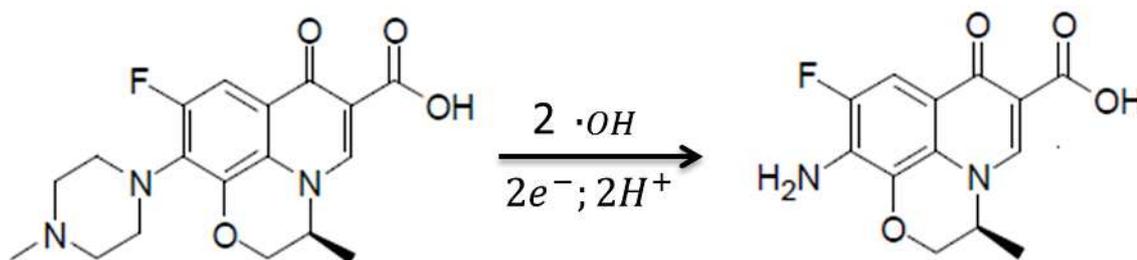


Fonte: elaborada pelo próprio autor (2020)

Ao igualar os coeficientes angulares da equação 2 e 3 foi possível determinar o número de elétrons envolvidos na reação de oxidação da levofloxacin ($\alpha = 0,5$, segundo Laviron para processos adsorptivos). O valor de n obtido foi de 1,77, ou seja, o processo de oxidação da levofloxacin envolve $2e^-$ e $2H^+$.

A figura 13 mostra um possível mecanismo de oxidação para levofloxacin na porção piperazina, a partir de dois processos sucessivos de hidroxilação, removendo o mesmo. O processo de oxidação condiz com o reportado na literatura por (LIU et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2015).

Figura 13. Reação de oxidação proposta para a levofloxacin.

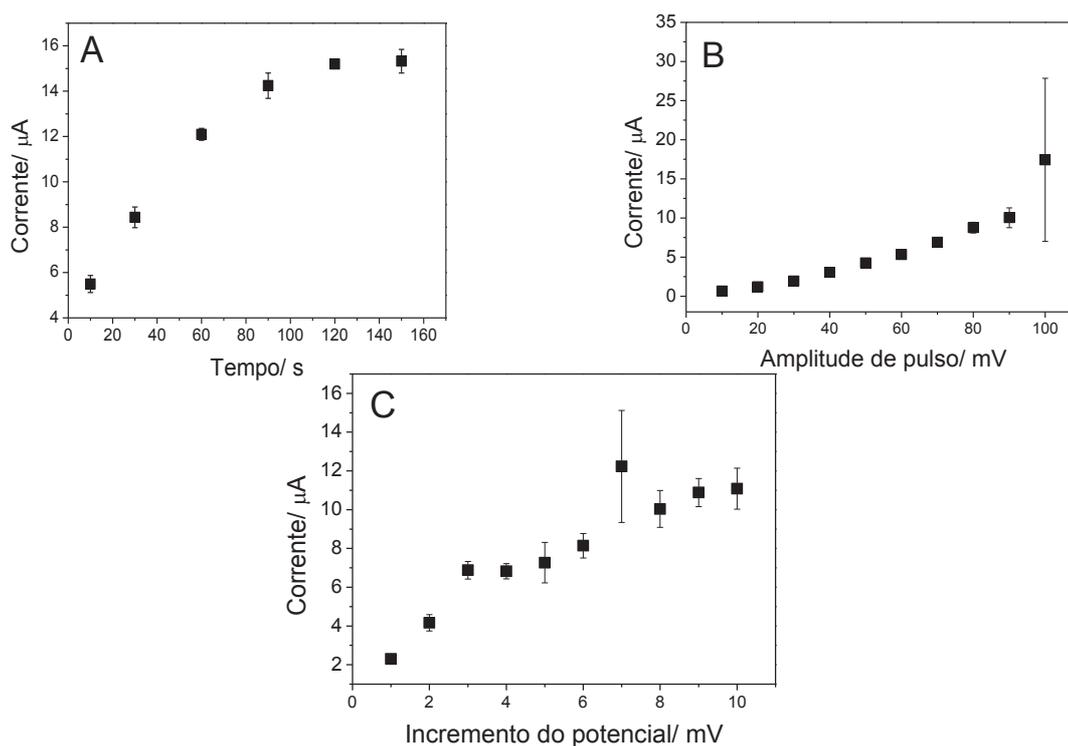


Fonte elaborada pelo próprio autor (2020).

4.2.2 Determinação da levofloxacin por voltmetria de pulso diferencial utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com OGR.

A primeira metodologia analítica desenvolvida foi baseada na voltmetria de pulso diferencial, os parâmetros envolvendo a técnica (tempo de deposição, amplitude, incremento de potencial) foram otimizados em triplicata de forma univariada na concentração de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de levofloxacin na célula eletroquímica. A figura 14 representa cada parâmetro otimizado em função do sinal analítico.

Figura 14. Resultados obtidos a partir da otimização do (A) tempo de deposição, (B) amplitude de potencial e (C) incremento de potencial, referente à determinação de levofloxacin (concentração $50 \mu\text{mol L}^{-1}$) por voltmetria de pulso diferencial em uma célula eletroquímica utilizando o sensor a base de OGR em meio de tampão BR ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$).



Fonte: elaborada pelo próprio autor (2020).

O primeiro parâmetro otimizado foi o tempo de acumulação do material na superfície do eletrodo, durante esse tempo o sistema foi submetido à agitação constante para proporcionar um acentuado transporte de massa convectivo. A resposta analítica foi crescendo proporcionalmente com o aumento do tempo, figura 14A. No entanto, após 90 segundos de agitação não houve aumento significativo da resposta analítica em função do tempo. Neste sentido, foi selecionado um tempo de acumulação igual a 60 segundos, que apesar de não

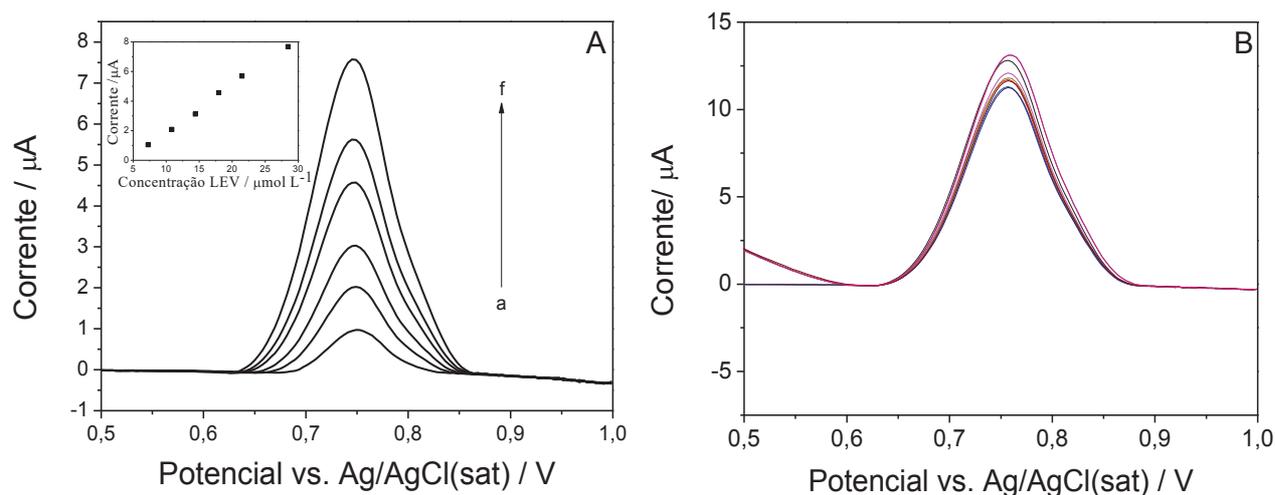
apresentar o maior sinal analítico, conferiu ao método uma frequência analítica desejada, além de adequada precisão.

O próximo parâmetro otimizado foi à amplitude de pulso, o qual está relacionado com a magnitude do sinal analítico e a resolução dos picos gerados durante o processo de oxidação da levofloxacina. O intervalo estudado foi de 10-100 mV. A partir da figura 14B foi possível observar um ganho do sinal analítico conforme se aumentava a amplitude de pulso. Entretanto após 70 mV de amplitude ocorreu uma perda considerável de precisão e resolução entre as medidas. Dessa forma o valor otimizado para a amplitude de pulso foi de 70 mV.

Por fim, foi realizado a otimização do incremento de potencial, o qual está associado a velocidade de varredura do método desenvolvido. O incremento de potencial foi estudado num intervalo de 1 a 10 mV. Ao observar a figura 14C é possível perceber um aumento significativo até 4 mV, a partir deste valor o sinal apresentou perdas significativas em termos de precisão entre as replicatas, sendo o mesmo fixado como valor ótimo.

A partir dos parâmetros previamente otimizados foi possível construir a curva analítica para o método desenvolvido na determinação de levofloxacina por voltametria de pulso diferencial. Os voltamogramas referentes à curva analítica estão representados na figura 15A, a faixa de concentração de levofloxacina variou de 7 a 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($I_p = 3,20 C_{\text{levofloxacina}} (\mu\text{mol L}^{-1}) - 1,32$) o qual apresentou um coeficiente de correlação (r^2) de 0,996. A figura 15B representa um estudo de repetibilidade, a fim de verificar a precisão na resposta do eletrodo modificado com OGR. A concentração de levofloxacina na célula foi de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em meio a tampão BR (0,04 mol L^{-1} , pH 6) e o número de experimentos realizados foram iguais a 10. Foi obtido um desvio padrão relativo (RSD) de 5,31 %, o que demonstrou uma boa precisão entre as medidas e que a integridade física da modificação realizada sobre o eletrodo base não se perdeu ao longo das análises durante um dia de trabalho.

Figura 15. (A) Voltamogramas de pulso diferencial referente às concentrações de levofloxacin na faixa de 7 a 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$, utilizando eletrodo modificado com OGR, tampão BR (0,04 mol L^{-1} , pH 6) (B) Estudo de repetibilidade do sensor desenvolvido utilizando uma concentração de levofloxacin de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, tampão BR (0,04 mol L^{-1} , pH 6). Condições instrumentais: tempo de acumulação 60 s, amplitude de pulso 70 mV e incremento de potencial 4 mV.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor (2020).

As figuras de mérito [limite de detecção (L.D.) e limite de quantificação (L.Q.)] foram calculados utilizando a curva analítica obtida na faixa de concentração de 7 a 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de levofloxacin, segundo a recomendação da IUPAC (DANZER; CURRIET, 1998). O L.D. e L.Q. são obtidos a partir das equações 4 e 5.

$$L.D. = \frac{3x Sb}{S} \text{ (equação 4)} \quad L.Q. = \frac{10x Sb}{S} \text{ (equação 5)}$$

Onde sb é o erro associado ao coeficiente linear e S é o coeficiente angular.

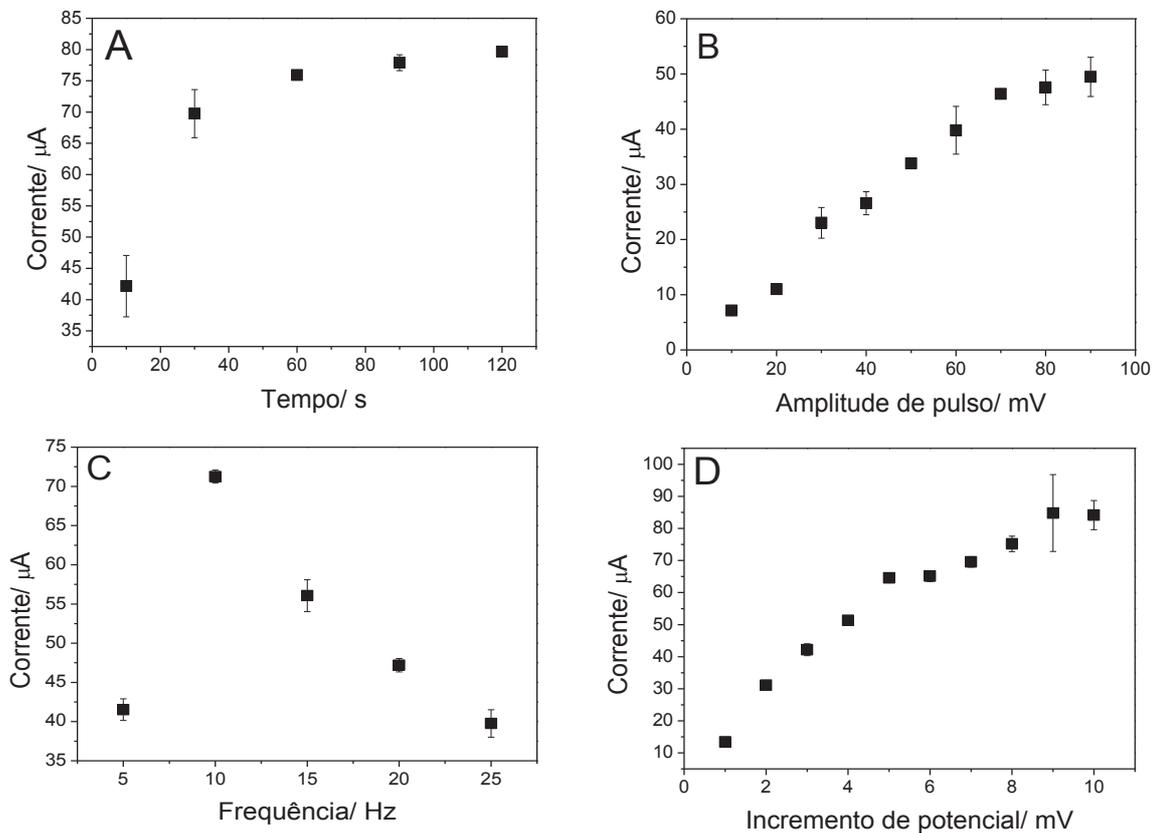
Os valores de L.D. e L.Q. foram de 1,45 e 4,84 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. A frequência analítica do método desenvolvido empregando VPD foi estimada em aproximadamente 25 análises por hora.

4.2.3 Determinação da levofloxacin por voltametria de onda quadrada utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com OGR

A otimização da metodologia desenvolvida utilizando a VOQ teve como objeto esudar os parâmetros instrumentais referentes à técnica eletroquímica (amplitude do pulso,

frequência e incremento de potencial) e o tempo de acumulação, tendo em vista que estudos preliminares no presente trabalho demonstrou que o transporte de massa das espécies de levofloxacin durante o processo oxidativo foi de caráter adsorptivo. As medidas experimentais foram realizadas em triplicata e o estudo referente a cada parâmetro está apresentado na figura 16.

Figura 16. Resultados obtidos para a otimização dos parâmetros instrumentais: (A) tempo de acumulação, (B) amplitude de pulso, (C) frequência e (D) incremento de potencial, referente à determinação de levofloxacin (concentração $50 \mu\text{mol L}^{-1}$) por voltametria de onda quadrada em uma célula eletroquímica utilizando o sensor a base de OGR em meio a tampão BR ($0,04 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 6).



Fonte: Elaborada pelo próprio autor (2020).

O primeiro parâmetro a ser otimizado foi o tempo de acumulação. A partir da figura 16A, foi possível observar um aumento do sinal analítico em até 60 segundos. Após este valor não houve aumento significativo do sinal analítico, dessa forma a condição ótima para o tempo de acumulação foi fixada em 60 segundos.

Em seguida, a amplitude da onda foi estudada em um intervalo de 10 a 90 mV, de acordo com a figura 16B é possível perceber um ganho significativo de sinal até 70 mV. Após esse valor os sinais analíticos em função da amplitude mostraram-se praticamente constantes e com baixa precisão. Desta forma a condição ótima para a amplitude foi fixada em 70 mV.

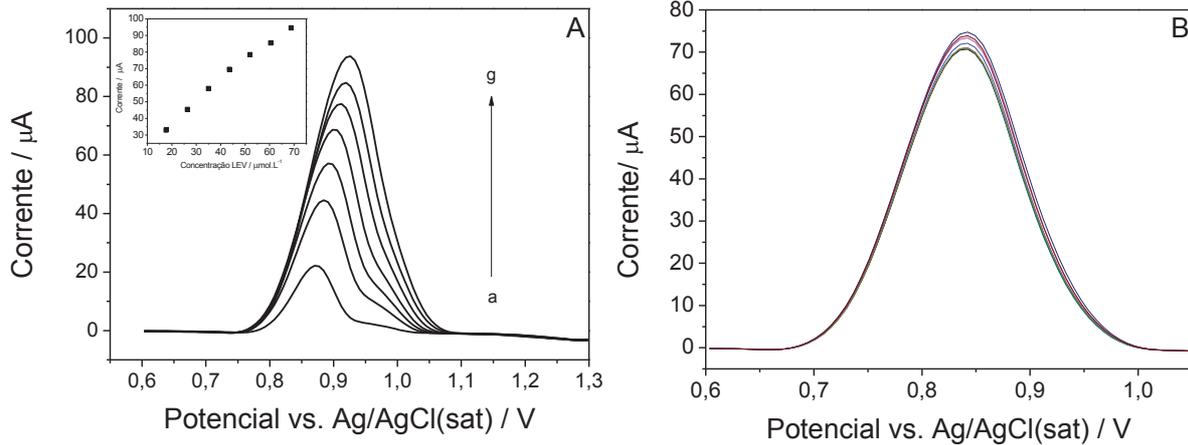
A frequência é um parâmetro exclusivo da VOQ e ela está relacionada à velocidade de varredura, assim como o incremento de potencial. A figura 16C mostra que o valor máximo encontrado entre a resposta analítica e a frequência foi de 10 Hz, depois desse valor a relação entre sinal analítico e frequência decresceu consideravelmente. Dessa forma a condição ótima para a frequência foi fixada em 10 Hz.

E por fim, o último parâmetro ajustado foi o incremento de potencial, conforme mostrado na figura 16D. O estudo abrangeu a faixa de 1 a 10 mV e mostrou um aumento significativo até 7 mV de incremento, a partir desse valor houve perda de precisão entre as medidas. Dessa forma a condição ótima para o incremento de potencial foi 7 mV, o que conferiu a análise uma velocidade de varredura de 70 mV s⁻¹.

Utilizando as condições previamente otimizadas foi construída uma curva analítica com concentrações de levofloxacina na faixa de 17 a 70 μmol L⁻¹ ($I_p = 1,19 C_{\text{levofloxacina}} (\mu\text{mol L}^{-1}) - 14,45$). Os voltamogramas de onda quadrada referente à curva analítica estão apresentados na figura 17A. O coeficiente de correlação foi de 0,991, enquanto que o L.D. e o L.Q. foram 6,70 μmol L⁻¹ e 20,40 μmol L⁻¹, respectivamente.

De maneira similar ao método desenvolvido anteriormente utilizando a VPD, também foi realizado um estudo de repetibilidade (n = 10) sob as condições previamente otimizadas utilizando 50 μmol L⁻¹ de levofloxacina, figura 17B. O RSD obtido foi igual a 1,86 %, mostrando uma boa precisão entre as análises. A frequência analítica do método desenvolvido empregando VOQ foi estimada em aproximadamente 30 análises por hora.

Figura 17. (A) Voltamogramas de onda quadrada referente às concentrações de levofloxacina na faixa de 17 a 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$, utilizando eletrodo modificado com OGR, tampão BR (0,04 mol L^{-1} , pH 6) (B) Estudo de repetibilidade do sensor desenvolvido utilizando uma concentração de levofloxacina de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, tampão BR (0,04 mol L^{-1} , pH 6). Condições instrumentais: tempo de acumulação 60 s, amplitude de pulso 70 mV, frequência 10 Hz e incremento de potencial 7 mV.

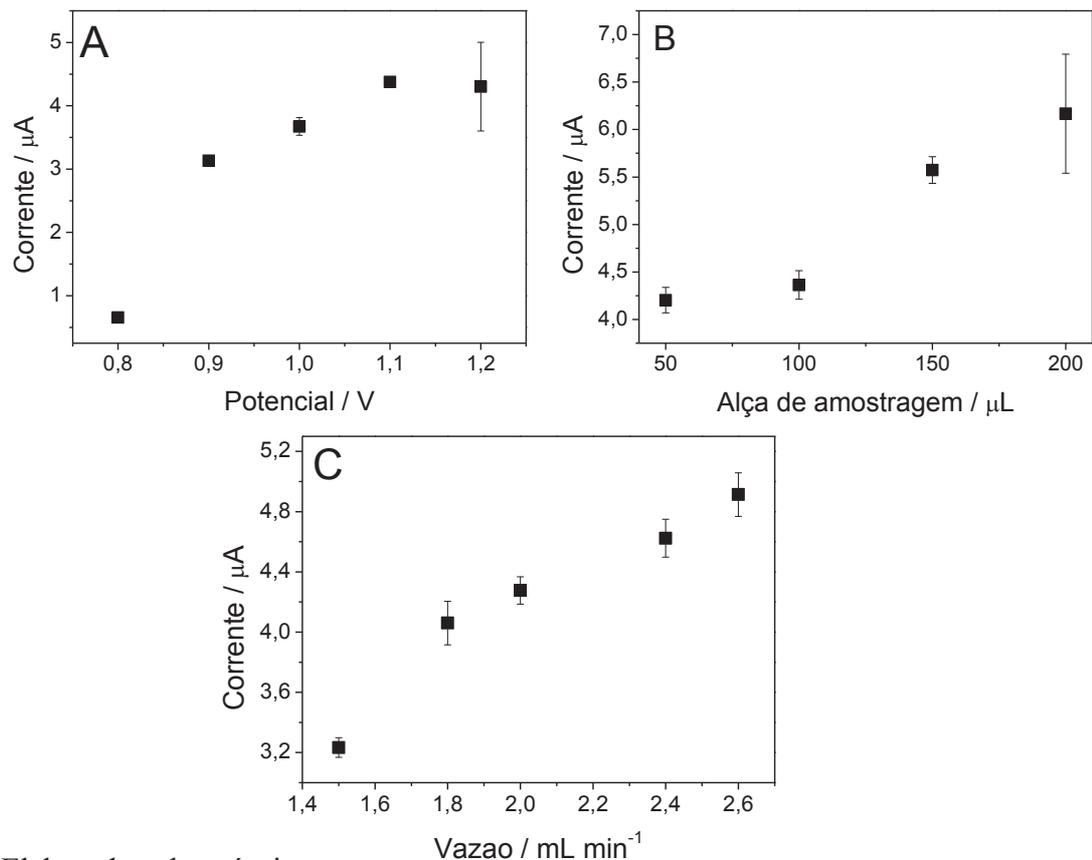


Fonte: Elaborado pelo próprio autor(2020).

4.2.4 Determinação da levofloxacina pelo sistema FIA-AMP

Para a determinação da levofloxacina pelo sistema FIA-AMP foram otimizados os parâmetros instrumentais do sistema (potencial de análise, volume da alça de amostragem e a vazão do fluxo), utilizou-se 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ levofloxacina, sendo todas as medidas realizadas em triplicata (figura 18).

Figura 18. (A) Variação do potencial para a oxidação da levofloxacin por amperometria na faixa de 0,8 a 1,2 V; alça de amostragem de 50 μL e vazão do fluxo 1,5 mL min^{-1} . (B) Variação do volume da alça de amostragem de 50 a 200 μL ; potencial de +1,1 V e vazão do fluxo 1,5 mL min^{-1} . (C) Variação da vazão do fluxo de 1,0 a 2,6 mL min^{-1} ; potencial de +1,1 V e alça de amostragem de 150 μL . Concentração de levofloxacin 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em meio a tampão BR (0,04 mol L^{-1} , pH 6).



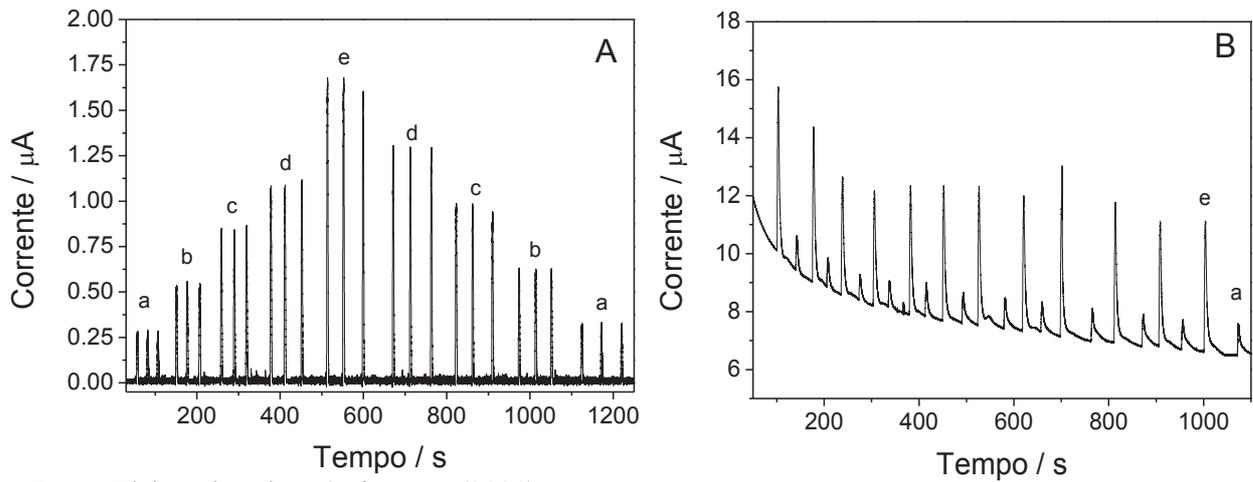
Fonte: Elaborada pelo próprio autor

O primeiro parâmetro otimizado foi o potencial de oxidação, figura 18A, o mesmo foi avaliado separadamente, já que o software NOVA 2.2.1 não possibilita a análise usando a amperometria por múltiplos pulsos. Os potenciais selecionados para a faixa de trabalho variaram de 0,8 a 1,2 V, tendo como base o potencial de oxidação da levofloxacin obtido nos estudos preliminares realizados por voltametria cíclica. Observou-se um aumento de sinal até o potencial de 1,1 V, após esse valor não houve ganho significativo em termos de sinal analítico, além da perda de precisão. Portanto, fixou-se o potencial ótimo em 1,1 V. Em seguida, a alça de amostragem foi otimizada, a partir da figura 18B é possível notar o aumento do sinal analítico frente ao volume introduzido no sistema. Entretanto, após o valor de 150 μL ocorreu um perda da precisão entre as medidas, logo o valor de 150 μL foi definido

como valor ótimo. E por fim, a vazão do fluxo do sistema FIA foi otimizada, a mesma foi variada em uma faixa de 1,5 a 2,6 mL min⁻¹ (figura 18C). Para valores de vazão baixos foi possível perceber picos alagados devido à dispersão do material ao longo do percurso analítico. À medida que aumentou a vazão, ocorreu um ganho significativo de corrente, nesse sentido, o valor otimizado para a vazão foi 2,0 mL min⁻¹, sendo que para valores mais elevados, houve perda de precisão.

Sob os parâmetros otimizados, foi possível a construção das curvas analíticas com incrementos crescentes e decrescentes de concentração de levofloxacina (9-45 μmol L⁻¹), para verificar a linearidade e o efeito de memória após sucessivas adições de padrão. O amperograma referente a esse estudo está sendo mostrado na figura 19A. As curvas crescentes (a-e), ($I_p = 0,036 C_{\text{levofloxacina}} (\mu\text{mol L}^{-1}) - 0,0172$) e decrescentes (e-a), ($I_p = 0,031 C_{\text{levofloxacina}} (\mu\text{mol L}^{-1}) - 0,014$) apresentaram um bom ajuste linear ($r^2 = 0,999$) e coeficientes angulares bem próximos, o que ressalta a não existência do efeito de memória após sucessivas adições do padrão de levofloxacina. Os L.D. e L.Q. apresentaram valores de 0,50 e 1,92 μmol L⁻¹, respectivamente. E por fim, um estudo de repetibilidade (n = 10) foi realizado em dois níveis de concentração 9,2 e 43,8 μmol L⁻¹ de levofloxacina (figura 19B), o RSD médio obtido foi de 7,0 % o que indica boa precisão em toda faixa de trabalho e que não houve contaminação da superfície do sensor utilizado. A frequência analítica do sistema FIA-AMP foi estimada em aproximadamente 100 análises por hora.

Figura 19. (A) Curva analítica com concentrações crescentes e decrescentes levofloxacina utilizando o método desenvolvido por FIA-AMP, (a) $9,2 \mu\text{mol L}^{-1}$, (b) $18 \mu\text{mol L}^{-1}$, (c) $27,1 \mu\text{mol L}^{-1}$, (d) $36,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ (e) $43,8 \mu\text{mol L}^{-1}$. (B) Estudo de repetibilidade ($n=10$) utilizando uma concentração de (a) $9,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ e (e) $43,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ de levofloxacina. Condições instrumentais: potencial $+1,1 \text{ V}$, alça de amostragem $150 \mu\text{L}$ e vazão do fluxo $2,0 \text{ mL min}^{-1}$ em meio a tampão BR ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH } 6$).

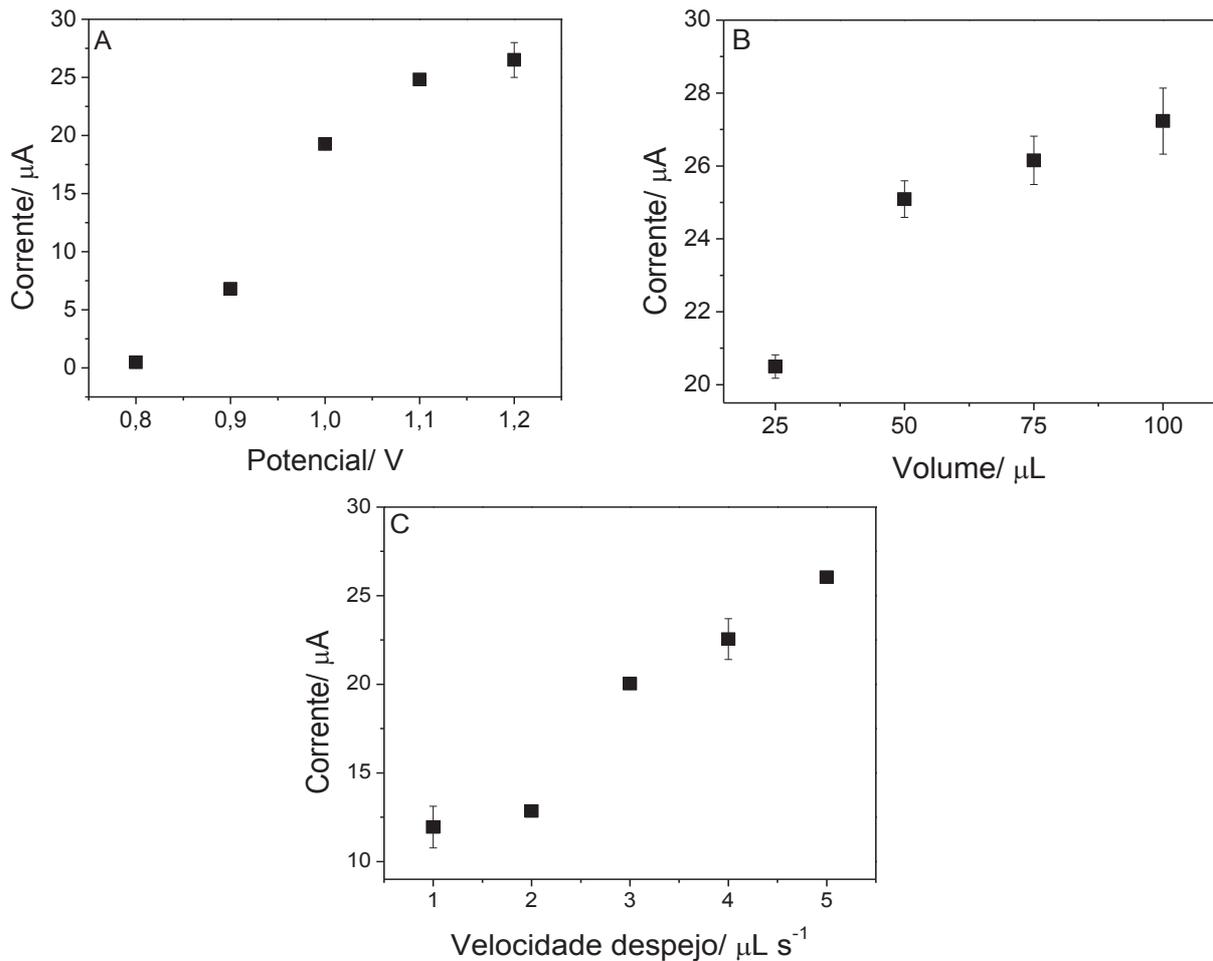


Fonte: Elaborada pelo próprio autor (2020).

4.2.5 Determinação da levofloxacina pelo sistema BIA-AMP

A determinação de levofloxacina utilizando BIA-AMP levou em consideração a otimização de parâmetros eletroquímicos (potencial redox) e instrumentais da técnica (volume de injeção da amostra e velocidade de injeção da amostra). A célula eletroquímica dispunha de uma concentração de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de levofloxacina, sendo todas as medidas realizadas em triplicata.

Figura 20. (A) Otimização do potencial de oxidação para a levofloxacin por BIA-AMP faixa de 0,8 a 1,2 V; volume de 50 μL de injeção do padrão e velocidade de despejo do padrão 3 (B) Otimização do volume de injeção de 1 a 5; potencial +1,1V e velocidade de despejo 3. (C) Otimização da velocidade de injeção do padrão de 25 μL a 100 μL ; potencial de +1,1 V e velocidade de despejo 5. Concentração de levofloxacin 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em meio a tampão BR (0,04 mol L^{-1} , pH 6).



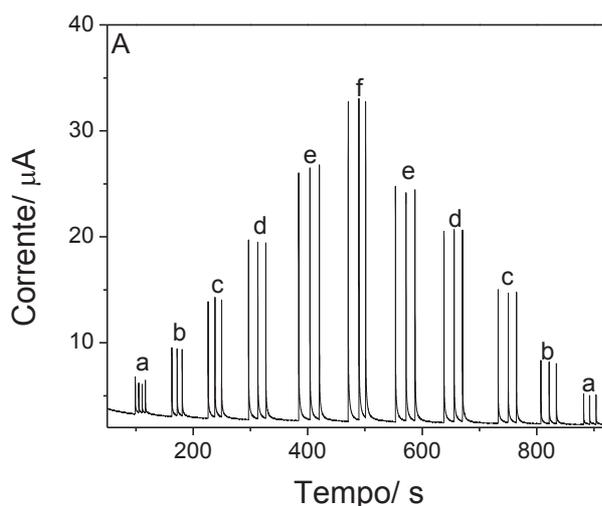
Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2020).

O primeiro parâmetro, novamente, a ser otimizado foi o potencial de oxidação da levofloxacin e todas as considerações realizadas utilizando o FIA-AMP também se aplicam para o BIA-AMP. Nesse sentido, o estudo envolvendo a oxidação da levofloxacin abrangeu a faixa de 0,8 V a 1,2 V; tendo como valor ótimo o valor, sinal analítico x potencial, o valor de 1,1 V (figura 20A). O próximo parâmetro otimizado (instrumental) foi o volume de amostra a serem despejados, os volumes variaram de 25-100 μL , a partir da figura 20B é possível perceber um aumento significativo até o volume de 50 μL , após esse valor a sensibilidade do método mostra-se inalterada além de perda significativa de precisão entre as medidas. E por

fim, o último parâmetro a ser otimizado foi à velocidade de injeção sob a superfície do eletrodo, o qual variou de 73,6 a 316,8 $\mu\text{L s}^{-1}$ ao nível do fabricante, pela figura 20C é possível definir o valor ótimo como 316,8 $\mu\text{L s}^{-1}$ (nível 5), já que a mesmo se mostrou mais sensível e preciso frente às demais velocidades de injeção.

As tendências observadas no sistema BIA-AMP são bastante semelhantes ao sistema FIA-AMP; no entanto, condições mais sensíveis são alcançadas no sistema BIA-AMP, devido a velocidades mais elevadas de injeção do analito que está correlacionado a proporcionalidade entre a transferência de massa das espécies eletroativas para a superfície eletroativa do eletrodo e o processo redox inerente ao analito.

Figura 21. (A) Curva analítica com concentrações crescentes e decrescentes levofloxacina utilizando o método desenvolvido por BIA-AMP, (a) 3,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (b) 11,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (c) 20,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (d) 31,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (e) 40,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (f) 50,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2020).

Após a realização das otimização inerentes ao BIA-AMP, aplicou-se os mesmos estudos realizados para o método desenvolvido por AMP-FIA, foi possível a construção das curvas analíticas com incrementos crescentes e decrescentes de concentração de levofloxacina (3-50 $\mu\text{mol L}^{-1}$). A figura 21A mostram ambas as curvas: crescente (a-f), ($I_p = 0,600 C_{\text{levofloxacina}} (\mu\text{mol L}^{-1}) - 0,218$) e decrescentes (f-a), ($I_p = 0,513 C_{\text{levofloxacina}} (\mu\text{mol L}^{-1}) - 0,146$) apresentaram um bom ajuste linear ($r^2 = 0,99$) e coeficientes angulares que diferem em menos de 10%, ou seja, não há contaminação entre as injeções realizadas. Os limites (L.D. e L.Q.) apresentaram valores de 0,33 e 0,92 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. O estudo de repetibilidade (figura 21B), também, abrangeu duas faixas de concentração (11,0 e 50,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$) de

levofloxacina, as medidas apresentaram variação (RSD) de 4,0 % o que corrobora a não evidência de contaminação do sensor utilizado. E por fim, a frequência do método foi estimada em aproximadamente 100 análises por hora.

4.2.6 Determinação da levofloxacina em formulações farmacêuticas e em urina sintética por voltametria de pulso diferencial, voltametria de onda quadrada e FIA/BIA com detecção amperométrica.

Primeiramente foi realizado um estudo comparativo entre as figuras de mérito dos métodos desenvolvidos no presente trabalho para a determinação da levofloxacina (Tabela 2) usando o eletrodo de carbono vítreo modificado com OGR.

Tabela 2. Comparação das figuras de mérito dos quatro métodos desenvolvidos para determinação de levofloxacina.

Figuras de mérito	VPD	VOQ	FIA-AMP	BIA-AMP
Faixa Linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	7-30	17-70	10-50	5-50
L.D. ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	1,45	6,7	0,5	0,3
Sensibilidade ($\mu\text{A L } \mu\text{mol L}^{-1}$)	3,20	1,19	0,03	0,60
Frequência (análises/hora)	25	30	100	100
%RSD (n=10)	5,31	1,86	7,0	4,0

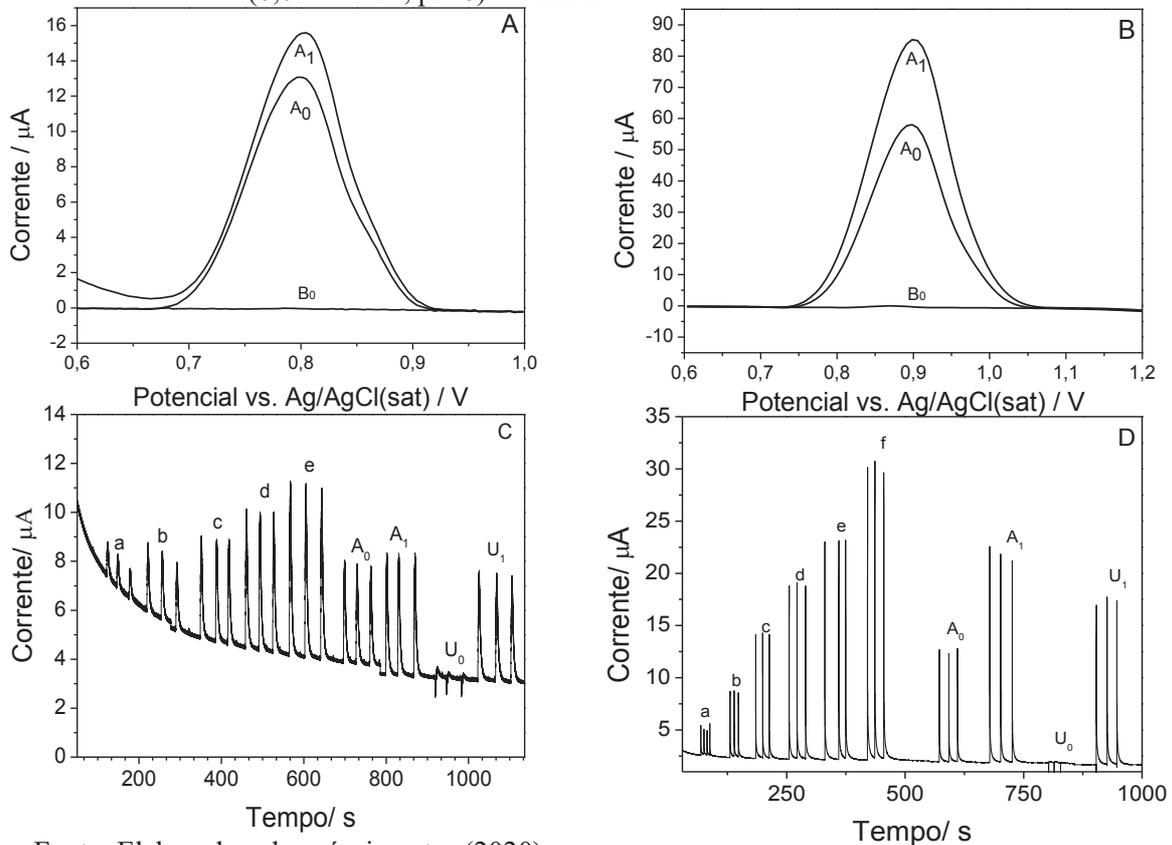
Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2020).

A partir da tabela 2, verificou-se que a faixa linear para os métodos desenvolvidos possuem a mesma ordem de grandeza. Os métodos estacionários (VOQ e VPD) mostraram-se mais sensíveis frente aos métodos dinâmicos (FIA-AMP e BIA-AMP), enquanto que os dinâmicos apresentaram melhor detectabilidade e maior frequência analítica. Assim, os métodos empregando FIA-AMP BIA-AMP mostraram valores satisfatórios para que fossem realizados análises de rotina à determinação de levofloxacina nas amostras de fármaco e urina sintética.

Inicialmente uma amostra de fármaco com teor de levofloxacina declarado no rótulo de 500 mg, foi analisada pelos quatro métodos eletroquímicos previamente desenvolvidos. As análises foram realizadas em triplicata, e posteriormente também foi realizado o estudo de adição e recuperação a fim de avaliar a exatidão do método (figura 22). Além dos métodos

empregando as técnicas eletroanalíticas, a amostra de fármaco foi analisada utilizando o UFLC. Os resultados obtidos estão dispostos na tabela 4, referente à técnica utilizada.

Figura 22. (A) Voltamograma obtido por VPD para a determinação de levofloxacina em amostras de fármacos (A_0), fármaco fortificado (A_1), (B_0) branco. Condições instrumentais: tempo de acumulação 60 s, amplitude de pulso 70 mV e incremento de potencial 4 mV. (B) Voltamograma obtido por VOQ para a determinação de levofloxacina em amostras de fármacos (A_0), fármaco fortificado (A_1), (B_0) branco. Condições instrumentais: tempo de acumulação 60 s, amplitude de pulso 70 mV, frequência 10 Hz e incremento de potencial 7 mV. (C) Amperograma obtido pelo sistema FIA-AMP para determinação de levofloxacina em amostras de fármaco (A_0), fármaco fortificado (A_1), urina sintética (U_0) e urina fortificada (U_1). Curva analítica com concentrações crescentes de levofloxacina, (a) $9,2 \mu\text{mol L}^{-1}$, (b) $18 \mu\text{mol L}^{-1}$, (c) $27,1 \mu\text{mol L}^{-1}$, (d) $36,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ (e) $43,8 \mu\text{mol L}^{-1}$. Condições experimentais: potencial 1,1 V, alça de amostragem $150 \mu\text{L}$ e vazão do fluxo $2,0 \text{ mL min}^{-1}$. (D) Amperograma obtido pelo sistema BIA-AMP para determinação de levofloxacina em amostras de fármaco (A_0), fármaco fortificado (A_1), urina sintética (U_0) e urina fortificada (U_1). Curva analítica com concentração crescentes de levofloxacina (a) $3,1 \mu\text{mol L}^{-1}$, (b) $11,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, (c) $20,4 \mu\text{mol L}^{-1}$, (d) $31,4 \mu\text{mol L}^{-1}$, (e) $40,9 \mu\text{mol L}^{-1}$, (f) $50,3 \mu\text{mol L}^{-1}$. Condições instrumentais: potencial +1,1 V, velocidade de injeção 3 e volume de injeção $50 \mu\text{L}$. Todos as análises foram em meio a tampão BR ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6) e utilizando o eletrodo modificado com OGR.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor (2020).

Tabela 3. Teores de levofloxacina e percentuais de recuperação obtidos a partir das amostras de fármacos por VPD, VOQ, FIA-AMP, BIA-AMP e UFLC (n=3).

Amostra	VPD		VOQ		FIA-AMP		BIA-AMP		UFLC	
	T(mg)	R (%)	T(mg)	R(%)	T(mg)	R(%)	T(mg)	R(%)	T(mg)	R(%)
A	587±8	91±1	473±21	106±2	509±1	103±3	539±5	98±2	566±20	101±1

Legenda; T = teor; R = recuperação
Valor declarado pelo fabricante: 500 mg.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2020).

A partir da tabela 3, é possível afirmar que os métodos eletroanalíticos, desenvolvidos no presente trabalho, apresentaram adequada exatidão com valores de recuperação na faixa de 91 a 106 %, tendo em vista os níveis de concentração utilizados (20 a 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Além disso, os valores de RSD foram inferiores a 8 %, demonstrando boa precisão.

O teor do princípio ativo na formulação farmacêutica foi concordante com o valor informado pelo fabricante do medicamento, ou seja, os métodos eletroanalíticos desenvolvidos foram capazes de quantificar a levofloxacina em formulações farmacêuticas de forma rápida, seletiva e eficaz frente aos métodos convencionais recomendados pelos órgãos oficiais (UFLC).

Os resultados foram comparados de forma simultânea utilizando ANOVA fator único, onde a 95 % de confiança não houve diferença significativa entre os métodos. Estes resultados mostram a confiabilidade dos métodos eletroanalíticos e a potencial aplicação para controle de qualidade de formulações farmacêuticas. Os excipientes presentes nas formulações farmacêuticas analisadas foram celulose microcristalina, povidona, croscarmelose sódica, dióxido de silício, estearato de magnésio, copolímero de álcool polivinílico, polietileno glicol, macrogol e dióxido de titânio, os quais não apresentaram comportamento eletroativo no potencial de oxidação referente à levofloxacina.

Tendo em vista as características analíticas fornecidas pelos métodos dinâmicos (automação, rapidez e ecologicamente amigável) estes foram selecionados para determinar levofloxacina na amostra de urina sintética, como mostra a Figura 20C e 20D. Para este estudo, a amostra de urina foi previamente dopada com uma concentração de 36 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de levofloxacina para o método utilizando FIA-AMP, enquanto que para o método BIA-AMP a amostra de urina foi dopada em uma concentração de 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Foi obtido um nível de

recuperação de 96% e RSD de 1,5% para o método FIA-AMP e um nível de recuperação de 98% e RSD de 1,7% para o método BIA-AMP, mostrando que os métodos propostos foram exatos e precisos. Sendo assim, é possível afirmar que esses resultados demonstram a potencialidade dos métodos dinâmicos para aplicações em amostras reais de fluidos biológicos, como sangue e urina, além das análises de controle de qualidade realizadas em amostras de formulações farmacêuticas.

Os quatro métodos desenvolvidos utilizando o sensor à base de grafeno reduzido foram comparados com outros métodos eletroanalíticos reportados na literatura utilizando diferentes sensores para a determinação de levofloxacina (tabela 4).

Tabela 4. Comparação dos métodos desenvolvidos com outros métodos reportados na literatura para a determinação de levofloxacina.

<i>Sensor</i>	<i>Método</i>	<i>Potencial/ V</i>	<i>L.D./ $\mu\text{mol L}^{-1}$</i>	<i>Amostras</i>	<i>Referências</i>
<i>MWCNT/SnO₂</i>	VPD	0,95	0,20	Formulações farmacêuticas	(CESARINO et al., 2014)
<i>DDB</i>	VOQ	1,1	2,88	Urina e plasma sanguíneo	(RKIK; BRAHIM; SAMET, 2017)
<i>PoAP/MWCNTs</i>	VPD	-	0,01	Urina e plasma sanguíneo	(WEN et al., 2012)
<i>MIP/G-AuNPs</i>	VPD	1,10	0,55	Formulações farmacêuticas	(WANG; ZHU; ZHANG, 2014)
<i>AgNPs/CeO₂-Au/ECV</i>	VPD	0,90	0,01	Urina e plasma sanguíneo	(TANG et al., 2014)
<i>OGR/ECV</i>	VPD	0,75	1,45	Formulações farmacêuticas	Esse trabalho
<i>OGR/ECV</i>	VOQ	0,85	10,00	Formulações farmacêuticas	Esse trabalho
<i>OGR/ECV</i>	AMP-FIA	1,10	0,50	Urina sintética e formulações farmacêuticas	Esse trabalho
<i>OGR</i>	AMP-BIA	1,10	0,33	Urina sintética e formulações farmacêuticas	Esse trabalho

Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2020).

Nota: MWCNT: nanotubo de carbono de múltiplas camadas; DDB: diamante dopado com boro; PoAp: poly(o-aminofenol); G: grafeno; MIP: polímero impresso; AuNPs: nanopartículas de ouro; AgNPs: nanopartículas de prata; ECV: eletrodo de carbono vítreo; OGR: óxido de grafeno reduzido; VOQ: voltametria de onda quadrada; VPD: voltametria de pulso diferencial; AMPEROMETRIA-FIA: análise por detecção influxo com detecção amperométrica.

O sensor à base de OGR desenvolvido neste trabalho quando comparado aos demais sensores para a determinação de levofloxacina mostrou-se bastante eficaz. Utilizando apenas um nanomaterial (OGR) foi possível obter performance eletroanalítica similar a outros sensores da literatura que necessitaram de mais materiais no processo de modificação

Os métodos desenvolvidos utilizando FIA-AMP e BIA-AMP apresentaram o limite de detecção na mesma ordem de grandeza dos sensores mostrados na tabela 4, com exceção dos métodos desenvolvidos por Wen e colaboradores e Tang e colaboradores que utilizaram a voltametria de onda quadrada (WEN et al., 2012; TANG et al., 2014). Entretanto quando comparado em termos de frequência analítica os métodos FIA-AMP e BIA-AMP desenvolvidos no presente trabalho apresentaram valores superiores aos trabalhos já mencionados. Além disso, em termos de deslocamento do potencial de oxidação da levofloxacina, para as técnicas estáticas (VPD e VOQ), os métodos desenvolvidos utilizando o OGR como modificador mostraram-se mais seletivos. Por fim é válido destacar que até o presente momento para o nosso conhecimento, a literatura não relata o uso do FIA-AMP e BIA-AMP na quantificação do mesmo. Assim o sensor de OGR-CV utilizado para o desenvolvimento dos métodos presentes nesse trabalho agregou seletividade e sensibilidade (VPD e VOQ) e detectabilidade (FIA-AMP e BIA-AMP), tornando-se uma alternativa na determinação de levofloxacina frente aos métodos convencionais.

5 CONCLUSÕES

No presente trabalho foi possível a construção de diferentes sensores a base de OGR e MWCNT sobre um eletrodo base de carbono vítreo, ambos os modificadores foram caracterizados via espectroscopia Raman.

A comparação dos sensores a base de OGR e NTC utilizando a voltametria cíclica mostrou que o sensor a base de OGR possibilitou um ganho maior no sinal analítico para oxidação da levofloxacina. O processo adsorvente de uma fina camada do OGR sobre o eletrodo base resultou em uma superfície de maior rugosidade quando comparado com um eletrodo modificado por MWCNT e não modificado. O que explica a superioridade em termos de sinal analítico do sensor desenvolvido. Sendo assim os métodos eletroanalíticos, utilizando as técnicas VPD, VOQ, FIA-AMP e BIA-AMP foram desenvolvidos utilizando o sensor de OGR-CV, já que o mesmo agregou maior sensibilidade ao eletrodo base.

As figuras de mérito apresentadas pelos métodos desenvolvidos foram satisfatórias, incluindo detectabilidade adequada ($L.D < 6,7 \mu\text{mol L}^{-1}$), precisão ($RSD < 7,7\%$) e exatidão aceitável (recuperação de 91 a 106%) para os níveis de concentração estudados, o que evidenciou as atrativas características do método. Além disso, os resultados eletroquímicos foram estatisticamente comparáveis ao do UFLC, o que demonstra a confiabilidade dos métodos desenvolvidos.

Os métodos dinâmicos apresentaram características analíticas mais atraentes para aplicações de rotina, tendo como principais vantagens à alta frequência analítica (100 análises por hora), a etapa mínima de preparação da amostra (diluição simples) e automação (menores riscos de contaminação). Combinando esses três fatores a questões ambientais (menor consumo de reagentes), os métodos FIA-AMP e BIA-AMP mostram-se uma importante ferramenta analítica para análises de rotina, frente às metodologias oficiais. Além disso, o método desenvolvido por BIA-AMP pode ser destacado devido a sua potencial miniaturização e ganho de portabilidade, tendo em vista que o mesmo não necessita da utilização de bomba mecânica.

Por fim, os métodos desenvolvidos no presente trabalho foram comparados com outros trabalhos reportados na literatura para a determinação de levofloxacina. Os métodos estacionários (VPD e VOQ) utilizando o sensor à base de OGR evidenciaram o deslocamento do potencial para valores próximos a 0,0 V, ou seja, apresentaram maior seletividade que pode estar relacionado ao efeito eletrocatalítico fornecido pelo material. Enquanto que o método FIA-AMP e BIA-AMP destacaram-se pela boa detectabilidade e uma elevada frequência analítica.

PESPECTIVAS FUTURAS

- Desenvolver métodos eletroanalíticos para determinações simultâneas de levofloxacina e outros antibióticos pertencentes à classe das fluorquinolonas.
- Desenvolver plataformas eletroanalíticas de baixo custo (ePADs) que atuem como substrato na identificação e quantificação de levofloxacina em diferentes matrizes (farmacêuticas e biológicas).

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- AL-AFY, N. et al. Determination of three tetracyclines in bovine milk using magnetic solid phase extraction in tandem with dispersive liquid-liquid microextraction coupled with HPLC. **Journal of Chromatography B**, v. 1092, p. 480–488, 2018.
- ALBERTS, G. S.; SHAIN, I. Electrochemical Study of Kinetics of a Chemical Reaction Coupled between Two Charge Transfer Reactions. Potentiostatic Reduction of p-Nitrosophenol. **Analytical Chemistry**, v. 35, n. 12, p. 1859–1866, 1963.
- ALIZADEH, T. et al. Selective determination of chloramphenicol at trace level in milk samples by the electrode modified with molecularly imprinted polymer. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 1108–1114, 2012.
- ALTIOKKA, G.; ATKOSAR, Z.; CAN, N. O. The determination of levofloxacin by flow injection analysis using UV detection, potentiometry, and conductometry in pharmaceutical preparations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 30, n. 3, p. 881–885, 2002.
- ANGGRAINI, S. A. et al. Selective NO₂ detection using YSZ-based amperometric sensor attached with NiFe₂O₄(+ Fe₂O₃) sensing electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 259, p. 30–35, 2018.
- AVACA, L. A.; TOKORO, R. A história, evolução e crescimento da Eletroquímica: Eletroanalítica nestes últimos 25 anos. **Química Nova**, v. 25, p. 25–30, 2002.
- BALL, P. Chapter 1 - The Quinolones: History and Overview. In: ANDRIOLE, V. T. B. T.-T. Q. (THIRD E. (Ed.). . San Diego: **Academic Press**, 2000. p. 1–31.
- BEITOLLAHI, H. et al. A novel electrochemical sensor based on graphene nanosheets and ethyl 2-(4-ferrocenyl-[1,2,3]triazol-1-yl) acetate for electrocatalytic oxidation of cysteine and tyrosine. **Measurement**, v. 152, p. 107302, 2020.
- BEZZON, V. D. N. et al. Carbon Nanostructure-based Sensors: A Brief Review on Recent Advances. **Advances in Materials Science and Engineering**, v. 2019, p. 4293073, 2019.
- BOROWIEC, J. et al. Synthesis of PDDA Functionalized Reduced Graphene Oxide Decorated with Gold Nanoparticles and Its Electrochemical Response toward Levofloxacin. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 162, n. 3, p. H164–H169, jan. 2015.
- BRUNO, C. et al. Validation of amino-acids measurement in dried blood spot by FIA-MS/MS for PKU management. **Clinical Biochemistry**, v. 49, n. 13, p. 1047–1050, 2016.
- CESARINO, V. et al. Carbon nanotubes modified with SnO₂ rods for levofloxacin detection. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 502–508, 2014.
- CHEN, D.; FENG, H.; LI, J. Graphene Oxide: Preparation, Functionalization, and Electrochemical Applications. **Chemical Reviews**, [s. l.], v. 112, n. 11, p. 6027–6053, 2012.
- CHRISTODOULEAS, D. C. et al. An automatic FIA-CL method for the determination of antioxidant activity of edible oils based on peroxyoxalate chemiluminescence. **Microchemical Journal**, v. 118, p. 73–79, 2015.

CUI, F.; ZHANG, X. A method based on electrodeposition of reduced graphene oxide on glassy carbon electrode for sensitive detection of theophylline. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 17, n. 1, p. 167–173, 2013.

DA SILVA, F. D. et al. In situ electrochemical exfoliation of embedded graphite to superficial graphene sheets for electroanalytical purposes. **Electrochimica Acta**, v. 354, p. 136762, 2020.

DE FARIA, L. V. et al. Direct analysis of ascorbic acid in food beverage samples by flow injection analysis using reduced graphene oxide sensor. **Food Chemistry**, v. 319, n. November 2019, p. 126509, 2020a.

DE FARIA, L. V. et al. Electrochemical Study of Different Sensors for Simple and fast Quantification of Ciprofloxacin in Pharmaceutical Formulations and Bovine Milk. **Electroanalysis**, p. 1–8, 2020b.

DE OLIVEIRA, L. H. et al. Comparação de processamentos matemáticos de dados voltamétricos: Aplicação na determinação simultânea de fluoroquinolonas. **Química Nova**, [s. l.], v. 38, n. 10, p. 1300–1306, 2015.

DE SOUZA, M. V. N. New fluoroquinolones: a class of potent antibiotics. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 5, n. 11, p. 1009–1017, nov. 2005.

DEJMKOVA, H. et al. Voltammetric and amperometric determination of metoclopramide on boron-doped diamond film electrode. **Central European Journal of Chemistry**, v. 10, n. 4, p. 1310–1317, 2012.

DHINAKARAN, V. et al. Review on exploration of graphene in diverse applications and its future horizon. **Materials Today: Proceedings**, 2020.

DONG, Y. et al. Chemiluminescence of carbon dots induced by diperiodato-nicklate (IV) in alkaline solution and its application to a quenchometric flow-injection assays of paracetamol, L-cysteine and glutathione. **Microchimica Acta**, v. 182, n. 5, p. 1071–1077, 2015.

DU, H. et al. A voltammetric sensor based on graphene-modified electrode for simultaneous determination of catechol and hydroquinone. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 650, n. 2, p. 209–213, 2011.

EDWARDS, G. A.; BERGREN, A. J.; PORTER, M. D. 8 - Chemically Modified Electrodes. In: ZOSKI, C. G. (Ed.). **Handbook of Electrochemistry**. Amsterdam: Elsevier, 2007. p. 295–327.

EL-HAMSHARY, M. S. et al. Screening and optimization of samarium-assisted complexation for the determination of norfloxacin, levofloxacin and lomefloxacin in their corresponding dosage forms employing spectrofluorimetry. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 206, p. 578–587, 2019.

FARIA, A. F. et al. Simultaneous separation of five fluoroquinolone antibiotics by capillary zone electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v. 579, n. 2, p. 185–192, 2006.

FARIA, L. V. et al. High-throughput amperometric determination of tetracycline residues in milk and quality control of pharmaceutical formulations: flow-injection versus batch-injection analysis. **Anal. Methods**, v. 11, n. 41, p. 5328–5336, 2019a.

- FARIA, L. V et al. Square-Wave Voltammetry Determination of Ciprofloxacin in Pharmaceutical Formulations and Milk Using a Reduced Graphene Oxide Sensor. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, p. 1947–1954, 2019b.
- FEIER, B. et al. Electrochemical determination of cephalosporins using a bare boron-doped diamond electrode. **Analytica chimica acta**, v. 976, p. 25–34, jul. 2017.
- FLAHAUT, E.; LAURENT, C.; PEIGNEY, A. Catalytic CVD synthesis of double and triple-walled carbon nanotubes by the control of the catalyst preparation. **Carbon**, v. 43, n. 2, p. 375–383, 2005.
- FRANK, S. et al. Carbon Nanotube Quantum Resistors. **Science**, v. 280, n. 5370, p. 1744–1746, 1998.
- GHUGE, A. D.; SHIRODE, A. R.; KADAM, V. J. Graphene: A Comprehensive Review. **Current drug targets**, v. 18, n. 6, p. 724–733, 2017.
- HALLAJ, R. et al. Highly sensitive and ultra-selective amperometric nitrite sensor using cyclometalated Rh(III)-complex/CNTs modified glassy carbon electrode integrated with flow injection analysis. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 233, p. 107–119, 2016.
- HIDI, I. J. et al. Toward Levofloxacin Monitoring in Human Urine Samples by Employing the LoC-SERS Technique. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 120, n. 37, p. 20613–20623, set. 2016.
- HIGGINS, P. G.; FLUIT, A. C.; SCHMITZ, F. J. Fluoroquinolones: structure and target sites. **Current drug targets**, v. 4, n. 2, p. 181–190, fev. 2003.
- ISLAM, M. A. et al. Fast pulsed amperometric waveform for miniaturised flow-through electrochemical detection: Application in monitoring graphene oxide reduction. **Electrochimica Acta**, v. 328, p. 135087, 2019.
- JURDÁKOVÁ, H. et al. FIA-MS/MS determination of creatinine in urine samples undergoing butylation. **Analytical Biochemistry**, v. 549, p. 113–118, 2018.
- JUSTINO, C. I. L. et al. Trends in Analytical Chemistry Graphene based sensors and biosensors. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 91, p. 53–66, 2017.
- KORKMAZ, S.; KARIPER, İ. A. Graphene and graphene oxide based aerogels: Synthesis, characteristics and supercapacitor applications. **Journal of Energy Storage**, v. 27, p. 101038, 2020.
- LANYON, Y. H. et al. Benzene analysis in workplace air using an FIA-based bacterial biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, n. 10, p. 2089–2096, 2005.
- LAUBE, N.; MOHR, B.; HESSE, A. Laser-probe-based investigation of the evolution of particle size distributions of calcium oxalate particles formed in artificial urines. **Journal of Crystal Growth**, v. 233, n. 1, p. 367–374, 2001.
- LAVIRON, E. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, [s. l.], v. 101, n. 1, p. 19–28, 1979

- LI, Z. H. et al. Flow-injection determination of hydrogen peroxide based on fluorescence quenching of chromotropic acid catalyzed with Fe(II). **Talanta**, v. 82, n. 4, p. 1225–1229, 2010.
- LIANG, W. et al. Fabry - Perot interference in a nanotube electron waveguide. **Nature**, v. 411, n. 6838, p. 665–669, 2001.
- LIU, C. et al. Voltammetric determination of levofloxacin using silver nanoparticles deposited on a thin nickel oxide porous film. **Mikrochimica acta**, v. 186, n. 1, p. 21, dez. 2018.
- LOCATELLI, M. et al. Determination of ciprofloxacin and levofloxacin in human sputum collected from cystic fibrosis patients using microextraction by packed sorbent-high performance liquid chromatography photodiode array detector. **Journal of Chromatography A**, v. 1419, p. 58–66, 2015.
- LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos. **Química Nova**, [S. l.], v. 29, p. 1318–1325, 2006.
- LUO, J. et al. A novel non-enzymatic glucose sensor based on Cu nanoparticle modified graphene sheets electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 709, p. 47–53, 2012.
- MALEKI, H. Changes in the Electrochemical Behavior of Polymeric Carbon Induced by Heat-Treatment and Doping with Lithium Ions. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 145, n. 3, p. 721, 1998.
- MALEQUE, M. et al. Development and validation of a simple UV spectrophotometric method for the determination of levofloxacin both in bulk and marketed dosage formulations. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 2, n. 6, p. 454–457, 2012.
- MARCO, J. et al. Electrochemical study of oxidation process of amitriptyline using sensor based on carbon paste containing immobilized DNA on inorganic matrix. **Semina : Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 36, 2015.
- MASIKINI, M. et al. Electrochemical Sensor Based on Multi-walled Carbon Nanotube/Gold Nanoparticle Modified Glassy Carbon Electrode for Detection of Estradiol in Environmental Samples. **Electroanalysis**, v. 31, n. 10, p. 1925–1933, 2019.
- MCCREERY, R. L. Advanced Carbon Electrode Materials for Molecular Electrochemistry. **Chemical Reviews**, [s. l.], v. 108, n. 7, p. 2646–2687, 2008.
- MEILI, L. et al. MgAl-LDH/Biochar composites for methylene blue removal by adsorption. **Applied Clay Science**, v. 168, p. 11–20, 2019.
- MOSES, P. R.; WIER, L.; MURRAY, R. W. Chemically modified tin oxide electrode. **Analytical Chemistry**, v. 47, n. 12, p. 1882–1886, out. 1975.
- MURILLO PULGARÍN, J. A.; GARCÍA BERMEJO, L. F.; CARRASQUERO DURÁN, A. A fast and simple FIA-chemiluminescence method for the evaluation of Roselle flowers as scavenger of the free radicals generated by UV irradiated antibiotics. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 164, p. 630–635, 2019.

- NARCISO, L. C. D. et al. Chemically versus Electrochemically Reduced Graphene Oxide : Improved amperometric and voltammetric sensors of phenolic compounds on higher roughness surfaces. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, 2017.
- NERAVATHU, D. et al. Hybrid nanomaterial of ZnFe₂O₄/ α -Fe₂O₃ implanted graphene for electrochemical glucose sensing application. **Diamond and Related Materials**, v. 106, p. 107852, 2020.
- NIU, H. et al. Simple approach to regulate the spectra of novel kinds of polyazomethines containing bulky triphenylamine: Electrochemistry, electrochromism and photophysical responsive to environment. **Dyes and Pigments**, v. 96, n. 1, p. 158–169, 2013.
- NOUWS, H. P. A. et al. Square-Wave Adsorptive-Stripping Voltammetric Detection in the Quality Control of Fluoxetine. **Analytical Letters**, v. 40, n. 6, p. 1131–1146, 2007.
- NOVOSELOV, K. S. et al. Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films. **Science**, v. 306, n. 5696, p. 666 LP – 669, out. 2004.
- OLIVEIRA, F. M. DE et al. Assessment of cadmium and iron adsorption in sediment, employing a flow injection analysis system with on line filtration and detection by flame atomic absorption spectrometry and thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 809, p. 82–87, 2014.
- OLIVEIRA, G. K. F. et al. Batch-injection analysis with amperometric detection of the DPPH radical for evaluation of antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v. 192, p. 691–697, 2016.
- OLIVEIRA, P. R. et al. Nickel hexacyanoferrate supported at nickel nanoparticles for voltammetric determination of rifampicin. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 260, p. 816–823, 2018.
- PARNELL, C. M. et al. Electrochemical sensing of hydrogen peroxide using a cobalt(III) complex supported on carbonaceous nanomaterials. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 740, p. 37–44, 2015.
- PEREIRA, Arnaldo; SANTOS, Antonio de Santana; KUBOTA, Lauro Tatsuo. Tendências em modificações de eletrodos para aplicações eletroanalíticas. **Química Nova**, [S. l.], v. 25, p. 1012–1021, 2002. a.
- PINTER, J. S. et al. Amperometric detection of hydrazine by cyclic voltammetry and flow injection analysis using ruthenium modified glassy carbon electrodes. **Talanta**, v. 71, n. 3, p. 1219–1225, 2007.
- PROMPHET, N. et al. An electrochemical sensor based on graphene/polyaniline/polystyrene nanoporous fibers modified electrode for simultaneous determination of lead and cadmium. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 207, p. 526–534, 2015.
- RASHID, M. et al. An amperometric hydrogen sensor based on Pt nanoparticles supported multi-wall carbon nanotubes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 833, p. 173–180, 2019.
- REGITANO, J. B.; LEAL, R. M. P. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal Brasileira. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 34, n. 3, p. 601–616, 2010.

RKIK, M.; BRAHIM, M. BEN; SAMET, Y. samples using boron doped diamond electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 794, n. April, p. 175–181, 2017.

ROCHA, D. P. et al. Chemically versus electrochemically reduced graphene oxide: Improved amperometric and voltammetric sensors of phenolic compounds on higher roughness surfaces. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 254, p. 701–708, 2018.

RODRIGUES-SILVA, C. et al. Ocorrência e degradação de quinolonas por processos oxidativos avançados. **Química Nova**, [s. l.], v. 37, n. 5, p. 868–885, 2014.

RUEDAS RAMA, M. J.; RUIZ MEDINA, A.; MOLINA DÍAZ, A. Bead injection spectroscopy-flow injection analysis (BIS-FIA): an interesting tool applicable to pharmaceutical analysis: Determination of promethazine and trifluoperazine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 35, n. 5, p. 1027–1034, 2004.

ŘUŽIČKA, J.; HANSEN, E. H. Flow injection analyses: Part I. A new concept of fast continuous flow analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 78, n. 1, p. 145–157, 1975.

SÁNCHEZ ARRIBAS, A. et al. Analysis of total polyphenols in wines by FIA with highly stable amperometric detection using carbon nanotube-modified electrodes. **Food Chemistry**, v. 136, n. 3, p. 1183–1192, 2013.

SHAMSIPUR, M. et al. Novel PVC-membrane potentiometric sensors based on a recently synthesized sulfur-containing macrocyclic diamide for Cd²⁺ ion. Application to flow-injection potentiometry. **Journal of Hazardous Materials**, v. 172, n. 2, p. 566–573, 2009.

SILVA, R. A. B. et al. Rapid and selective determination of hydrogen peroxide residues in milk by batch injection analysis with amperometric detection. **Food Chemistry**, v. 133, n. 1, p. 200–204, 2012.

SMART, A. et al. Screen-printed carbon based biosensors and their applications in agri-food safety. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 127, p. 115898, 2020.

SONG, H.; NI, Y.; KOKOT, S. A novel electrochemical biosensor based on the hemin-graphene nano-sheets and gold nano-particles hybrid film for the analysis of hydrogen peroxide. **Analytica Chimica Acta**, v. 788, p. 24–31, 2013.

SONG, S. et al. Biomedical application of graphene: From drug delivery, tumor therapy, to theranostics. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 185, p. 110596, 2020.

SONG, W. et al. Potentiometric flow injection system for determination of reductants using a polymeric membrane permanganate ion-selective electrode based on current-controlled reagent delivery. **Analytica chimica acta**, v. 704, n. 1–2, p. 68–72, out. 2011.

SONG, Y. S.; YOUN, J. R. Influence of dispersion states of carbon nanotubes on physical properties of epoxy nanocomposites. **Carbon**, v. 43, n. 7, p. 1378–1385, 2005.

STEFANO, J. S. et al. Fast determination of naproxen in pharmaceutical formulations by batch injection analysis with pulsed amperometric detection. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, p. 1834–1838, 2012.

SU, Y. et al. Development of a novel, sensitive amperometric-FIA glucose biosensor by packing up the amperometric cell with glucose oxidase modified anion exchange resin. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, n. 8, p. 2665–2670, 2009.

- SUDARVIZHI, A. et al. Amperometry detection of nitrite in food samples using tetrasulfonated copper phthalocyanine modified glassy carbon electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 272, p. 151–159, 2018.
- SUI, Q. et al. Occurrence, sources and fate of pharmaceuticals and personal care products in the groundwater: A review. **Emerging Contaminants**, v. 1, n. 1, p. 14–24, 2015.
- SZERKUS, O. et al. Robust HPLC–MS/MS method for levofloxacin and ciprofloxacin determination in human prostate tissue. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 132, p. 173–183, 2017.
- TANG, L. et al. Sensors and Actuators B : Chemical Ag nanoparticles and electrospun CeO 2 -Au composite nanofibers modified glassy carbon electrode for determination of levofloxacin. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, v. 203, p. 95–101, 2014.
- THUNYAKONTIRAKUN, W. et al. Fabrication of poly(pyrrole-3-carboxylic acid)/graphene oxide composite thin film for glucose biosensor. **Materials Today: Proceedings**, v. 17, p. 2070–2077, 2019.
- TRAVERSI, R. et al. Ultra-sensitive Flow Injection Analysis (FIA) determination of calcium in ice cores at ppt level. **Analytica Chimica Acta**, v. 594, n. 2, p. 219–225, 2007.
- TSANG, C. H. A. et al. Graphene materials in green energy applications: Recent development and future perspective. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 120, p. 109656, 2020.
- VARGAS, E. et al. Implementation of a new integrated d-lactic acid biosensor in a semiautomatic FIA system for the simultaneous determination of lactic acid enantiomers. Application to the analysis of beer samples. **Talanta**, v. 152, p. 147–154, 2016.
- VETTORELLO, G. et al. Micropoluentes Em Água – O Novo Desafio Emergente. **Revista Caderno Pedagógico**, v. 14, n. 1, p. 72–83, 2017.
- VICENTINI], F. [CAMPANHÃ et al. A biosensor based on gold nanoparticles, dihexadecylphosphate, and tyrosinase for the determination of catechol in natural water. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 84, p. 17–23, 2016.
- WANG, C. C.; SOMBRA, L.; FERNÁNDEZ, L. Automated flow system for sildenafil enrichment using surfactant coated solid-phase with fluorescence detection. **Talanta**, v. 98, p. 247–252, 2012.
- WANG, F.; ZHU, L.; ZHANG, J. Sensors and Actuators B : Chemical Electrochemical sensor for levofloxacin based on molecularly imprinted polypyrrole – graphene – gold nanoparticles modified electrode. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, v. 192, p. 642–647, 2014.
- WANG, J. et al. Fe NPs and MWCNTs based electrode as FIA detector for determination of amino acids in hypothalamus microdialysis fluids. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 238, p. 834–841, 2017.
- WANG, J.; TAHA, Z. Batch injection with potentiometric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 252, n. 1, p. 215–221, 1991.

WEN, W. et al. Sensors and Actuators B : Chemical One-step fabrication of poly (o - aminophenol)/ multi-walled carbon nanotubes composite film modified electrode and its application for levofloxacin determination in pharmaceuticals. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, v. 174, p. 202–209, 2012.

WONG, A.; SANTOS, A. M.; FATIBELLO-FILHO, O. Simultaneous determination of dopamine and cysteamine by flow injection with multiple pulse amperometric detection using a boron-doped diamond electrode. **Diamond and Related Materials**, v. 85, p. 68–73, 2018.

YALLAPPA, S. et al. Fabrication of carbon nanospheres using natural resources and their voltametric studies of dopamine. **Materials Today: Proceedings**, v. 5, n. 1, Part 3, p. 3093–3098, 2018.

YANG, Y. et al. A Facile Electrophoretic Deposition Route to the Fe₃O₄/CNTs/rGO Composite Electrode as a Binder-Free Anode for Lithium Ion Battery. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 8, n. 40, p. 26730–26739, out. 2016.

YEH, W.-L.; KUO, Y.-R.; CHENG, S.-H. Voltammetry and flow-injection amperometry for indirect determination of dopamine. **Electrochemistry Communications**, v. 10, n. 1, p. 66–70, 2008.

YIĞİT, A. et al. Graphene/Nafion composite film modified glassy carbon electrode for simultaneous determination of paracetamol, aspirin and caffeine in pharmaceutical formulations. **Talanta**, v. 158, p. 21–29, 2016.

ZANONI, M. V. B. PANORAMA DA ELETROQUÍMICA E ELETROANALÍTICA NO BRASIL. **Química Nova**, [S. l.], v. 40, p. 663–669, 2017.

ZARE-DORABEI, R.; BOROUN, S.; NOROOZIFAR, M. Flow injection analysis–flame atomic absorption spectrometry system for indirect determination of sulfite after on-line reduction of solid-phase manganese (IV) dioxide reactor. **Talanta**, v. 178, p. 722–727, 2018.

ZHENG, H. et al. Biosensor based on polyaniline-polyacrylonitrile-graphene hybrid assemblies for the determination of phenolic compounds in water samples. **Journal of Hazardous Materials**, v. 378, p. 120714, 2019.

ZIYATDINOVA, G.; GUSS, E.; BUDNIKOV, H. Amperometric sensor based on MWNT and electropolymerized carminic acid for the simultaneous quantification of TBHQ and BHA. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 859, p. 113885, 2020.

APÊNDICE A - PRODUÇÕES BIBLIOGRÁFICAS

a) Artigos de periódicos – Relacionados à dissertação

1. de Farias, D.M., de Faria, L.V., Lisboa, T.P. et al. Determination of levofloxacin in pharmaceutical formulations and urine at reduced graphene oxide and carbon nanotube-modified electrodes. **J Solid State Electrochem** 24, 1165–1173 (2020). <https://doi.org/10.1007/s10008-020-04589-z>

b) Artigos de periódicos – Trabalhos em colaboração

1. de Faria, L.V.; Lisboa, T.P.; Farias, D.M.; Araujo, F.M.; Machado, M.M.; Sousa, R.A.; Matos, M.A.C.; Munoz, R.A.A.; Matos, R.C. *Direct analysis of ascorbic acid in food beverage samples by flow injection analysis using reduced graphene oxide sensor*. Food Chemistry, v. 00, p. 126509, 2020. [<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126509>].

2. de Faria, L.V.; Lisboa, T.P.; Farias, D.M.; Alves, G.F.; Matos, M.A.C.; Munoz, R.A.A.; Matos, R.C. *Electrochemical study of different sensors for simple and fast quantification of ciprofloxacin in pharmaceutical formulations and bovine milk*. **Electroanalysis**, v. 32, p. 1-8, 2020. [<http://dx.doi.org/10.1002/elan.202060211>].

3. Alves, G.F.; Farias, D.M.; de Faria, L.V.; Lisboa, T.P.; Matos, M.A.C.; Matos, R.C. *Disposable pencil graphite electrode for ciprofloxacin determination in pharmaceutical formulations by square wave voltammetry*. **Electroanalysis**, 2020. [<http://dx.doi.org/10.1002/elan.202060432>].

4. Faria, L.V.; Farias, D.M.; Lisboa, T.P.; Matos, M.A.C.; Munoz, R.A.A.; Matos, R.C. *Batch injection analysis with amperometric detection for fluoroquinolones determination in urine, pharmaceutical formulations and milk samples using a reduced graphene oxide modified glassy carbon electrode*. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 2021. [<https://doi.org/10.1007/s00216-021-03342-3>].