

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

**Lucas Vinícius de Faria**

**Desenvolvimento de métodos eletroanalíticos utilizando sensor a base de grafeno  
para a determinação de antibióticos em amostras de leite e formulações  
farmacêuticas**

**Juiz de Fora**  
**2021**

**Lucas Vinicius de Faria**

**Desenvolvimento de métodos eletroanalíticos utilizando sensor a base de grafeno  
para a determinação de antibióticos em amostras de leite e formulações  
farmacêuticas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Química

Orientador: Prof. Dr. Renato Camargo Matos

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz

**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)

Faria, Lucas Vinicius de.

Desenvolvimento de métodos eletroanalíticos utilizando sensor a base de grafeno para a determinação de antibióticos em amostras de leite e formulações farmacêuticas / Lucas Vinicius de Faria. -- 2021.

149 f. : il.

Orientador: Renato Camargo Matos

Coorientador: Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química, 2021.

1. Óxido de grafeno reduzido. 2. Antibióticos. 3. Métodos eletroanalíticos. 4. Leite. 5. Formulações farmacêuticas. I. Matos, Renato Camargo, orient. II. Muñoz, Rodrigo Alejandro Abarza, coorient. III. Título.

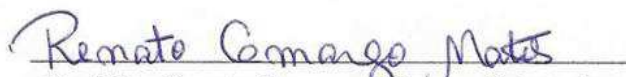
Lucas Vinicius de Faria

**Desenvolvimento de métodos eletroanalíticos utilizando sensor a base de grafeno para a determinação de antibióticos em amostras de leite e formulações farmacêuticas**

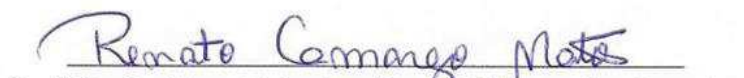
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Química.

Aprovada em 06 de agosto de 2021.

BANCA EXAMINADORA

  
Prof. Dr. Renato Camargo Matos - Orientador

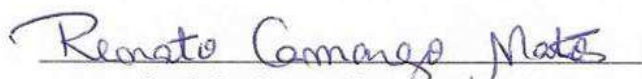
Universidade Federal de Juiz de Fora

  
Prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz - Coorientador

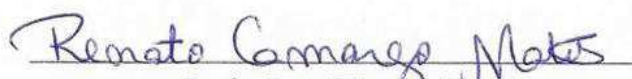
Universidade Federal de Uberlândia

  
Prof. Dr. Thiago Régis Longo César da Paixão

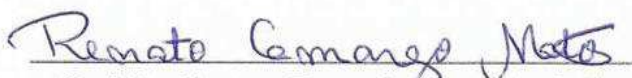
Universidade de São Paulo

  
Prof. Dr. Bruno Campos Janegitz

Universidade Federal de São Carlos

  
Profa. Dra. Eliane D'Ena

Universidade Federal do Rio de Janeiro

  
Prof. Dr. Gustavo Fernandes-Souza Andrade

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dedico esta tese aos meus pais Célia e Maurício, e a minha esposa Viviane.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus por ter me abençoado durante toda essa jornada acadêmica.

Agradeço aos meus queridos pais Célia e Maurício, pelo incentivo e confiança depositados em mim durante toda a minha caminhada estudantil. Nos momentos de adversidades, eles sempre me encorajaram e ajudaram a enfrentar e superar os obstáculos. Agradeço por toda educação, por me ensinar o certo e o errado na vida. Vocês são os grandes responsáveis por esta conquista.

Agradeço à minha amada esposa Viviane por ter me aturado desde o ensino médio até os dias de hoje. Todo o seu carinho, incentivo, confiança, respeito, ajuda e compreensão foram extremamente importantes para que eu conseguisse dar continuidade nos estudos, e concluir mais esta etapa. Muito obrigado por ser esta pessoa tão especial em minha vida!

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Renato Matos por toda confiança depositada em mim desde a orientação do trabalho de conclusão de curso na graduação. Todos os seus ensinamentos e direcionamentos foram fundamentais para a minha formação como profissional. A sua forma de conduzir a orientação de um trabalho de pesquisa, e a seriedade em debater assuntos relacionados à ciência foram os grandes motivadores para a execução desta tese. Agradeço também pelos momentos de descontração (churrascos, passeios, entre outros), respeito e carinho durante estes anos de convivência. Além de professor e pesquisador, te considero um grande amigo.

Agradeço ao meu coorientador Prof. Dr. Rodrigo Muñoz por mesmo sem me conhecer pessoalmente na época da proposta do projeto, ter acreditado em meu potencial. Seus ensinamentos e conselhos foram de grande valia para a conclusão desta tese, bem como para minha formação profissional. Sempre solícito, e extremamente rápido em responder as minhas dúvidas por e-mail. Espero que em um futuro próximo, eu possa dar continuidade à minha formação, sob a sua supervisão em Uberlândia.

Agradeço à Prof. Dra. Maria Auxiliadora (Dora) por todas as conversas, ajuda, transmissão de conhecimento e imenso carinho durante estes anos de convívio.

Agradeço aos Profs. Drs. Rafael Arromba, Gustavo Andrade e Denise Lowinsohn por todas as contribuições durante o exame de qualificação.

Estendo o agradecimento aos demais professores do Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora, por todos os ensinamentos durante os cursos de graduação e pós-graduação.

Agradeço ao grupo de pesquisa CACIS, situado no Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Juiz de Fora, por disponibilizar o equipamento UFLC para a realização das análises cromatográficas.

Agradeço à aluna Flávia Campos (UFJF) e aos alunos Tiago Matias (UFU) e Leonã Freitas (UFJF) pelas ajudas nas caracterizações por espectroscopia Raman, espectroscopia na região do infravermelho e difração de Raios X, respectivamente.

Agradeço à aluna Ana Paula (UFU) pelo o auxílio nas primeiras medidas eletroquímicas usando o sistema por análise em batelada com detecção amperométrica.

Agradeço aos antigos e novos integrantes do grupo de pesquisa NUPIS, Marcos, Gustavo, Raiane, Roberto, Taimara, Fausto, Fernanda, Mateus, Lívia, Monisa, Stephany Guilherme, Davi, Cristiano e Thalles, pelas trocas de ideias, amizade, parceria e momentos de descontração.

Agradeço aos demais colegas de pós graduação, Fillipe Caitano, Karine Enes, Náira, Olivia Brito, Jéssica Cordeiro, Paulo Victor e Mariana Toledo.

Agradeço em especial ao amigo Thalles. Nos conhecemos na minha primeira disciplina cursada na pós-graduação (Química Analítica Avançada), e de lá pra cá, em virtude da dedicação e entusiasmo mútuos, firmamos diversas parcerias científicas. Sua atenção, amizade e bom humor durante os momentos de dificuldade, permitiram que esta caminhada árdua fosse realizada de forma prazerosa. Espero que a nossa amizade e parceria na ciência perdurem por muitos anos.

À CAPES, FAPEMIG e CNPq pelo fomento durante todos estes anos de estudos.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para minha formação profissional e pessoal, o meu: Muito Obrigado!

*“Não é a força do gotejar da água que fura a pedra, mas sim a persistência incansável  
desta ação”*

*(Ivan Teorilang)*

*“Os dias prósperos não vêm por acaso; nascem de muita fadiga e persistência”*

*(Henry Ford)*

*“Obstáculos e dificuldades fazem parte da vida. E a vida é a arte de superá-los”*

*(Mestre DeRose)*



## RESUMO

Os antibióticos correspondem à maior e mais importante classe de fármacos utilizada pela medicina humana e veterinária, em virtude de apresentarem propriedades antibacterianas para o tratamento de diversas enfermidades. O uso de nanomateriais a base de carbono, principalmente o grafeno, vem desempenhando um importante papel para construção de novos sensores eletroquímicos. Dessa forma, o principal objetivo deste trabalho foi desenvolver métodos eletroanalíticos simples, rápidos, sensíveis e de baixo custo, usando o eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno reduzido (GCE/rGO) para a avaliação de ciprofloxacina (CIP), tetraciclina (TET) e cloranfenicol (CLO) em formulações farmacêuticas e leite. Estudos usando a voltametria cíclica na presença de cada um dos antibióticos mostraram um efeito eletrocatalítico do rGO sobre os diferentes processos eletroquímicos, tendo em vista os consideráveis incrementos de corrente e antecipação dos potenciais frente ao eletrodo não modificado. O desempenho analítico do GCE/rGO para a quantificação dos antibióticos foi investigado usando a voltametria de onda quadrada e voltametria de pulso diferencial, e em sistemas de análise em fluxo e batelada com detecção amperométrica. Todos os métodos propostos apresentaram desvio padrão relativo inferiores a 7,0 %, demonstrando uma adequada precisão. Os valores de limites de detecção (LD) obtidos foram menores que  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  para CIP, TET e CLO. Para as aplicações dos métodos nas amostras farmacêuticas e de leite, estas foram simplesmente diluídas (50 vezes) em eletrólito suporte tampão Britton-Robinson ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ ). Percentuais de recuperação na faixa de 84 a 117 % atestaram ausência do efeito de matriz da amostra. Os níveis dos antibióticos nas amostras de leite ficaram abaixo dos valores de LD, enquanto que nas formulações farmacêuticas, os teores dos princípios ativos foram concordantes com os valores fornecidos pelos fabricantes. Todos os resultados obtidos eletroquimicamente foram devidamente comparados às análises cromatográficas, não havendo indícios de diferenças significativas, à 95 % de confiabilidade, o que indicou uma boa exatidão dos métodos. Dessa forma, os métodos desenvolvidos são confiáveis e promissoras para implementação no controle de qualidade de medicamentos e no monitoramento de resíduos de antibióticos em leite.

Palavras-chave: Óxido de grafeno reduzido. Ciprofloxacina. Tetraciclina. Cloranfenicol. Voltametria de onda quadrada. Voltametria de pulso diferencial. Amperometria. Análise por injeção em fluxo. Análise por injeção em batelada. Formulações farmacêuticas. Leite.

## ABSTRACT

Antibiotics correspond to the largest and most important class of drugs used by human and veterinary medicine, due to their antibacterial properties for the treatment of various diseases. The use of carbon-based nanomaterials, especially graphene, has been performing an essential role in the construction of new electrochemical sensors. Thus, the main aim of this work was to develop simple, fast, sensitive and low-cost electroanalytical methods, using a reduced graphene oxide modified glassy carbon electrode (GCE/rGO) for the ciprofloxacin (CIP), tetracycline (TET) and chloramphenicol (CLO) evaluation in pharmaceutical formulations and milk. Studies using cyclic voltammetry in the presence of the antibiotics showed an electrocatalytic effect of rGO on different electrochemical processes, due to the considerable increments of current and potential anticipation in relation to the bare electrode. The analytical performance of GCE/rGO for the quantification of antibiotics was investigated using square wave voltammetry and differential pulse voltammetry, and in flow and batch analysis systems with amperometric detection. All proposed methods presented relative standard deviation below 7.0 %, demonstrating an adequate precision. The obtained limits of detection (LD) values were lower than  $1.0 \mu\text{mol L}^{-1}$  for CIP, TET and CLO. For the methods application in pharmaceutical and milk samples, the samples were simply diluted (50-fold) in supporting electrolyte, Britton-Robinson buffer ( $0.04 \text{ mol L}^{-1}$ ). Recovery percentages in the range of 84 to 117% attested the sample matrix effect absence. The antibiotics levels in the milk samples were below the LD, while in the pharmaceutical formulations, the active principles contents were in agreement with the values provided by the manufacturers. All results obtained electrochemically were properly compared to chromatographic analyses, with no significant differences evidence, at 95% confidence level, which indicated a good accuracy of the methods. Thus, the developed methods are reliable and promising for implementation in pharmaceutical formulations quality control and in the antibiotic residues monitoring in milk.

Keywords: Reduced graphene oxide. Ciprofloxacin. Tetracycline. Chloramphenicol. Square wave voltammetry. Differential pulse voltammetry. Flow injection analysis. Batch injection analysis. Pharmaceutical formulations. Milk.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da estrutura do grafeno .....	28
Figura 2 – Representação esquemática da modificação da superfície de um substrato por adsorção utilizando o método drop casting .....	30
Figura 3 – Levantamento bibliográfico dos últimos 10 anos utilizando a plataforma <i>Science Direct</i> e o termo de busca “ <i>Electrochemical sensor using reduced graphene oxide</i> ”, acesso em 23 de abril de 2021 .....	31
Figura 4 – Estrutura química da ciprofloxacina .....	34
Figura 5 – Estrutura química da tetraciclina .....	37
Figura 6 – Estrutura química do cloranfenicol .....	39
Figura 7 – (A) Representação esquemática da forma de aplicação de potencial utilizado na voltametria cíclica; (B) voltamograma cíclico característico de uma espécie reversível .....	43
Figura 8 – (A) Representação esquemática da forma de aplicação do potencial na amperometria; (B) amperograma obtido para um experimento associado ao FIA.....	44
Figura 9 – (A) Representação esquemática da forma de aplicação do potencial e amostragem da corrente na DPV; (B) voltamograma resultante .....	45
Figura 10 – (A) Representação esquemática da forma de aplicação do potencial e amostragem da corrente na SWV; (B) voltamograma resultante de um processo irreversível e (C) voltamograma resultante de um processo reversível .....	46

- Figura 11 – (A) Representação esquemática dos componentes de um sistema FIA em linha única; (B) gradiente de concentração da amostra em momentos distintos no fluxo transportador e (C) respectivos sinais analíticos .....47
- Figura 12 – Representação esquemática de um sistema BIA com detecção eletroquímica, (a) corpo da célula, (b) tampa superior, (c) tampa inferior, (d) eletrodo de trabalho (configuração *wall-jet*), (e) eletrodo de referência, (f) ponteira da pipeta para injeção, (g) eletrodo auxiliar e (h) solução de eletrólito suporte ....49
- Figura 13 – Etapas na injeção de uma amostra sobre a superfície do eletrodo de trabalho pelo sistema BIA, (A) estado antes da injeção, (B) instante em que a solução começa a ser injetada na superfície do eletrodo, (C) último contato da solução injetada com o eletrodo, (D) processo de diluição/dispersão em meio de eletrólito suporte, (E) superfície do eletrodo retorna as condições de linha base.....50
- Figura 14 – (A) Representação dos componentes do sistema FIA utilizado nas análises eletroquímicas, (a) eletrólito suporte, (b) bomba peristáltica, (c) seringa para preenchimento da alça de amostragem, (d) injetor, (e) alça de amostragem, (f) amostra, (g) célula eletroquímica; (B) célula eletroquímica ampliada, (a) eletrodo de trabalho, (b) eletrodo de referência, (c) entrada do fluxo (tubo de aço inox) e (d) saída do fluxo .....53
- Figura 15 – (A) Representação da célula BIA e (B) componentes do sistema BIA utilizado nas análises eletroquímicas, (a) micropipeta eletrônica, (b) eletrodo de referência, (c) eletrodo auxiliar (d) corpo da célula, (e) eletrodo de trabalho, (f) estante metálica .....54
- Figura 16 – Etapas do processo de modificação da superfície do GCE com uma suspensão de rGO .....56
- Figura 17 – Espectros Raman do GO (vermelho) e rGO (preto), obtidos utilizando um laser de He/Ne (633 nm) com potência de saída de 20 mW .....61

Figura 18 – Espectros de infravermelho do GO (vermelho) e rGO (preto) obtidos pelo modo de reflectância total atenuada com cristal de diamante .....	62
Figura 19 – Difratoograma de raios X obtidos para o GO e rGO. Condições de análise: tubo de cobre (1,54056Å), filtro de Ni e detector linear LynxEye, operando com voltagem de 40 kV e corrente de 40 mA, utilizando a faixa angular de 5° a 60° e fenda de 6 mm .....	63
Figura 20 – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura para o (A) rGO no estado sólido, (B) para a superfície do GCE/rGO, (C) GCE/rGO/AgNps e (D) GCE/rGO/AuNps. Condições: tensão de 30 Kv e ampliações de 1000 vezes .....	64
Figura 21 – Voltamogramas cíclicos obtidos com os diferentes sensores, GCE (preto), GCE/rGO (vermelho), GCE/rGO/AgNps (azul), GCE/rGO/AuNps (verde) e GCE/GO (rosa) na (A) ausência e (B) presença de uma solução de CIP (500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em meio de tampão BR (0,04 $\text{mol L}^{-1}$ , pH 6,0), com velocidade de varredura de 100 $\text{mV s}^{-1}$ .....	65
Figura 22 – (A) Voltamogramas cíclicos de uma solução de CIP (300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em meio de tampão BR (0,04 $\text{mol L}^{-1}$ ) com valores de pH iguais a 2,0 (preto); 4,0 (vermelho); 6,0 (azul); 8,0 (verde); 10,0 (rosa); (B) relação entre a corrente e o pH e (C) relação entre o potencial de pico ( $E_p$ ) e o pH, com velocidade de varredura de 100 $\text{mV s}^{-1}$ .....	67
Figura 23 – (A) Voltamogramas cíclicos de uma solução de CIP (200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em meio de tampão BR (0,04 $\text{mol L}^{-1}$ , pH 6,0) com velocidades de varreduras, (a) 25, (b) 50, (c) 75, (d) 100, (e) 150 e (f) 200 $\text{mV s}^{-1}$ usando o GCE/rGO e; (B) Estudo do potencial de pico ( $E_p$ ) com o logaritmo da velocidade de varredura. O gráfico inserido em (A) representa o ajuste linear entre a corrente e a velocidade de varredura .....	68
Figura 24 – Mecanismo da oxidação eletroquímica da CIP .....	69

Figura 25 – Resultados obtidos a partir da otimização da (A) amplitude, (B) frequência e (C) incremento do potencial, para a determinação de CIP por SWV usando GCE/rGO. Concentração de CIP:  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ , eletrólito suporte: tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 6,0) e eletrodo de referência: Ag/AgCl,KCl(sat) .....70

Figura 26 – (A) Voltamogramas referentes ao estudo de repetibilidade da CIP ( $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) por SWV usando GCE/rGO; e a (B) Curva analítica na faixa de 6 a  $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ , (a) tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 6,0) e (f)  $40 \mu\text{mol L}^{-1}$  de CIP. Condições instrumentais: amplitude 35 mV, frequência 40 Hz e incremento de potencial 10 mV, eletrólito suporte: tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 6,0) e eletrodo de referência: Ag/AgCl,KCl(sat) .....72

Figura 27 – (A) Otimização do potencial de análise para CIP pelo sistema FIA-AMP usando GCE/rGO na faixa de 0,8 a 1,4 V; alça de amostragem:  $50 \mu\text{L}$  e vazão do eletrólito suporte:  $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ , (B) Otimização do volume da alça de amostragem no intervalo de 50 a  $200 \mu\text{L}$ ; potencial: 1,1 V e vazão do eletrólito suporte:  $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ ; (C) Otimização da vazão na faixa de  $1,0$  a  $2,6 \text{ mL min}^{-1}$ ; potencial: 1,1 V e alça de amostragem de  $150 \mu\text{L}$ . Concentração de CIP:  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ , eletrólito suporte: tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 6,0) e eletrodo de referência: Ag/AgCl,KCl(sat) .....74

Figura 28 – (A) Amperograma obtido pelo sistema FIA-AMP usando GCE/rGO com concentrações crescentes e decrescentes de CIP, (a)  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ , (b)  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ , (c)  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ , (d)  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ , (e)  $75 \mu\text{mol L}^{-1}$  e (f)  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (B) Respectivas curvas analíticas plotadas. Condições instrumentais, potencial de análise: 1,1 V, alça de amostragem:  $150 \mu\text{L}$  e vazão do eletrólito suporte:  $1,8 \text{ mL min}^{-1}$ , eletrólito suporte: tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 6,0) e eletrodo de referência: Ag/AgCl,KCl(sat) .....75

Figura 29 – Estudo de repetibilidade ( $n = 10$ ) do sistema de análise FIA-AMP utilizando uma concentração de CIP de  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Condições instrumentais, potencial de análise: 1,1 V, alça de amostragem:  $150 \mu\text{L}$  e vazão do eletrólito suporte:  $1,8 \text{ mL min}^{-1}$ , eletrólito suporte: tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 6,0) e eletrodo de referência: Ag/AgCl,KCl(sat) .....76

Figura 30 – (A) Otimização do potencial de análise para CIP pelo sistema BIA-AMP usando GCE/rGO na faixa de 0,8 a 1,3 V; volume de injeção: 40  $\mu\text{L}$  e velocidade de injeção: 220,6  $\mu\text{L s}^{-1}$ , (B) Otimização do volume de injeção no intervalo de 20 a 100  $\mu\text{L}$ ; potencial: 1,1 V e velocidade de injeção: 220,6  $\mu\text{L s}^{-1}$ ; (C) Otimização da velocidade de injeção na faixa de 73,6 a 316,8  $\mu\text{L s}^{-1}$ ; potencial: 1,1 V e volume de injeção de 40  $\mu\text{L}$ . Concentração de CIP: 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , eletrólito suporte: tampão BR (0,04  $\text{mol L}^{-1}$ , pH 6,0) e eletrodo de referência: Ag/AgCl,KCl(sat) .....77

Figura 31 – (A) Amperograma obtido pelo sistema BIA-AMP usando GCE/rGO com concentrações crescentes e decrescentes de CIP, (a) 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (b) 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (c) 25  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (d) 35  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (e) 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; (B) Respectivas curvas analíticas plotadas. Condições instrumentais, potencial de análise: 1,1 V, volume de injeção: 40  $\mu\text{L}$ , velocidade de injeção: 220,8  $\mu\text{L s}^{-1}$ , eletrólito suporte: tampão BR (0,04  $\text{mol L}^{-1}$ , pH 6,0) e eletrodo de referência: Ag/AgCl,KCl(sat) .....78

Figura 32 – Estudo de repetibilidade ( $n = 10$ ) do sistema de análise BIA-AMP utilizando uma concentração de CIP de 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Condições instrumentais, potencial de análise: 1,1 V, volume de injeção: 50  $\mu\text{L}$ , velocidade de injeção: 220,8  $\mu\text{L s}^{-1}$ , eletrólito suporte: tampão BR (0,04  $\text{mol L}^{-1}$ , pH 6,0) e eletrodo de referência: Ag/AgCl,KCl(sat) .....79

Figura 33 – (A) Voltamogramas obtidos por SWV para determinação de CIP em amostra de leite, (a) leite desnatado, (b) leite desnatado fortificado (10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ); e (B) em formulações farmacêuticas, (c) tampão BR (0,04  $\text{mol L}^{-1}$ , pH 6,0), (d) amostra de fármaco, (e) amostra de fármaco fortificada (25  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Condições instrumentais: amplitude 35 mV, frequência 40 Hz, incremento de potencial 10 mV, eletrodo de referência: Ag/AgCl,KCl(sat) .....81

Figura 34 – Amperograma obtido pelo sistema FIA-AMP para determinação de CIP nas amostras de fármacos ( $A_0$  e  $B_0$ ), fármacos fortificados ( $A_1$ ,  $B_1$ ), leites desnatados ( $C_0$  e  $D_0$ ), leites desnatados fortificados ( $C_1$  e  $D_1$ ), leites integrais

(E<sub>0</sub> e F<sub>0</sub>), leites integrais fortificados (E<sub>1</sub> e F<sub>1</sub>). Curva analítica: (a) 1 μmol L<sup>-1</sup>, (b) 5 μmol L<sup>-1</sup>, (c) 10 μmol L<sup>-1</sup>, (d) 30 μmol L<sup>-1</sup>, (e) 50 μmol L<sup>-1</sup> e (f) 75 μmol L<sup>-1</sup>. Condições instrumentais, potencial de análise: 1,1 V, alça de amostragem: 150 μL e vazão do eletrólito suporte: 1,8 mL min<sup>-1</sup>, eletrólito suporte: tampão BR (0,04 mol L<sup>-1</sup>, pH 6,0) .....82

Figura 35 – Amperograma obtido pelo sistema BIA-AMP para determinação de CIP nas amostras de fármacos (A<sub>0</sub> e B<sub>0</sub>), fármacos fortificados (A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>), leites desnatados (C<sub>0</sub> e D<sub>0</sub>), leites desnatados fortificados (C<sub>1</sub> e D<sub>1</sub>), leites integrais (E<sub>0</sub> e F<sub>0</sub>), leites integrais fortificados (E<sub>1</sub> e F<sub>1</sub>). Curva analítica: (a) 1 μmol L<sup>-1</sup>, (b) 5 μmol L<sup>-1</sup>, (c) 10 μmol L<sup>-1</sup>, (d) 30 μmol L<sup>-1</sup>, (e) 50 μmol L<sup>-1</sup> e (f) 75 μmol L<sup>-1</sup>. Condições instrumentais, potencial de análise: 1,1 V, volume de injeção: 40 μL, velocidade de injeção: 220,8 μL s<sup>-1</sup>, eletrólito suporte: tampão BR (0,04 mol L<sup>-1</sup>, pH 6,0) .....83

Figura 36 – Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando GCE (vermelho) e GCE/rGO (preto) na ausência e presença de TET (300 μmol L<sup>-1</sup>) em meio de tampão BR (0,04 mol L<sup>-1</sup>, pH 10,0) com velocidade de varredura de 100 mV s<sup>-1</sup> .....90

Figura 37 – (A) Voltamogramas cíclicos de uma solução de TET (300 μmol L<sup>-1</sup>) em meio de tampão BR (0,04 mol L<sup>-1</sup>) com valores de pH iguais a 2,0 (preto); 4,0 (vermelho); 6,0 (azul); 8,0 (verde); 10,0 (rosa); (B) relação entre a corrente e o pH e (C) relação entre o E<sub>p</sub> e o pH, com velocidade de varredura de 100 mV s<sup>-1</sup> .....91

Figura 38 – Reações dos processos envolvendo a oxidação eletroquímica da TET .....92

Figura 39 – Voltamogramas cíclicos de uma solução de TET (200 μmol L<sup>-1</sup>) em meio de tampão BR (0,04 mol L<sup>-1</sup>, pH 10,0) com velocidades de varreduras, (a) 25, (b) 50, (c) 75, (d) 100, (e) 150 e (f) 200 mV s<sup>-1</sup> usando o GCE/rGO. O gráfico inserido em (A) representa o ajuste linear entre a corrente e a velocidade de varredura .....93



Figura 40 – (A) Otimização do potencial de análise da TET por amperometria na faixa de 0,5 a 1,0 V; alça de amostragem: 50  $\mu\text{L}$  e vazão do eletrólito suporte: 1,5  $\text{mL min}^{-1}$ , (B) Otimização do volume da alça de amostragem no intervalo de 50 a 200  $\mu\text{L}$ ; potencial: 0,9 V e vazão do eletrólito suporte: 1,5  $\text{mL min}^{-1}$ ; (C) Otimização da vazão do eletrólito suporte na faixa de 1,0 a 2,6  $\text{mL min}^{-1}$ ; potencial: 0,9 V e alça de amostragem de 150  $\mu\text{L}$ . Concentração de TET igual a 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e eletrólito suporte, tampão BR (0,04  $\text{mol L}^{-1}$ , pH 10,0) .....95

Figura 41 – (A) Amperograma obtido pelo sistema FIA-AMP usando GCE/rGO com concentrações crescentes e decrescentes de TET, (a) 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (b) 20  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (c) 30  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (d) 40  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (e) 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; (B) Respectivas curvas analíticas plotadas. Condições de análise, potencial de análise: 0,9 V, alça de amostragem: 150  $\mu\text{L}$  e vazão do eletrólito suporte: 1,8  $\text{mL min}^{-1}$ , eletrólito suporte: tampão BR (0,04  $\text{mol L}^{-1}$ , pH 10,0) .....96

Figura 42 – Estudo de repetibilidade ( $n = 10$ ) utilizando uma concentração de TET de 25  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Condições instrumentais, potencial de análise: 0,9 V, alça de amostragem: 150  $\mu\text{L}$  e vazão do eletrólito suporte: 1,8  $\text{mL min}^{-1}$ , eletrólito suporte: tampão BR (0,04  $\text{mol L}^{-1}$ , pH 10,0) .....97

Figura 43 – (A) Otimização do potencial de análise para TET pelo sistema BIA-AMP usando GCE/rGO na faixa de 0,5 a 1,0 V; (B) Otimização do volume de injeção no intervalo de 10 a 100  $\mu\text{L}$ ; (C) Otimização da velocidade de injeção na faixa de 16,5 a 370  $\mu\text{L s}^{-1}$ . Concentração de TET: 25  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , eletrólito suporte: tampão BR (0,04  $\text{mol L}^{-1}$ , pH 10,0) e eletrodo de referência: Ag/AgCl,KCl(sat).....98

Figura 44 – (A) Amperograma obtido pelo sistema BIA-AMP usando GCE/rGO com concentrações de TET, (a) 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (b) 3  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (c) 5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (d) 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (e) 20  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (f) 25  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (g) 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (h) 75  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (i) 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (j) 200  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (k) 300  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (l) 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (m) 700  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; (B) Respectivas curvas analíticas plotadas. Condições instrumentais, potencial de análise: 0,9 V, volume de injeção: 100  $\mu\text{L}$ , velocidade de injeção:

277  $\mu\text{L s}^{-1}$ , eletrólito suporte: tampão BR (0,04 mol  $\text{L}^{-1}$ , pH 10,0) e eletrodo de referência: Ag/AgCl,KCl(sat) .....99

Figura 45 – Estudo de repetibilidade (n = 10) do sistema de análise BIA-AMP utilizando uma concentração de TET de 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Condições instrumentais, potencial de análise: 1,1 V, volume de injeção: 100  $\mu\text{L}$ , velocidade de injeção: 277  $\mu\text{L s}^{-1}$ , eletrólito suporte: tampão BR (0,04 mol  $\text{L}^{-1}$ , pH 10,0) e eletrodo de referência: Ag/AgCl,KCl(sat) .....100

Figura 46 – Amperograma obtido pelo sistema FIA-AMP para determinação de TET nas amostras de fármacos ( $A_0$  e  $B_0$ ), fármacos fortificados ( $A_1$ ,  $B_1$ ), leites desnatados ( $C_0$  e  $D_0$ ), leites desnatados fortificados ( $C_1$  e  $D_1$ ), leites integrais ( $E_0$  e  $F_0$ ), leites integrais fortificados ( $E_1$  e  $F_1$ ), curva analítica (1) 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (2) 30  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (3) 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (4) 75  $\mu\text{mol L}^{-1}$  and (5) 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Condições instrumentais, potencial de análise: 0,9 V, alça de amostragem: 150  $\mu\text{L}$  e vazão do eletrólito suporte: 1,8  $\text{mL min}^{-1}$ , eletrólito suporte: tampão BR (0,04 mol  $\text{L}^{-1}$ , pH 10,0) .....102

Figura 47 – Amperograma obtido pelo sistema BIA-AMP para determinação de TET nas amostras de fármacos ( $A_0$  e  $B_0$ ), fármacos fortificados ( $A_1$ ,  $B_1$ ), leites desnatados ( $C_0$  e  $D_0$ ), leites desnatados fortificados ( $C_1$  e  $D_1$ ), leites integrais ( $E_0$  e  $F_0$ ), leites integrais fortificados ( $E_1$  e  $F_1$ ), curva analítica (1) 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (2) 3  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (3) 5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (4) 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (5) 25  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (6) 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  and (7) 75  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Condições instrumentais, potencial de análise: 0,9 V, volume de injeção: 100  $\mu\text{L}$  e velocidade de injeção: 277  $\mu\text{L s}^{-1}$ , eletrólito suporte: tampão BR (0,04 mol  $\text{L}^{-1}$ , pH 10,0) .....103

Figura 48 – Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando GCE (vermelho) e GCE/rGO (preto) na ausência e presença de CLO (450  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em meio de tampão BR (0,04 mol  $\text{L}^{-1}$ , pH 2,0). Condições instrumentais: velocidade de varredura: 100  $\text{mV s}^{-1}$ , potencial de condicionamento: -1,0 V, tempo de condicionamento: 15 s .....109

Figura 49 – Mecanismos das etapas de redução e oxidação eletroquímica do CLO .....110

Figura 50 – (A) Voltamogramas cíclicos de uma solução de CLO ( $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em meio de tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ ) com valores de pH iguais a 2,0 (preto); 4,0 (vermelho); 6,0 (azul); 8,0 (verde); 10,0 (rosa); (B) relação entre a corrente e o pH e (C) relação entre o  $E_p$  e o pH. Condições instrumentais: velocidade de varredura:  $100 \text{ mV s}^{-1}$ , potencial de condicionamento:  $-1,0 \text{ V}$ , tempo de condicionamento:  $15 \text{ s}$  .....111

Figura 51 – (A) Voltamogramas cíclicos de uma solução de CLO ( $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em meio de tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , pH = 2,0) com velocidades de varreduras, (a) 70, (b) 93, (c) 114, (d) 135, (e) 155, (f) 175 (g) 197, (h) 217, (i) 238, (j) 260, (k) 280, e (l)  $300 \text{ mV s}^{-1}$  usando o GCE e; (B) usando GCE/rGO. Os gráficos inseridos representam os ajustes lineares entre a corrente (em módulo) e a velocidade de varredura .....112

Figura 52 – Resultados obtidos a partir da otimização do (A) tempo de acumulação, (B) amplitude, (C) incremento do potencial e (D) tempo de modulação, para a redução de CLO por DPV usando GCE/rGO. Concentração de CLO:  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ , eletrólito suporte: tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 2,0) e eletrodo de referência: Ag/AgCl,KCl(sat) .....114

Figura 53 - Estudo de repetibilidade por DPV ( $n = 10$ ) utilizando uma concentração de CLO de  $35 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Condições instrumentais, tempo de acumulação:  $30 \text{ s}$ , amplitude:  $70 \text{ mV}$ , incremento de potencial:  $8 \text{ mV}$ , tempo de modulação:  $50 \text{ ms}$  e eletrólito suporte: tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 2,0) .....115

Figura 54 – (A) Voltamogramas obtidos por DPV a partir das curvas analíticas com concentrações de CLO variando de (a) tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 2,0), (b) 11, (c) 22, (d) 34, (e) 45, (f) 56 e (g)  $66 \mu\text{mol L}^{-1}$  utilizando GCE (vermelho) e GCE/rGO (preto); (B) respectivas curvas analíticas plotadas. Condições instrumentais, tempo de acumulação em circuito aberto:  $30 \text{ s}$ , amplitude:  $70 \text{ mV}$ , incremento de potencial:  $8 \text{ mV}$ , tempo de modulação:  $50 \text{ ms}$  .....116

Figura 55 – (A) Voltamogramas obtidos por DPV para determinação de CLO em amostra de leite desnatado; e (B) em amostra de leite integral; branco (linha preta), amostras de leite (linhas vermelhas) e amostras de leite fortificadas com 27  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de CLO (linhas azuis). Condições instrumentais, tempo de acumulação em circuito aberto: 30 s, amplitude: 70 mV, incremento de potencial: 8 mV, tempo de modulação: 50 ms .....118

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação das características analíticas de ambos os métodos desenvolvidos para a determinação da CIP .....	80
Tabela 2 – Teores de CIP e percentuais de recuperação obtidos a partir das análises das amostras de fármacos por SWV, FIA-AMP, BIA-AMP e HPLC (n = 3) .....	84
Tabela 3 – Valores de recuperação para CIP nas amostras de leite (n = 3) .....	85
Tabela 4 – Comparação dos métodos desenvolvidos com outros métodos eletroanalíticos reportados na literatura para a deteminação de CIP .....	87
Tabela 5 – Comparação das figuras de mérito de ambos os métodos desenvolvidos para a determinação da TET .....	101
Tabela 6 – Resultados referentes à determinação de TET nas amostras farmacêuticas por BIA-AMP, FIA-AMP e UFLC (n = 3) .....	104
Tabela 7 – Percentuais de recuperação para TET nas amostras de leite (n = 3) .....	105
Tabela 8 – Comparação das características analíticas dos métodos desenvolvidos (BIA-AMP e FIA-AMP) com outros métodos eletroanalíticos relatados na literatura para a determinação de TET .....	106
Tabela 9 – Comparação das características analíticas usando GCE e GCE/rGO para a determinação de CLO por DPV .....	117
Tabela 10 – Percentuais de recuperação para CLO nas amostras de leite (n = 3) .....	119
Tabela 11 – Comparação do desempenho analítico do método desenvolvido por DPV usando GCE/rGO com outros métodos eletroanalíticos relatados na literatura para a determinação de CLO .....	121

## LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Equação de Laviron .....	69
Equação 2 – Cálculo do limite de detecção .....	72
Equação 3 – Cálculo do limite de quantificação .....	72

## LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

A	rea eletroativa
AgNps	Nanopartículas de prata
AMP	Amperometria
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AuNps	Nanopartículas de ouro
BIA	Análise por injeção em batelada, do inglês <i>Batch injection analysis</i>
BIA-AMP	Análise por injeção em batelada com detecção amperométrica
BR	Britton-Robinson
CIP	Ciprofloxacina
CLO	Cloranfenicol
CPE	Eletrodo de pasta de carbono, do inglês <i>Carbon paste electrode</i>
CV	Voltametria cíclica, do inglês <i>Cyclic voltammetry</i>
CVD	Deposição química  vapor, do inglês <i>Chemical vapor deposition</i>
D	Coefficiente de difusão
DMF	Dimetilformamida
DNA	cido Desoxirribonucleico
DPV	Voltametria de pulso diferencial, do inglês <i>differential pulse voltammetry</i>
EIS	Espectroscopia de impedância eletroquímica, do inglês <i>Electrochemical Impedance Spectroscopy</i>
Ep	Potencial de pico
EQM	Eletrodo quimicamente modificado
F	Constante de Faraday
FIA	Análise por injeção em fluxo, do inglês <i>Flow injection analysis</i>
FIA-AMP	Análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica
GCE	Eletrodo de carbono vítreo, do inglês <i>Glassy carbon electrode</i>
GCE/rGO	Eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno reduzido
GCE/rGO/AgNps	Eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno reduzido e nanopartículas de prata

GCE/rGO/AuNps	Eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno reduzido e nanopartículas de ouro
GO	Óxido de grafeno, do inglês <i>Graphene oxide</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês <i>High performance liquid chromatography</i>
Ip	Corrente de pico
LD	Limite de detecção
LMR	Limite máximo residual
LQ	Limite de quantificação
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MIP	Polímero molecularmente impresso, do inglês <i>Molecularly imprinted polymer</i>
MPA	Amperometria de múltiplos pulsos, do inglês <i>Multiple pulse amperometry</i>
PGE	Eletrodo de grafite de lápis, do inglês <i>Pencil graphite electrode</i>
R	Constante dos gases ideais
rGO	Óxido de grafeno reduzido, do inglês <i>Reduced graphene oxide</i>
RSD	Desvio padrão relativo, do inglês <i>Relative standard deviation</i>
SPCE	Eletrodo de carbono impresso, do inglês <i>Screen-printed carbon electrode</i>
SWV	Voltametria de onda quadrada, do inglês <i>Square wave voltammetry</i>
T	Temperatura
TET	Tetraciclina
UFLC	Cromatografia líquida ultra-rápida, do inglês <i>ultra-fast liquid chromatography</i>
UV-VIS	Ultravioleta-visível
v	Velocidade de varredura
$\alpha$	Coefficiente de transferência eletrônica



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>26</b>
1.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS .....	26
1.2 ELETRODOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS.....	26
1.3 GRAFENO .....	27
<b>1.3.1 Eletrodos modificados com grafeno.....</b>	<b>28</b>
1.4 AVALIAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS E NO LEITE .....	32
<b>1.4.1 Ciprofloxacina.....</b>	<b>33</b>
<b>1.4.2 Tetraciclina .....</b>	<b>36</b>
<b>1.4.3 Cloranfenicol.....</b>	<b>39</b>
1.5 TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS .....	42
1.6 ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO .....	46
1.7 ANÁLISE POR INJEÇÃO EM BATELADA .....	48
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>51</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	51
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	51
<b>3 PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>52</b>
3.1 INSTRUMENTAÇÃO, ELETRODOS E CÉLULAS ELETROQUÍMICAS .....	52
3.2 REAGENTES E SOLUÇÕES.....	54
3.3 SÍNTESE DO ÓXIDO DE GRAFENO REDUZIDO .....	55
3.4 MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DO GCE COM RGO VIA <i>DROP CASTING</i> .....	55
3.5 CARACTERIZAÇÕES DOS MATERIAIS .....	57
3.6 AQUISIÇÕES E PREPARO DAS AMOSTRAS DE FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS E LEITE.....	57

3.7 DETERMINAÇÕES DOS ANTIBIÓTICOS POR CV, SWV, BIA E FIA COM DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA .....	58
3.8 DETERMINAÇÕES CROMATOGRÁFICAS DOS ANTIBIÓTICOS.....	59
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>61</b>
4.1 CARACTERIZAÇÕES DOS MATERIAIS .....	61
4.2 ESTUDOS ELETROQUÍMICOS COM A CIPROFLOXACINA .....	65
4.2.1 Investigação do comportamento eletroquímico da ciprofloxacina por CV....	65
4.2.2 Avaliação da ciprofloxacina por SWV .....	70
4.2.3 Avaliação da ciprofloxacina por FIA-AMP .....	72
4.2.4 Avaliação da ciprofloxacina por BIA-AMP .....	76
4.2.5 Aplicação dos métodos SWV, FIA-AMP e BIA-AMP para determinação de ciprofloxacina em amostras de formulações farmacêuticas e leite .....	80
4.2.6 Conclusões parciais .....	88
4.2.7 Publicações .....	89
4.3 ESTUDOS ELETROQUÍMICOS COM A TETRACICLINA.....	90
4.3.1 Investigação do comportamento eletroquímico da tetraciclina por CV.....	90
4.3.2 Avaliação da tetraciclina por FIA-AMP .....	93
4.3.3 Avaliação da tetraciclina por BIA-AMP .....	97
4.3.4 Aplicação dos métodos FIA-AMP e BIA-AMP para determinação de tetraciclina em amostras de formulações farmacêuticas e leite .....	101
4.3.5 Conclusões parciais .....	108
4.3.6 Publicações .....	108
4.4 ESTUDOS ELETROQUÍMICOS COM O CLORANFENICOL.....	109
4.4.1 Investigação do comportamento eletroquímico do cloranfenicol por CV....	109
4.4.2 Avaliação do cloranfenicol por DPV.....	113
4.4.3 Aplicação do método por DPV para determinação de cloranfenicol em amostras de leite .....	117
4.4.4 Conclusões parciais .....	123
<b>5 CONCLUSÕES FINAIS .....</b>	<b>124</b>

<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>126</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>127</b>
<b>APÊNDICE A. DEMAIS TRABALHOS PUBLICADOS COM GCE/RGO .....</b>	<b>145</b>
<b>APÊNDICE B. PUBLICAÇÕES DURANTE A PÓS-GRADUAÇÃO .....</b>	<b>146</b>
<b>APÊNDICE C. PARTICIPAÇÕES EM CONGRESSOS CIENTÍFICOS .....</b>	<b>148</b>
<b>APÊNDICE D. TRABALHOS SUBMETIDOS.....</b>	<b>149</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A eletroanalítica é uma subárea da química analítica com elevada versatilidade, que permite o desenvolvimento de métodos simples, rápidos e portáteis para a avaliação de compostos orgânicos, inorgânicos e organometálicos (desde que estes sejam eletroativos), nos mais variados tipos de matrizes. Destacam-se aplicações na área de alimentos (MANJULA; CHEN, 2021), meio ambiente (COBELO-GARCÍA; FILELLA, 2017), combustíveis (FERREIRA *et al.*, 2021), diagnóstico clínico (EVTUGYN; HIANIK, 2018), controle de qualidade de alimentos (LENCASTRE *et al.*, 2006), forense (ROCHA *et al.*, 2021), entre outras, com importantes características analíticas, tais como: baixo custo instrumental (em comparação as técnicas cromatográficas e espectrométricas) e adequada sensibilidade e detectabilidade.

Uma vertente bastante explorada nesta área nos últimos anos é o desenvolvimento de novos sensores eletroquímicos, a partir da modificação química da superfície de substratos convencionais com o objetivo de agregar aos métodos eletroanalíticos uma melhor sensibilidade, detectabilidade, seletividade e precisão (EDWARDS *et al.*, 2007; RUDNICKI *et al.*, 2020; SAJID *et al.*, 2019). Nanomateriais condutores têm sido cada vez mais empregados para esta finalidade, uma vez que estes apresentam elevada área superficial e proporcionam um maior número de sítios eletroativos para ocorrência dos processos de eletrólise. Além disso, contribuem para um transporte de massa eficiente, de modo a aumentar a relação sinal-ruído (BAIG *et al.*, 2019).

## 1.2 ELETRODOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS

O termo eletrodo quimicamente modificado (EQM) foi introduzido por Murray e colaboradores no ano de 1975 para designar eletrodos com espécies quimicamente ativas, convenientemente imobilizadas em suas superfícies, com o intuito de pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo/solução, visando uma melhora na taxa de transferência de elétrons e pré-concentração das espécies em solução (ASHWINI *et al.*, 2019; BAIG *et al.*, 2019; MOSES *et al.*, 1975; SAJID *et al.*, 2019).

Para a construção de um EQM, a escolha do material do eletrodo base (substrato) é um fator importante, dado que este deve apresentar características apropriadas e ser

adequado para o método de imobilização. Dentre os materiais amplamente utilizados, estão o ouro, platina, carbono vítreo e pasta de carbono (SOUZA, 1997). O eletrodo de carbono vítreo (GCE, do inglês *Glassy Carbon Electrode*) apresenta boas propriedades elétricas e mecânicas, ampla janela de potencial, resistência ao ataque de solventes e desempenho satisfatório na eletroanálise, o que faz deste material um adequado substrato para a fabricação de eletrodos quimicamente modificados (AMARE; ADMASSIE, 2020; BAGHAYERI *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2012).

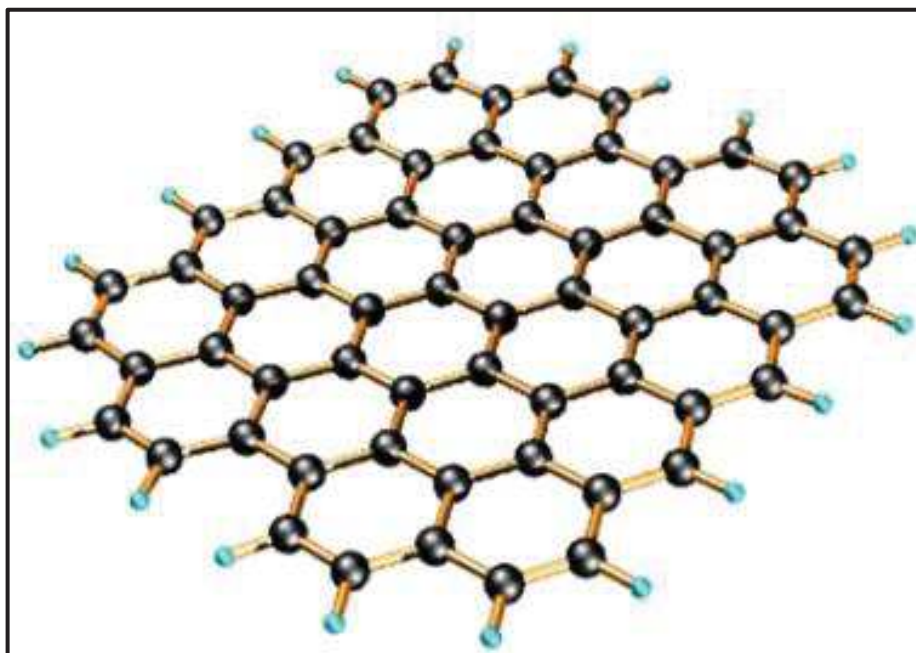
Além dos substratos é necessário um modificador, o qual deve ser devidamente incorporado e imobilizado na superfície do substrato. Os modificadores mais estudados são nanomateriais a base de carbono (nanotubos de carbono, fulereno, grafite, *carbon black* e principalmente grafeno) e nanopartículas metálicas (HARIDAS *et al.*, 2021; HERNÁNDEZ *et al.*, 2021; NELIS *et al.*, 2021; PUSHPANJALI *et al.*, 2021; SULLIVAN *et al.*, 2021; TASIĆ *et al.*, 2021). A utilização destes se deve aos supostos efeitos eletrocatalíticos proporcionados para diversas espécies, que ocasionam diminuição nos sobrepotenciais e melhora nas respostas de corrente.

Os processos de modificações das superfícies podem ser realizados via adsorção, formação de compósitos, ligação covalente com sítios específicos da superfície do eletrodo e recobrimento com filmes poliméricos (PEREIRA *et al.*, 2002).

### 1.3 GRAFENO

O grafeno é um material bidimensional com espessura de um átomo, formado por átomos de carbono hibridizados em  $sp^2$  numa estrutura hexagonal densamente compacta, conforme representado na Figura 1 (PRUNEANU *et al.*, 2015). Foi descoberto no ano de 2004 pelos físicos russos Andre K. Geim e Kostya S. Novoselov a partir da exfoliação micromecânica da grafite, o que conferiu aos pesquisadores o prêmio Nobel de Física no ano de 2010 (LOW *et al.*, 2013). Sua obtenção atualmente pode ser feita por várias rotas sintéticas, como por exemplo, exfoliação mecânica da grafite, exfoliação química da grafite (método de Hummers), deposição química a vapor (CVD, do inglês *Chemical Vapor Deposition*), além de tratamentos eletroquímicos envolvendo técnicas voltamétricas (DA SILVA *et al.*, 2020; JUANG *et al.*, 2010; PARVEZ *et al.*, 2015; PUMERA *et al.*, 2010; ZAABA *et al.*, 2017).

Figura 1 – Representação esquemática da estrutura do grafeno



Fonte: Adaptado de (ZARBIN; OLIVEIRA, 2013).

O método de Hummers é o mais utilizado visando à produção em larga escala. Este consiste em dispersar a grafite em um meio de ácido sulfúrico concentrado, nitrato de sódio e permanganato de potássio sob aquecimento (HUMMERS; OFFEMAN, 1958). Estudos comprovam que o grafeno possui propriedades únicas, como elevada condutividade elétrica, que é superior em até sessenta vezes a dos nanotubos de carbono, alta flexibilidade, elevada área superficial ( $2620 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  – valor teórico) e resistência mecânica superior ao aço (BROWNSON; BANKS, 2010). Diante disto, o mesmo vem sendo empregado para construção de super capacitores (HAO *et al.*, 2020; YANG *et al.*, 2011), baterias (CHENG *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2021) e principalmente sensores eletroquímicos (HALDORAI *et al.*, 2017; PHONG *et al.*, 2018; ROCHA; DORNELLAS; *et al.*, 2018).

### 1.3.1 Eletrodos modificados com grafeno

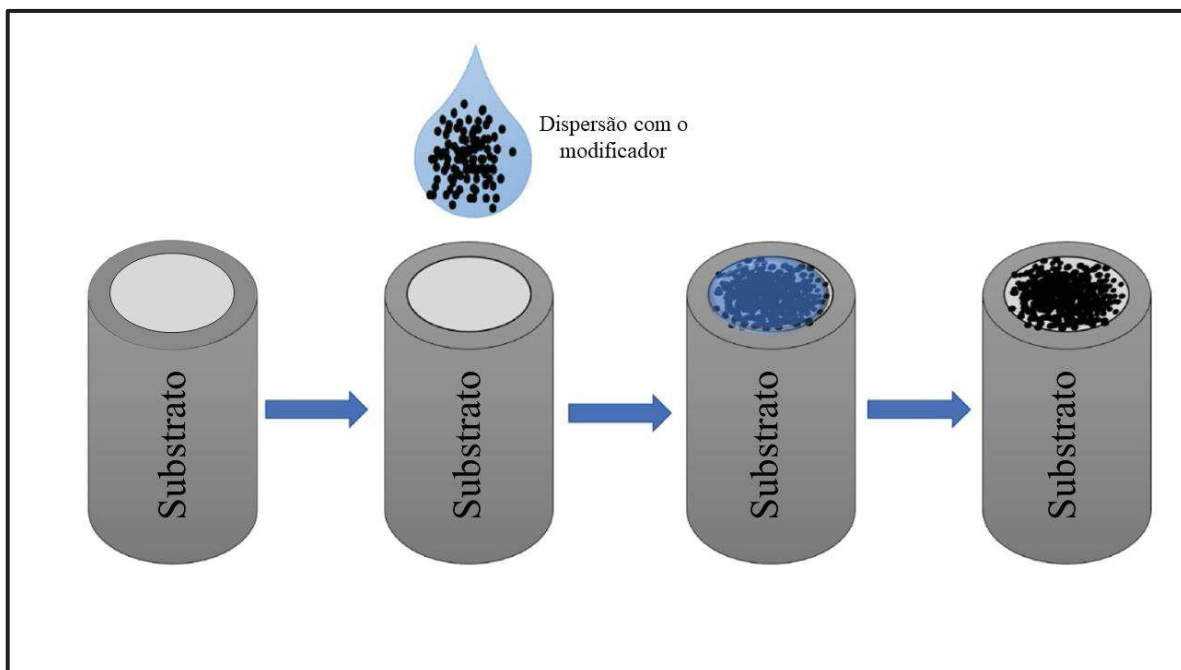
No desenvolvimento de novos sensores eletroquímicos, o recobrimento das superfícies de eletrodos com dispersões a base de grafeno tem se destacado. Em virtude do caráter hidrofóbico do mesmo, algumas alternativas são empregadas para facilitar a sua dispersão em meio aquoso, como a inserção de grupos oxi-funcionais na estrutura e

o uso de banho ultrassom, tendo em vista que a condutividade elétrica é mais elevada no caso de uma melhor dispersão do material (CHEN *et al.*, 2012; VISWANATHAN; RAMARAJ, 2019). Desta forma, a maioria dos sensores eletroquímicos a base de grafeno são desenvolvidos usando seus derivados, óxido de grafeno (GO, do inglês *Graphene Oxide*) e/ou óxido de grafeno reduzido (rGO, do inglês *Reduced Graphene Oxide*).

O GO consiste em uma camada de grafeno funcionalizada com grupos epóxi, hidroxila, carboxílicos e carbonila, sendo geralmente preparado a partir da oxidação de flocos de grafite (NANDA *et al.*, 2015). A introdução destes grupos funcionais na estrutura resulta no aumento do espaçamento interlamelar, bem como na alteração da hibridação dos átomos de carbono de  $sp^2$  (planar) para  $sp^3$  (tetraédrica). Entretanto, apesar do número de grupos oxi-funcionais melhorar a dispersabilidade do material, ocorre também a presença de defeitos na estrutura, o que contribui para um caráter predominantemente isolante (DREYER *et al.*, 2010). A fim de restaurar a condutividade do material, uma grande parte dos grupos oxi-funcionais no GO podem ser removidos via redução química e/ou eletroquímica para obtenção do rGO, que apresenta características mais adequadas para sensores eletroquímicos (ROCHA; DORNELLAS; *et al.*, 2018).

O processo de modificação por adsorção vem sendo bastante utilizado para incorporar dispersões de rGO em diferentes substratos eletroquímicos. Em grande parte dos trabalhos reportados na literatura, são observadas modificações estáveis com baixa dessorção do modificador, possibilitando obter uma boa reprodutibilidade do sinal analítico durante as análises (GAN *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2020; VASCONCELOS *et al.*, 2020). O método *drop casting* é o mais empregado para este propósito, em razão da simplicidade e baixo custo. Neste método um determinado volume da dispersão do modificador é gotejado sobre o substrato, seguido pela evaporação do solvente, conforme representado na Figura 2 (KALIYARAJ SELVA KUMAR *et al.*, 2020).

Figura 2 – Representação esquemática da modificação da superfície de um substrato por adsorção utilizando o método *drop casting*

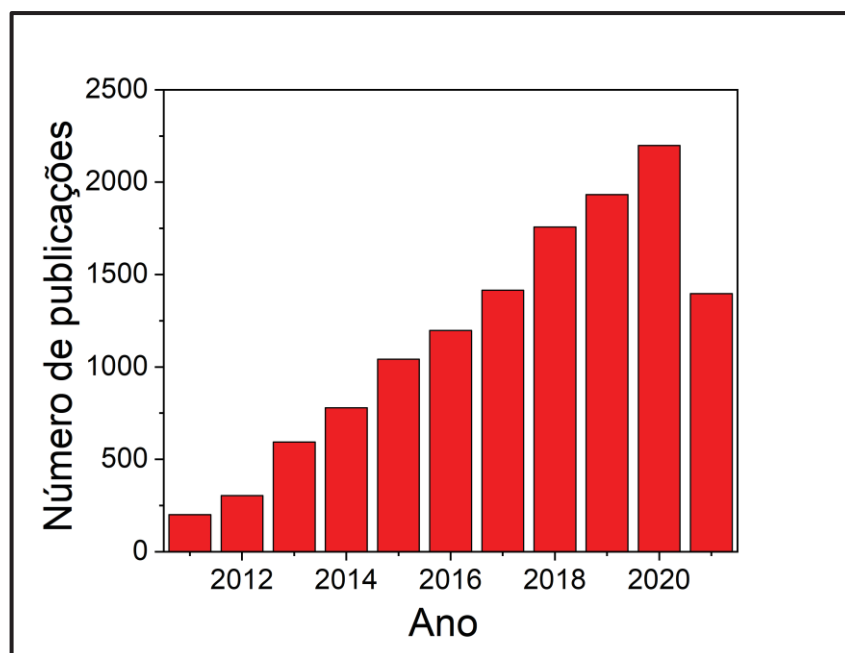


Fonte: Adaptado de (KALIYARAJ SELVA KUMAR *et al.*, 2020).

Utilizando a base de dados *Science Direct* e o termo de busca “*Electrochemical sensor using reduced graphene oxide*” com relação a apenas “*research articles*”, foi realizado um levantamento de publicações nos últimos 10 anos envolvendo este material para construção de sensores eletroquímicos, onde é notório o aumento do número de trabalhos, conforme mostrado na Figura 3.



Figura 3 – Levantamento bibliográfico dos últimos 10 anos utilizando a plataforma *Science Direct* e o termo de busca “*Electrochemical sensor using reduced graphene oxide*”, acesso em 23 de abril de 2021.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2021).

Estes trabalhos evidenciam ganho de sensibilidade, seletividade e detectabilidade em comparação aos eletrodos sem modificação e/ou modificados com outros materiais. No que diz respeito às aplicações, muitas estão focadas no monitoramento de antibióticos em amostras de interesse clínico, farmacêutico e alimentício (CESARINO *et al.*, 2016; DA SILVA *et al.*, 2018; EBRAHIMI *et al.*, 2017; GOVINDASAMY *et al.*, 2019; HUANG *et al.*, 2017; KUMAR *et al.*, 2017; MATERÓN *et al.*, 2021; YUE *et al.*, 2020).

Huang e colaboradores utilizaram GCE modificado com grafeno e amino fenol para determinação de levofloxacina em amostras de leite por voltametria de pulso diferencial (DPV, do inglês *Differential Pulse Voltammetry*) com ampla faixa linear (0,05 – 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), baixo limite de detecção (LD) (0,01  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e percentuais de recuperações na faixa de 96 a 101%, demonstrando uma boa exatidão das análises (HUANG *et al.*, 2017).

De forma similar, Kumar e colaboradores avaliaram simultaneamente amoxicilina e lamefloxacina usando GCE modificado com rGO e nanopartículas de paládio em amostras de urina por voltametria de onda quadrada (SWV, do inglês *Square Wave Voltammetry*). Foram obtidos LD de 81  $\text{nmol L}^{-1}$  e 9  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para lamefloxacina e

amoxicilina, respectivamente, e percentuais de recuperação para ambos analitos próximos à 100 % (KUMAR *et al.*, 2017).

Ebrahimi e colaboradores desenvolveram um eletrodo de pasta de carbono (CPE, do inglês *Carbon Paste Electrode*) contendo 5% m/m de nanocompósito de rGO e óxido de cério para a quantificação de sulfadiazina em amostras de formulações farmacêuticas por SWV. Resultados concordantes com os valores fornecidos pelos rótulos dos medicamentos foram verificados (EBRAHIMI *et al.*, 2017).

A partir dos estudos mencionados, verifica-se a potencialidade do rGO para construções de plataformas eletroquímicas eficientes visando à determinação de diferentes classes de antibióticos. Além disso, nota-se que similarmente aos substratos convencionais, o rGO também pode ser um suporte para posterior modificação, em busca de um sensor ainda mais sensível e seletivo. Neste sentido, nanopartículas metálicas (ouro e prata) se mostram atrativas, visto que apresentam atividades eletrocatalíticas para diversos compostos (inorgânicos e orgânicos), além de boa condutividade elétrica e elevada área superficial (DONINI *et al.*, 2018; JIAN *et al.*, 2018; NAQVI *et al.*, 2019; PIOVESAN *et al.*, 2018; SAQUIB; HALDER, 2018).

#### 1.4 AVALIAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS E NO LEITE

O setor farmacêutico vem crescendo de maneira significativa no decorrer dos anos, de modo que no ano de 2020 o movimento global em vendas alcançou 1,74 trilhões de dólares, segundo o levantamento da consultoria IQVIA.

O termo fármaco é definido como uma substância química ativa, que apresenta propriedades farmacológicas para curar efetivamente patologias (DAS; CHAKRABORTY, 2016). Dentre os fármacos, os antibióticos correspondem à maior e mais importante classe empregada pela medicina humana e veterinária. Estes são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir ou causar a morte de bactérias e fungos (HERNÁNDEZ *et al.*, 2003; RIAZ *et al.*, 2020). São classificados de acordo com alguns critérios tais como: fonte de origem, espectro de atividade, mecanismo de ação e estrutura química (O'ROURKE *et al.*, 2020).

O crescente aumento na produção e desenvolvimento de antibióticos estimularam as indústrias farmacêuticas a atestarem a qualidade destes produtos com intuito de assegurar a eficácia e a segurança para a população, tendo em vista os critérios pré-

estabelecidos por agências reguladoras. Neste sentido, um controle rigoroso do teor do princípio ativo em formulações farmacêuticas é de extrema importância, e deve ser rotineiramente averiguado.

O uso de antibióticos para promover o crescimento, controlar pragas, tratar e prevenir enfermidades do gado leiteiro pode gerar resíduos perigosos no leite, quando administrados de modo indevido sem respeitar receituários e períodos de carência (ROSANA GOMES *et al.*, 2012). Segundo Du e colaboradores, os medicamentos de uso veterinário não são completamente eliminados durante a etapa de tratamento térmico do leite (pasteurização), o que pode ocasionar problemas para as indústrias lácteas e para a saúde pública (DU *et al.*, 2019).

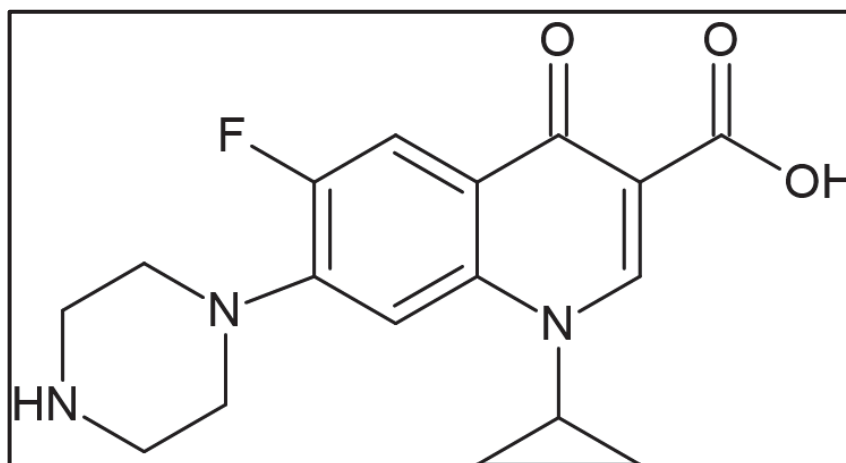
Nas indústrias de laticínios, a presença de resíduos de antibióticos no leite pode gerar efeitos indesejáveis na produção de produtos lácteos, devido à possível inibição da flora bacteriana nos processos de fermentação, causando consideráveis perdas econômicas. Em relação à saúde humana, estes podem desencadear reações de hipersensibilidade, alergia, ação carcinogênica ou mutagênica, além de provocar resistência bacteriana (LAERTE PEREIRA DE *et al.*, 2006).

Devido aos efeitos danosos que resíduos de antibióticos no leite podem causar, o controle destes são de suma importância e os valores máximos permitidos são estipulados por órgãos regulatórios de diversos países. No Brasil, de acordo com a Lei nº 9782, de 26 de Janeiro de 1999, é atribuído à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a regulamentação, o controle e a fiscalização de alimentos, no que se refere a resíduos de medicamentos veterinários (BRASIL, 2018). Dentre alguns antibióticos empregados pela medicina humana e práticas veterinárias, destacam-se a ciprofloxacina, tetraciclina e cloranfenicol, uma vez que estes apresentam baixo custo e ampla ação antibacteriana (AL-AFY *et al.*, 2018; HASSAN *et al.*, 2021; KALUNKE *et al.*, 2018).

#### **1.4.1 Ciprofloxacina**

A ciprofloxacina (CIP), nome usual do ácido-1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-diidro-4-oxo-7-(piperazinil)3-chinolincarboxílico, estrutura química representada na Figura 4, é um antibiótico sintético pertencente a classe das fluoroquinolonas, com atividade antibacteriana frente a diversos microrganismos patogênicos (PULGARÍN *et al.*, 2012).

Figura 4 – Estrutura química da ciprofloxacina



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2021).

As quinolonas surgiram acidentalmente como subproduto da síntese de um agente antimalárico. A primeira quinolona foi o ácido nalidíxico, que apresentou atividade apenas frente a enterobactérias e, portanto, sua prescrição era restrita a infecções simples do trato urinário (FRADE *et al.*, 2014; SOUSA *et al.*, 2012). A introdução de diferentes grupos funcionais na estrutura das quinolonas originou compostos com um espectro de ação mais amplo, melhor efeito farmacocinético e menor toxicidade (FEDOROWICZ; SĄCZEWSKI, 2018; SOUSA *et al.*, 2012). Atualmente as quinolonas são agrupadas em três gerações: a primeira abrange quinolonas não fluoradas, a segunda é composta por quinolonas mono-fluoradas e a terceira é formada por quinolonas di e tri-fluoradas. A CIP é considerada uma quinolona de segunda geração (BILIBIO, 2014).

Em humanos, a CIP é eficaz no tratamento de infecções pulmonares, urinárias e digestivas, onde a mesma atua inibindo a síntese da DNA-girase bacteriana. Em práticas veterinárias é comumente empregada no tratamento de mastite, uma inflamação nas glândulas mamárias (ANACLETO *et al.*, 2018; PULGARÍN *et al.*, 2012). Segundo a ANVISA o limite máximo residual (LMR) de CIP em amostras de leite é 0,1 mg L<sup>-1</sup> (BRASIL, 2018).

A determinação de CIP em produtos farmacêuticos e no leite tem sido descrita na literatura por diferentes métodos analíticos, incluindo principalmente a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) (CINQUINA *et al.*, 2003; IDOWU; PEGGINS, 2004; SCHERER *et al.*, 2014) e a eletroforese capilar (MICHALSKA *et al.*, 2004; MORENO-GONZÁLEZ *et al.*, 2017). Estas técnicas analíticas permitem o desenvolvimento de métodos sensíveis, robustos e

seletivos, todavia, as mesmas necessitam de laboriosos tratamentos de amostras (o que afeta diretamente a frequência analítica), apresentam custos elevados de equipamentos e/ou manutenção e elevada geração de resíduos (mais pronunciado nos métodos cromatográficos).

Diante disto, visto que a CIP apresenta grupo eletroativo em sua estrutura, metodologias utilizando técnicas eletroanalíticas começaram a ser desenvolvidas com o propósito de se estabelecer métodos alternativos com baixo custo instrumental, boa frequência analítica, simplicidade, sensibilidade e portabilidade (ALVES *et al.*, 2021; FOTOUHI; ALAHYARI, 2010; GARBELLINI *et al.*, 2015; HU *et al.*, 2018; STEFANO *et al.*, 2016; YUAN *et al.*, 2018).

Alves e colaboradores avaliaram o comportamento eletroquímico da CIP utilizando um eletrodo de grafite de lapiseira (PGE, do inglês *Pencil Graphite Electrode*). Sob esta plataforma eletroquímica foi observado a oxidação irreversível da CIP em +1,03 V com processo de transporte de massa caracterizado por difusão. Um método por SWV com boa faixa linear (12 – 55  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e detectabilidade (5,6  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) foi desenvolvido para a determinação de CIP em formulações farmacêuticas, onde as amostras necessitaram apenas de dissolução e sucessivas diluições em eletrólito suporte. Níveis de recuperações próximos a 102 % e teores do princípio ativo concordantes com os valores determinados por análises cromatográficas, demonstraram a confiabilidade dos resultados (ALVES *et al.*, 2021).

Stefano e colaboradores destacaram a potencialidade do uso do eletrodo de carbono impresso (SPCE, do inglês *Screen-Printed Carbon Electrode*) modificado com nanotubos de carbono, associado à análise por injeção em batelada (BIA, do inglês *Batch Injection Analysis*) e em fluxo (FIA, do inglês *Flow Injection Analysis*) com detecção amperométrica (sob potencial de +1,0 V) para o controle de qualidade de CIP em formulações farmacêuticas. Ambos sistemas de análise apresentaram adequada precisão com desvio padrão relativo (RSD) inferior a 5%, boa detectabilidade ( $\text{LD} < 0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e elevada frequência analítica (130 análises por hora). A exatidão do método foi atestada pelos níveis de recuperações (97 – 102 %) e concordância com os valores encontrados por eletroforese capilar (STEFANO *et al.*, 2016).

Com respeito à aplicação em amostras de leite, Yuan e colaboradores modificaram a superfície do GCE com um nanocompósito contendo nanopartículas de ouro (AuNPs), nitreto de carbono e grafeno para o monitoramento de resíduos de CIP. Um método por SWV com faixa linear de 0,6 a 120  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e LD de 0,42  $\mu\text{mol L}^{-1}$  foi desenvolvido. A

amostra de leite necessitou de uma etapa de preparo, onde ácido tricloroacético foi adicionado para precipitação das proteínas, seguida pela centrifugação, extração com acetato de etila e filtração. Diferentes concentrações de CIP (1, 5 e 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) foram utilizadas para a fortificação da amostra de leite. Percentuais de recuperação variando de 93,6 a 101,2 % ressaltaram a exatidão das medidas eletroquímicas (YUAN *et al.*, 2018).

Hu e colaboradores avaliaram o desempenho eletroquímico de um SPCE modificado com nanocompósito de nanotubos de carbono, nanopartículas de  $\text{V}_2\text{O}_5$ , quitosana e uma fita simples de DNA para a detecção seletiva de CIP em leite por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS, do inglês *Electrochemical Impedance Spectroscopy*). Sob parâmetros experimentais otimizados, foi obtida uma faixa linear de 0,5 a 8,0  $\text{ng mL}^{-1}$  e LD de 0,5  $\text{ng mL}^{-1}$ . O tratamento das amostras de leite foi realizado de forma semelhante ao estabelecido por Yuan *et al.* As amostras de leite foram fortificadas com diferentes concentrações de CIP e resultados de recuperações aceitáveis (94,5 – 97,8 %) foram obtidos. Um inconveniente deste método, foi a necessidade de um elevado tempo para a incubação da CIP sobre o sensor (aproximadamente 3 hrs), o que pode inviabilizar a aplicação em análises de rotina (HU *et al.*, 2018).

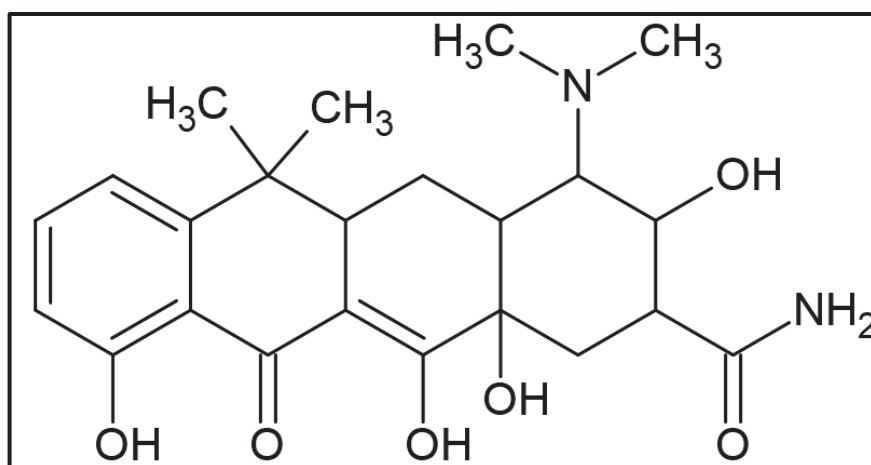
Além do emprego de material biológico como o DNA, eletrodos modificados com polímeros molecularmente impressos (MIP, do inglês *Molecularly Imprinted Polymer*) proporcionam adequada seletividade as medidas eletroquímicas, de forma que simples diluições das amostras de leite sejam suficientes para a detecção de CIP com confiabilidade (KUMAR *et al.*, 2020; SURYA *et al.*, 2020). Demais sensores e métodos eletroquímicos para quantificação de CIP são descritos em uma revisão recentemente publicada na literatura científica (RUDNICKI *et al.*, 2020).

#### 1.4.2 Tetraciclina

O primeiro membro da classe das tetraciclinas foi descoberto no ano de 1945 por Benjamin Duggar, a clortetraciclina, que é um produto da fermentação natural de uma bactéria do solo (*Streptomyces aureofaciens*). Esta descoberta provocou uma corrida na pesquisa e obtenção de novas tetraciclinas com grande sucesso (SHLAES, 2006). Assim, de 1950 a 1970, vários membros da classe das tetraciclinas começaram a ser desenvolvidos de forma natural e sintética possibilitando às tetraciclinas figurarem entre os antibióticos mais usados nos Estados Unidos (PEREIRA-MAIA *et al.*, 2010; SPEER *et al.*, 1992; ZHANEL *et al.*, 2004)

A tetraciclina (TET), nome usual do 2-(amino-hidróxi-metilideno)-4-demitilamino-6,10,11,12a-tetrahidróxi-6-metil-4,4a,5,5a-tetrahidrotetraceno-1,3,12-triona, cuja estrutura química está apresentada na Figura 5, é um antibiótico semi-sintético produzido a partir da clortetraciclina. Possui atividade frente a microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, e atua inibindo a biossíntese das proteínas através da ligação na subunidade 30S do ribossoma bacteriano (PEREIRA-MAIA *et al.*, 2010).

Figura 5 – Estrutura química da tetraciclina.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor (2021).

Pela medicina humana a TET é utilizada para tratar infecções do trato respiratório e acnes em estágio avançado, enquanto que em práticas veterinárias é empregada no tratamento de infecções como a mastite e também, em níveis sub-terapêuticos, na ração animal para fins profiláticos (prevenir o aparecimento de infecções) (TREETEPVIJIT *et al.*, 2006). Segundo a ANVISA o LMR de TET em amostras de leite é 0,1 mg L<sup>-1</sup> (BRASIL, 2018). Já o Ministério da Agricultura, pela portaria 193, de 12 de maio de 1998, proíbe o uso de TET como aditivo na alimentação do gado leiteiro.

Desta forma, diversos métodos analíticos para a avaliação de TET em amostras de fármacos e leite foram desenvolvidos. Grande partes destes envolvem o HPLC (AL-AFY *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2013), eletroforese capilar (MAMANI *et al.*, 2006), espectrofotometria (NI *et al.*, 2010; RODRÍGUEZ *et al.*, 2016), fluorescência (TAN; CHEN, 2012) e quimioluminescência (HAN *et al.*, 1999). Todavia, devido à eletroatividade da TET, métodos eletroanalíticos vem se mostrando como uma importante ferramenta analítica para o monitoramento da mesma (BESHARATI *et al.*, 2019; CALIXTO; CAVALHEIRO, 2017;

DELGADO *et al.*, 2018; MASAWAT; SLATER, 2007; SHI, 2017; WANGFUENGGANAGUL *et al.*, 2004).

Masawat e Salter estabeleceram um método portátil usando eletrodo impresso de ouro associado ao sistema FIA com detecção amperométrica (potencial de +1,2 V) visando o controle de qualidade de formulações farmacêuticas e avaliação de resíduos de TET em amostras de alimentos. Uma ampla faixa linear ( $1 - 500 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) com LD de  $0,96 \mu\text{mol L}^{-1}$  foi obtido. Os teores de TET determinados nos fármacos foram concordantes com os valores pré-estabelecidos pelos rótulos dos medicamentos. As amostras de alimentos avaliadas (frango e camarão) foram fortificadas com diferentes concentrações de TET (0,5; 1,0 e 5,0 mg Kg<sup>-1</sup>), sendo obtidos percentuais de recuperações satisfatórios (83,4 a 99,3 %) (MASAWAT; SLATER, 2007).

Calixto e Cavalheiro desenvolveram um CPE com compósito de grafite-poliuretano (grafite 60 % m/m) para determinar TET em amostras de leite bovino e materno por DPV. O comportamento eletroquímico da TET foi investigado por voltametria cíclica, onde dois sinais de oxidação irreversíveis foram observados em 0,90 e 1,10 V, respectivamente. As amostras de leite foram fortificadas em dois níveis de concentração ( $0,22$  e  $3,40 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e um processo de extração em fase sólida aliado a uma etapa de pré-concentração foram necessários para o preparo das amostras. Um LD de  $2,46 \mu\text{mol L}^{-1}$  com percentuais de recuperação variando de 83 a 99 % foram obtidos (CALIXTO; CAVALHEIRO, 2017).

Diferentemente de Calixto e Cavalheiro, alguns trabalhos empregam apenas etapas de diluição para o preparo de amostras de leite, com a finalidade de diminuir o custo e o tempo das análises (BESHARATI *et al.*, 2019; DELGADO *et al.*, 2018; SHI, 2017).

Delgado e colaboradores propuseram o desenvolvimento de um sensor de baixo custo (US \$ 0,005 por camada de modificação) a partir da modificação da superfície do GCE via adsorção, usando uma dispersão contendo *carbon black* e amido de batata. Utilizando este sensor associado à DPV, as amostras de leite foram simplesmente diluídas (2 vezes) em eletrólito suporte e níveis de recuperação na faixa de 89 a 93 % foram obtidos, demonstrando adequada exatidão dos resultados. De forma semelhante, porém incorporando materiais biológicos a superfície eletródica para melhora de seletividade, Besharati e Shi monitoraram satisfatoriamente resíduos de TET em amostras de leite (BESHARATI *et al.*, 2019; SHI, 2017).

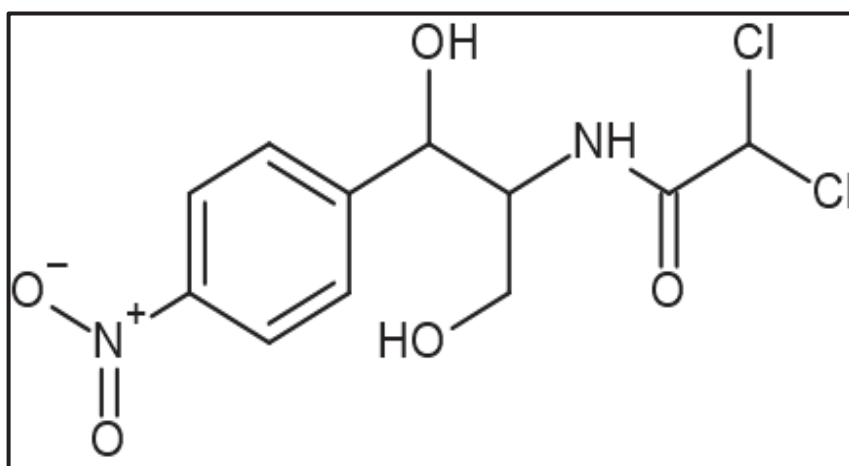
Uma revisão focado em (bio)plataformas eletrocatalíticas para o monitoramento de TET foi recentemente publicada, demonstrando a relevância dos estudos eletroquímicos acerca deste antibiótico (YÁÑEZ-SEDEÑO *et al.*, 2021).



### 1.4.3 Cloranfenicol

O cloranfenicol (CLO), nome usual do D-(-)-treo-2,2,-dicloro-N-(β-hidroxi-a-((hidroximetil)-p-nitrofenil)), é um antibiótico de amplo espectro pertencente à classe dos anfenicóis, que apresenta excelentes propriedades antibacteriana e farmacocinética (MARTINS JÚNIOR *et al.*, 2006; RENATA CABRERA DE *et al.*, 2007). Foi descoberto em 1947 após ser isolado do *Streptomyces Venezuelae*, e sua estrutura química, conforme mostrada na Figura 6, foi identificada e produzida artificialmente em 1949, tornando-o primeiro antibiótico a ser produzido ao invés de ser extraído de um microrganismo (SMADEL, 1950).

Figura 6 – Estrutura química do cloranfenicol



Fonte: Elaborada pelo próprio autor (2021).

O CLO é um composto lipossolúvel que permeia a membrana celular e se liga a subunidade protéica 50S dos ribossomos das células de procariontes, evitando a transferência de aminoácidos das cadeias peptídicas em formação, inibindo a síntese proteica (MARTINS JÚNIOR *et al.*, 2006). É efetivo contra cocos e bacilos (incluindo anaeróbios) gram-positivos e gram-negativos, *Rickettsia*, *Mycoplasma*, e *Chlamydia* (GIKAS *et al.*, 2004). Este amplo espectro de atividade bacteriana, aliado ao baixo custo e alta disponibilidade fez do CLO um antibiótico bastante utilizado no tratamento de infecções de animais produtores de alimentos.

Atualmente, seu uso clínico em humanos é limitado ao tratamento de conjuntivite aguda, meningite bacteriana e febre tifoide, em caso de outros antibióticos serem mais tóxicos e/ou menos eficazes. Contudo, a administração independente da dose pode desencadear efeitos colaterais perigosos, como anemia aplástica (diminuição dos glóbulos vermelhos por

toxicidade aguda da medula óssea) e a síndrome do bebê cinza, uma situação patológica que pode ser fatal em 40 % dos casos se não tratada de forma apropriada (MARTINS JÚNIOR *et al.*, 2006; MCINTYRE; CHOONARA, 2004).

Diante destes graves efeitos colaterais, a utilização do CLO tem sido reavaliada em todo o mundo. No Brasil, Estados Unidos, União Europeia e outros países, o uso de CLO em preparações farmacêuticas de uso veterinário, rações e aditivos de rações para animais cujos produtos sejam destinados à alimentação humana está proibido (BRASIL, 2018; EC, 2010; FAO, 2018). Neste sentido, é de fundamental importância o desenvolvimento de métodos analíticos sensíveis para a determinação deste contaminante em amostras de alimentos de origem animal.

Os métodos mais comumente empregados para este propósito são o HPLC (MOHEBI *et al.*, 2020; NIANG *et al.*, 2017; VARGAS MAMANI *et al.*, 2009), cromatografia gasosa (SHEN *et al.*, 2009) e eletroforese capilar (MAMANI *et al.*, 2008; VERA-CANDIOTI *et al.*, 2010). Como discutido anteriormente, apesar destes métodos possibilitarem uma determinação sensível e seletiva, demandam de alto investimento financeiro para aquisição e/ou manutenção de equipamentos e consumíveis, são demorados e necessitam de tratamentos de amostras dispendiosos.

Por outro lado, métodos eletroanalíticos são simples, envolvem análises rápidas em equipamentos de baixo custo e portáteis com sensibilidades comparáveis as metodologias cromatográficas. Visto que o CLO (semelhantemente aos outros antibióticos) apresenta grupo funcional eletroativo em sua estrutura, estudos utilizando diferentes sensores e técnicas eletroanalíticas foram introduzidos para aplicações em formulações farmacêuticas (CODOGNOTO *et al.*, 2010; TALEBIZADEHSARDARI *et al.*, 2020; ZHUANG *et al.*, 2014) e no leite (GOVINDASAMY *et al.*, 2017; KARTHIK *et al.*, 2016; RAJAJI *et al.*, 2019; YUAN *et al.*, 2018).

Codognoto e colaboradores utilizaram um eletrodo de ouro modificado com 2-Mercapto-5-metilbenzimidazol para verificar o comportamento eletroquímico do CLO. Medidas por voltametria cíclica identificaram um processo de eletrólise próximo a -0,62 V, que foi associado a redução do grupo nitro a hidroxilamina. Entretanto, a partir de estudos hidrodinâmicos observou-se um sinal analítico com maior intensidade no potencial de -0,75 V, que foi selecionado para as análises. Um método com detecção amperométrica associado ao sistema FIA foi proposto para a determinação rápida de CLO em soluções oftalmológicas. Ampla faixa linear (50 – 1000  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e LD de 44  $\mu\text{mol L}^{-1}$  foram obtidos. As amostras

foram simplesmente diluídas em eletrólito suporte e os resultados foram concordantes com as análises por HPLC (CODOGNOTO *et al.*, 2010).

Em um estudo mais recente, Talebizadehsardari e colaboradores modificaram a superfície do GCE com espécies de  $\text{Ho}^{3+}/\text{Co}_3\text{O}_4$  e observaram que a partir de um transporte de massa controlado por difusão, o CLO sofreu um processo de redução em -0,50 V. Dois métodos eletroanalíticos foram desenvolvidos utilizando a cronoamperometria e a DPV. Melhores condições foram estabelecidas usando a DPV, onde uma faixa linear de 0,01 a 800  $\mu\text{mol L}^{-1}$  com LD de 7,1  $\text{nmol L}^{-1}$  foram alcançados. Este método foi aplicado em soluções oftalmológicas, soro sanguíneo humano e urina com excelentes níveis de recuperações (99 a 103 %) (TALEBIZADEHSARDARI *et al.*, 2020).

Com respeito a detecção em amostras de leite, Rajaji e colaboradores utilizando um SPCE modificado com nanoestruturas de  $\text{Mn}_2\text{O}_3$ , avaliaram a presença de resíduos de CLO. Antes de todas medidas eletroquímicas foi necessário purgar  $\text{N}_2$  nas soluções de análise para remoção do oxigênio dissolvido, pois este estava afetando a redução do CLO. Sob condições otimizadas por DPV, foi observado um sinal de redução em aproximadamente -0,65 V com duas faixas lineares (0,015 – 1,28 e 1,35 – 566  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e LD de 4,3  $\text{nmol L}^{-1}$ . As amostras de leite foram simplesmente diluídas em eletrólito suporte e fortificadas com diferentes concentrações de CLO (10, 20 e 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), sendo obtidos percentuais de recuperação satisfatórios (95 – 97 %) (RAJAJI *et al.*, 2019).

Govindasamy e colaboradores investigaram uma dispersão contendo nanotubos de carbono funcionalizados e nanoesferas de sulfeto de molibdênio ( $\text{MoS}_2$ ) para a modificação do GCE visando à detecção ultra sensível de CLO em resíduos de leite. Estudos por voltametria cíclica na presença de CLO evidenciaram um possível efeito eletrocatalítico proporcionado pelo modificador, onde ganho de sinal (6 vezes) e antecipação de potencial (em 157 mV) foram observados em relação ao eletrodo limpo. Um método utilizando a amperometria (potencial fixado em -0,52 V) com faixa linear variando de 0,08 a 1392  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e LD de 0,015  $\mu\text{mol L}^{-1}$  foi desenvolvido. O preparo das amostras de leite envolveu a adição de ácido perclórico, centrifugação e filtração. Percentuais de recuperação na faixa de 95,9 a 97,6 % atestaram à confiabilidade dos resultados (GOVINDASAMY *et al.*, 2017). Demais sensores e métodos eletroanalíticos são descritas em um revisão recentemente publicada pelo nosso grupo de pesquisa na *Analytica Chimica Acta* (DE FARIA *et al.*, 2021).

## 1.5 TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS

Como demonstrado em grande parte das aplicações apresentadas, as técnicas eletroanalíticas, mais especificamente as voltamétricas, vêm ganhando prestígio na comunidade científica por apresentarem inúmeras vantagens. Diante disto, um entendimento das técnicas mencionadas e como os fenômenos eletroquímicos ocorrem é relevante.

As técnicas voltamétricas envolvem a aplicação de potenciais controlados ao longo do tempo em uma célula eletroquímica, com o intuito de promover uma reação na interface do eletrodo/solução. A forma com que os potenciais são aplicados e as correntes geradas são amostradas é o que diferencia cada uma das técnicas voltamétricas. Para realizar as medidas eletroquímicas é necessário um arranjo experimental contendo três eletrodos, os quais são denominados eletrodo de trabalho, referência e auxiliar. As reações redox se processam a partir da polarização do eletrodo de trabalho, onde ocorre uma transferência de carga entre o eletrodo e a solução gerando uma corrente elétrica, que é registrada em função do tempo ou potencial aplicado (BARD, 1980).

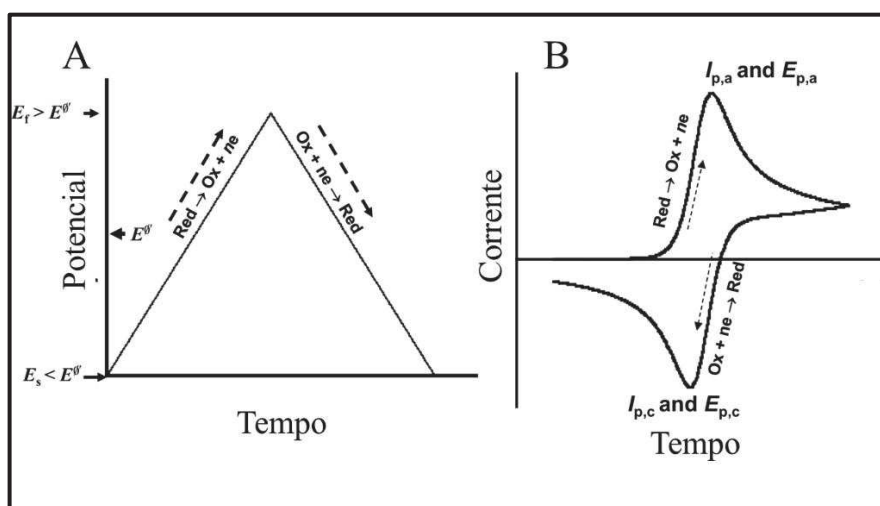
Dois tipos de corrente surgem ao polarizar o eletrodo de trabalho (corrente faradaica e corrente capacitiva). A corrente faradaica está relacionada à transferência de elétrons entre o eletrodo e as espécies eletroativas da solução. Esta obedece a Lei de Faraday, que determina que a corrente é proporcional à quantidade de espécie consumida e/ou formada na superfície do eletrodo. A corrente capacitiva está associada com a formação de uma dupla camada elétrica na interface eletrodo/solução, em razão da aplicação e/ou variação do potencial. Diferentemente da faradaica, esta corrente não está relacionada com nenhuma reação redox (GROSSER, 1993).

Com respeito ao transporte de massa das espécies eletroativas, existem três formas possíveis: migração, convecção e difusão. A migração está associada ao movimento de espécies carregadas por atração eletrostática devido à ação de um campo elétrico; a convecção consiste no movimento das espécies a partir de uma ação mecânica (agitação do sistema); e a difusão é referente à formação de um gradiente de concentração entre superfície do eletrodo e o seio da solução (TICIANELLI; GONZALEZ, 2005). Uma vez que apenas o processo difusional mantém uma relação proporcional com a concentração da espécie investigada, os demais transportes de massa devem ser minimizados na etapa de medida. O transporte convectivo pode ser facilmente minimizado mantendo a solução em repouso, enquanto que a adição de um eletrólito não reativo nas condições do experimento (eletrólito suporte), em

concentração bem superior à espécie analisada (geralmente 50 a 100 vezes) é suficiente para minimizar o efeito de migração (BARD, 1980).

Para estudos exploratórios, onde se desconhece o comportamento eletroquímico da espécie a ser investigada, a voltametria cíclica (CV, do inglês *Cyclic Voltammetry*) é a técnica voltamétrica mais adequada. Nesta técnica, uma varredura de potencial em forma linear, segundo uma onda triangular, conforme mostrado na Figura 7, é aplicado ao eletrodo de trabalho. Geralmente inicia-se a aplicação do potencial em uma região livre de reações redox, e em seguida este potencial é varrido até um valor extremo (que seja suficiente para as reações redox ocorrerem) e retorna ao valor inicial, finalizando um ciclo (ELGRISHI *et al.*, 2018).

Figura 7 – (A) Representação esquemática da forma de aplicação de potencial utilizado na voltametria cíclica; (B) voltamograma cíclico característico de uma espécie reversível



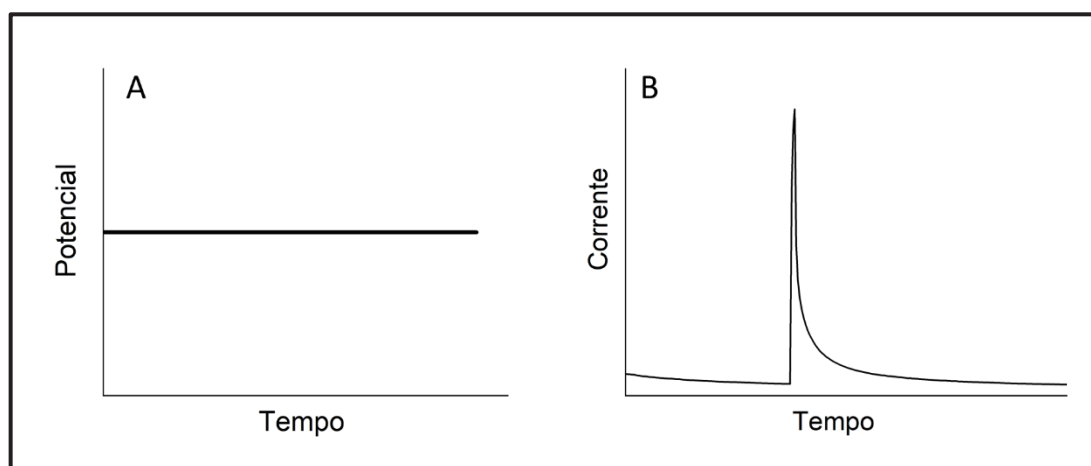
Fonte: Adaptado de (MIRCESKI *et al.*, 2018).

Esta técnica é bastante empregada para investigação de mecanismos de oxidação/redução, estudo de eletrólito suporte/pH, reversibilidade de processos eletroquímicos, cinética de transporte de massa, entre outros (ABDEL-HAMID *et al.*, 2016; FLEXER *et al.*, 2008; NICHOLSON; SHAIN, 1964). Para fins quantitativos, a amperometria (AMP) e as técnicas de pulso DPV e SWV são mais adequadas, em razão do menor efeito capacitivo frente ao processo faradaico (MEKASSA *et al.*, 2017).

A AMP é uma técnica eletroanalítica, em que um potencial constante e controlado é aplicado sobre o eletrodo de trabalho para promover a oxidação ou redução de compostos eletroativos, e a corrente gerada é monitorada ao longo do tempo, conforme representado na Figura 8 (ADELOJU, 2005). Como o potencial permanece fixo durante a análise, a

contribuição capacitiva é minimizada, tendo em vista que a mesma decai abruptamente com o tempo. Além disso, diferentemente das técnicas voltamétricas, o sistema é mantido sob agitação durante as medidas, o que possibilita um transporte de massa mais eficiente e um menor efeito de contaminação da superfície do eletrodo (GONZÁLEZ-LÓPEZ; FERNÁNDEZ ABEDUL, 2020). A mesma é bastante associada aos sistemas BIA e FIA para obtenção de métodos eletroanalíticos extremamente rápidos e sensíveis (STEFANO *et al.*, 2016).

Figura 8 – (A) Representação esquemática da forma de aplicação do potencial na amperometria; (B) amperograma obtido para um experimento associado ao FIA



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2020).

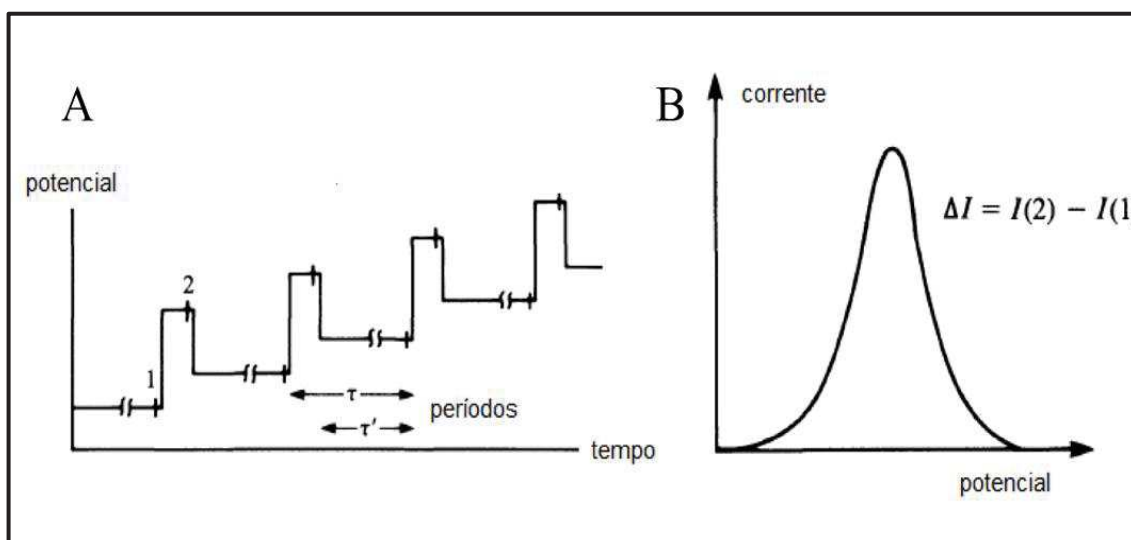
Um inconveniente da AMP é a sua baixa seletividade, visto que se potenciais elevados (positivos ou negativos) forem aplicados, pode ocorrer oxidação e/ou redução de outras espécies eletroativas, além da de interesse. Neste sentido, é aconselhável utilizar valores mínimos de potencial.

Determinações simultâneas são possíveis de serem realizadas a partir do uso da amperometria de múltiplos pulsos (MPA, do inglês *Multiple Pulse Amperometry*), no entanto, é necessário que haja uma diferença de pelo menos 0,1 V entre os potenciais das espécies investigadas para que fatores de correções confiáveis sejam obtidos (SANTOS *et al.*, 2009). Todavia, determinações simultâneas são mais investigadas utilizando a DPV e SWV (MEKASSA *et al.*, 2017; YUE *et al.*, 2020).

Na DPV uma série de pulsos com amplitude constante são sobrepostos a uma rampa de potencial com incrementos e tempo de modulação de pulso bem definidos. O processo de amostragem de corrente é realizado antes da aplicação do pulso e ao final do pulso, de forma

que a primeira é instrumentalmente subtraída da segunda, e o resultado é plotado versus o potencial aplicado (Figura 9). O objetivo de se trabalhar com duas amostragens de corrente e a diferença destas é minimizar a contribuição capacitiva para que concentrações baixas possam ser detectadas (SIMÕES; XAVIER, 2017). Diversos métodos eletroanalíticos utilizando esta técnica para avaliação de antibióticos foram descritos anteriormente.

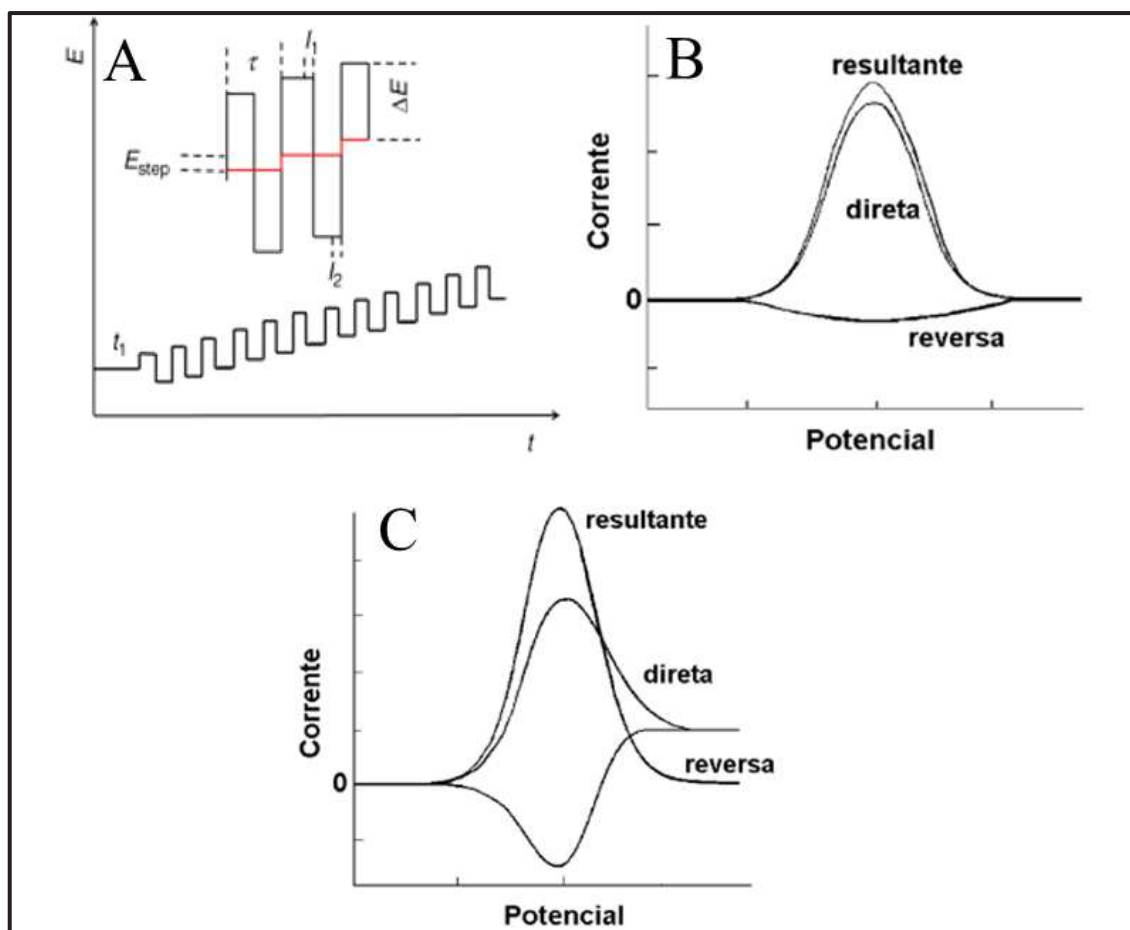
Figura 9 – (A) Representação esquemática da forma de aplicação do potencial e amostragem da corrente na DPV; (B) voltamograma resultante



Fonte: Adaptado de (PACHECO *et al.*, 2013).

Finalmente, a SWV consiste na aplicação de uma onda simétrica com amplitude constante sobreposta a uma rampa com incrementos de potencial e frequência bem definidos. De forma a minimizar o efeito capacitivo as correntes são amostras ao final dos pulsos diretos e reversos, e a diferença destas (a qual é proporcional a concentração do analito), é gravada versus o potencial aplicado (Figura 10). Diante disto, para espécies com comportamento reversível uma melhor sensibilidade e detectabilidade é verificada frente a DPV. Além disso, a SWV permite trabalhar com velocidades de varredura extremamente altas ( $1 \text{ V s}^{-1}$ ), o que também contribui para o ganho de sensibilidade e/ou detectabilidade, devido à menor quantidade de espécie eletroativa consumida durante a varredura (MIRCESKI *et al.*, 2018; SIMÕES; XAVIER, 2017).

Figura 10 – (A) Representação esquemática da forma de aplicação do potencial e amostragem da corrente na SWV; (B) voltamograma resultante de um processo irreversível e (C) voltamograma resultante de um processo reversível



Fonte: Adaptado de (SOUZA *et al.*, 2003).

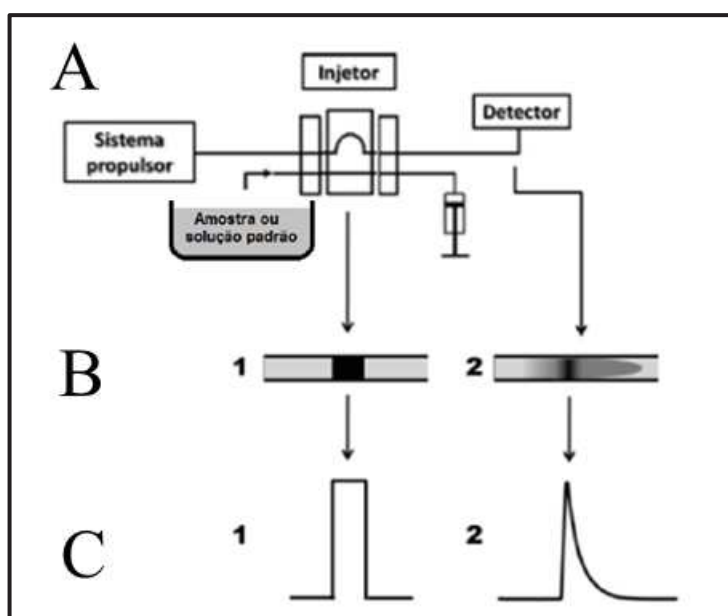
## 1.6 ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO

O sistema FIA tem sido bastante explorado para análise de vários compostos, tendo em vista que proporciona inúmeras vantagens às metodologias analíticas, tais como: uso de instrumentação versátil, baixo custo dos componentes do sistema, elevada frequência analítica, baixo volume de amostra, mínimo risco de intoxicação do analista (em consequência da menor exposição aos reagentes e amostras em comparação aos procedimentos manuais), além da possibilidade de automação (CERDÀ *et al.*, 2014). Pode ser associado à detecção por espectrofotometria (HUANG *et al.*, 2021), espectrometria de massas (LA NASA *et al.*, 2020), espectrometria de absorção atômica (ZARE-DORABEI *et al.*, 2018), eletroquímica (SANTOS *et al.*, 2020), entre outros, para análises de rotina.



Foi desenvolvido em 1975 por Ruzicka e colaboradores com a ideia de obter um sistema para realizar análise de maneira contínua, de forma que medidas fossem efetuadas rapidamente com mínimo tratamento das amostras (RŮŽIČKA; HANSEN, 1975; RŮŽIČKA *et al.*, 1977). Na Figura 11, é apresentado um arranjo típico de um sistema FIA.

Figura 11 – (A) Representação esquemática dos componentes de um sistema FIA em linha única; (B) gradiente de concentração da amostra em momentos distintos no fluxo transportador e (C) respectivos sinais analíticos



Fonte: Adaptado de (STEFANO, 2016).

Conforme mostrado na Figura 11A, o líquido transportador é impulsionado por um sistema propulsor com o objetivo de conduzir a amostra (ou solução padrão), que é injetada no meio. Bombas peristálticas associadas a amortecedores de pulsos são as mais adequadas para este propósito, pois apresentam elevada versatilidade (controle de vazão em várias tubulações simultaneamente por sistemas computadorizados). Alças de amostragem com volumes bem definidos (geralmente entre 50 e 300  $\mu\text{L}$ ) são incorporadas aos injetores e preenchidas com o auxílio de uma seringa. Injetores manuais ou automáticos são responsáveis por inserir a amostra ou solução padrão no meio transportador (BERGAMIN F<sup>o</sup> *et al.*, 1978).

Logo após a injeção da amostra no fluxo transportador, o perfil de concentração é retangular (Figura 11B-1), entretanto conforme a mesma flui em direção ao sistema de

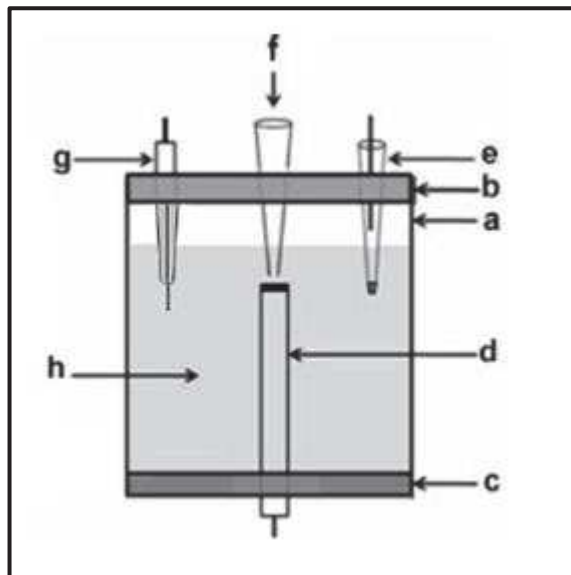
detecção ela se dispersa e forma um fluxo laminar (Figura 11B-2). O processo de dispersão ocorre devido à ação convectiva, isto é, o fluxo laminar faz com que o centro do fluido se movimente mais rápido do que a fração próxima as paredes dos tubos. Outro fator é a difusão, que também provoca alteração no perfil do fluxo devido ao gradiente de concentração (STEFANO, 2016).

O sistema de detecção é posicionado no término das tubulações dentro de uma célula, sendo responsável pela quantificação dos analitos conduzidos pela solução transportadora. Desde que a vazão, volume injetado e dimensões do sistema sejam mantidos constantes durante toda análise, resultados reprodutíveis e confiáveis são obtidos. Importantes aplicações com detectores eletroquímicos (principalmente os amperométricos) em amostras de fármacos e alimentos são descritas pela literatura científica (DE FARIA *et al.*, 2020; MEDEIROS *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2015).

### 1.7 ANÁLISE POR INJEÇÃO EM BATELADA

Em virtude da necessidade de sistemas que possibilitem realizar análises rápidas de um grande número amostras, bem como aplicações em campo, Wang e Taha desenvolveram no ano de 1991 o sistema BIA (WANG; TAHA, 1991). Este sistema envolve a adição de um pequeno volume de solução, com o auxílio de uma pipeta injetora, diretamente sobre a superfície do eletrodo de trabalho, que é posicionado em uma configuração *wall-jet*, imerso em um grande volume de eletrólito suporte, conforme representado na Figura 12. Apesar de apresentar algumas semelhanças com o sistema FIA (elevada frequência analítica, boa sensibilidade e reprodutibilidade), o BIA dispensa o uso de bombas ou válvulas e tubulações, sendo mais facilmente adaptável em análises *in loco*.

Figura 12 – Representação esquemática de um sistema BIA com detecção eletroquímica, (a) corpo da célula, (b) tampa superior, (c) tampa inferior, (d) eletrodo de trabalho (configuração *wall-jet*), (e) eletrodo de referência, (f) ponteira da pipeta para injeção, (g) eletrodo auxiliar e (h) solução de eletrólito suporte



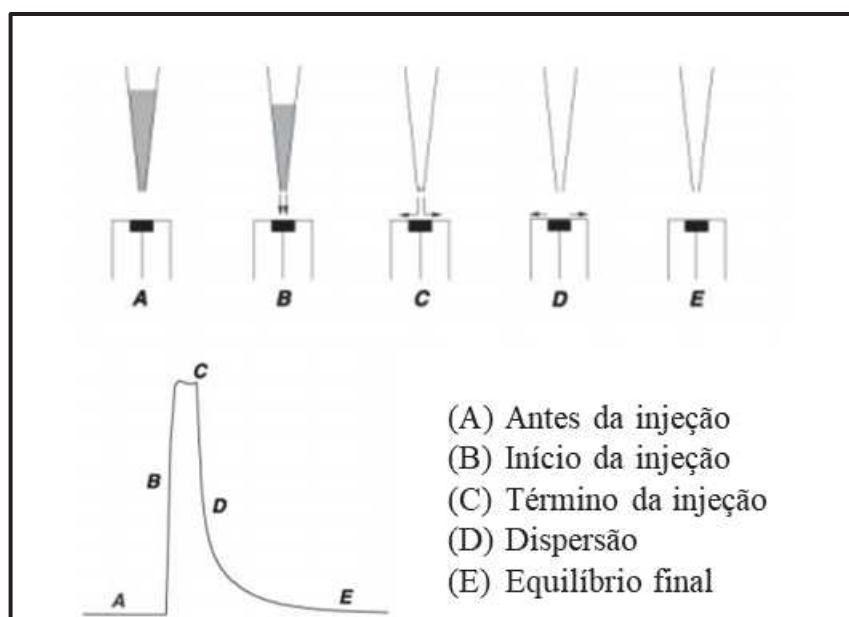
Fonte: Adaptado de (QUINTINO; ANGNES, 2004).

Com base na Figura 13 é possível explicar o princípio de uma medida eletroquímica (com detecção amperométrica) envolvendo o sistema BIA, onde pequenos volumes de solução (20 a 200  $\mu\text{L}$ ) contendo a espécie de interesse são injetados com uma micropipeta eletrônica (volume e velocidade de injeção bem controlados), formando uma região que sofre dispersão homogênea em direção à superfície do eletrodo de trabalho (WANG *et al.*, 1992). Devido ao processo de oxidação/redução, sinais transientes bem definidos (proporcionais à concentração do analito) são obtidos, seguido de um decréscimo de intensidade até a linha base, ocasionado pela diluição do analito em um grande volume de eletrólito suporte (QUINTINO; ANGNES, 2004).

Características interessantes são estabelecidas em aplicações eletroanalíticas utilizando este sistema, tais como: facilidade de operação, baixo volume de amostra, alta frequência analítica e adequada sensibilidade e detectabilidade. Além disso, é verificado um menor efeito de contaminação do eletrodo de trabalho, devido ao menor tempo de contato das espécies com a superfície do eletrodo. Todavia, caso o analito apresente um elevado caráter adsorptivo, uma etapa de agitação pode ser empregada (ROCHA; CARDOSO; TORMIN; *et al.*, 2018). A distância entre a ponteira da micropipeta e o eletrodo de trabalho deve ser fixada criteriosamente (distância recomendada entre 2 a 3

mm), para evitar possíveis perturbações e/ou medidas irreprodutíveis (BRETT *et al.*, 1995; ROCHA; CARDOSO; MENDONÇA; *et al.*, 2018).

Figura 13 – Etapas na injeção de uma amostra sobre a superfície do eletrodo de trabalho pelo sistema BIA, (A) estado antes da injeção, (B) instante em que a solução começa a ser injetada na superfície do eletrodo, (C) último contato da solução injetada com o eletrodo, (D) processo de diluição/dispersão em meio de eletrólito suporte, (E) superfície do eletrodo retorna as condições de linha base.



Fonte: Adaptado de (QUINTINO; ANGNES, 2004).

Recentemente as células BIAs vêm sendo construídas via impressão 3D de forma a minimizar ainda mais o custo das análises (CARDOSO *et al.*, 2018), e associadas a detectores voltamétricos (técnicas de pulso) e amperométricos para estudos envolvendo triagem e/ou quantificação de compostos de interesse forense, farmacêutico e alimentício (DA COSTA OLIVEIRA *et al.*, 2019; FREITAS *et al.*, 2017; FREITAS *et al.*, 2021; STEFANO *et al.*, 2017).

Diante das informações prestadas, torna-se oportuno investigar o desempenho do GCE modificado com rGO em sistemas convencionais (estacionários) e/ou BIA e FIA associados as técnicas de pulso (SWV e DPV) e amperométrica, a fim de desenvolver métodos eletroanalíticos simples, rápidos, sensíveis e de baixo custo para a avaliação de CIP, TET e CLO em amostras de leite e formulações farmacêuticas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver métodos eletroanalíticos simples, sensíveis, rápidos e de baixo custo utilizando o GCE modificado com rGO para determinação de resíduos de antibióticos em amostras de leite e formulações farmacêuticas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Sintetizar o rGO via redução química do GO;
- b) Caracterizar o rGO por espectroscopia Raman, na região do infravermelho, microscopia eletrônica de varredura e difração de raios X;
- c) Modificar o eletrodo de GCE com rGO utilizando o método *drop casting*;
- d) Investigar a resposta eletroquímica dos antibióticos nos diferentes sensores;
- e) Estudar o transporte de massa, efeito do pH, potencial de oxidação, e mecanismo de oxidação/redução dos antibióticos;
- f) Desenvolver métodos analíticos utilizando técnicas voltamétricas (SWV e DPV) e/ou amperométricas associadas aos sistemas BIA e FIA para a quantificação de CIP, TET e CLO;
- g) Comparar os métodos desenvolvidos;
- h) Aplicar os métodos para determinação de CIP, TET e CLO em amostras de formulações farmacêuticas e leite;
- i) Comparar os resultados obtidos eletroquimicamente frente às análises cromatográficas.

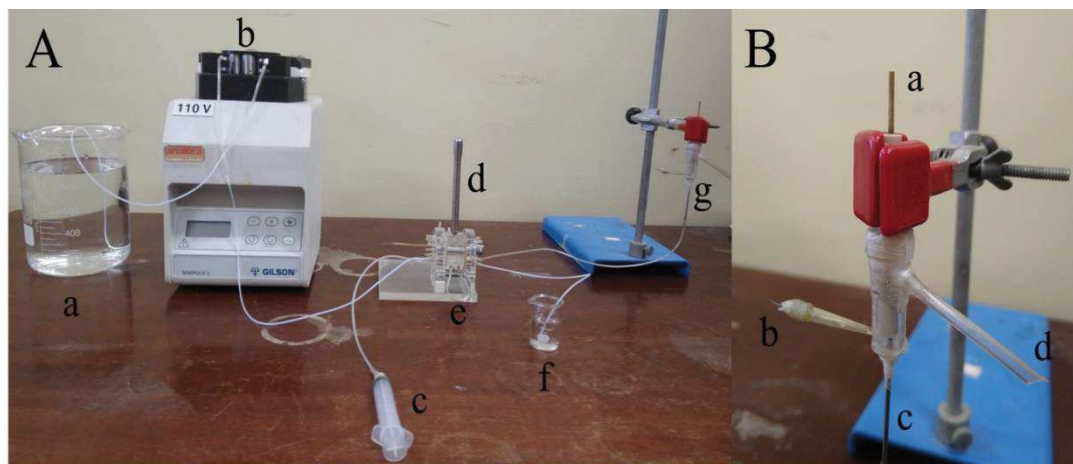
### 3 PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 Instrumentação, eletrodos e células eletroquímicas

As medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando um potenciostato PGSTAT128N (EcoChemie, Utrecht, Holanda) interfaceado a um microcomputador equipado com o software NOVA 2.1.4. Células eletroquímicas compostas por um GCE ( $\text{Ø} = 3,0 \text{ mm}$ ) modificado com rGO, um eletrodo de Ag/AgCl, KCl<sub>(sat)</sub> e um eletrodo de platina foram utilizadas para as análises. Como recipiente para as determinações envolvendo a CV, SWV e DPV, foi utilizado um béquer de 5 mL.

Para as análises com o sistema FIA foi utilizado uma bomba peristáltica, um injetor manual (Cena, USP), seringa, alças de amostragem (50 a 250  $\mu\text{L}$ ) e uma célula eletroquímica construída no laboratório de pesquisa Núcleo de Pesquisa em Instrumentação e Separações Analíticas (NUPIS) da Universidade Federal de Juiz de Fora. As soluções foram transportadas por tubos de polietileno de 1 mm de diâmetro interno e 25 cm de comprimento (percurso analítico). A célula eletroquímica foi construída utilizando um *eppendorf* de polipropileno (diâmetro interno de 0,9 cm, altura de 3,5 cm e volume interno de 2,0 mL). A mesma apresenta um orifício inferior, onde uma agulha de aço inox foi adaptada para entrada da solução (utilizada também como eletrodo auxiliar) e outros três para entrada do eletrodo de trabalho, referência e saída da solução. O eletrodo de trabalho foi posicionado a uma distância de aproximadamente 2 mm da linha final da tubulação (configuração *wall-jet*), evitando assim, causar dispersão do analito no fluxo ou difusão sem toda a amostra entrar em contato com a superfície do eletrodo. Para minimizar vazamentos durante as análises, em cada um dos encaixes dos eletrodos com a célula eletroquímica foi utilizado parafilm<sup>®</sup> (Bemis NA, Wisconsin, Estados Unidos). Na Figura 14 está representado o sistema FIA utilizado para as análises.

Figura 14 – (A) Representação dos componentes do sistema FIA utilizado nas análises eletroquímicas, (a) eletrólito suporte, (b) bomba peristáltica, (c) seringa para preenchimento da alça de amostragem, (d) injetor, (e) alça de amostragem, (f) amostra, (g) célula eletroquímica; (B) célula eletroquímica ampliada, (a) eletrodo de trabalho, (b) eletrodo de referência, (c) entrada do fluxo (tubo de aço inox) e (d) saída do fluxo.

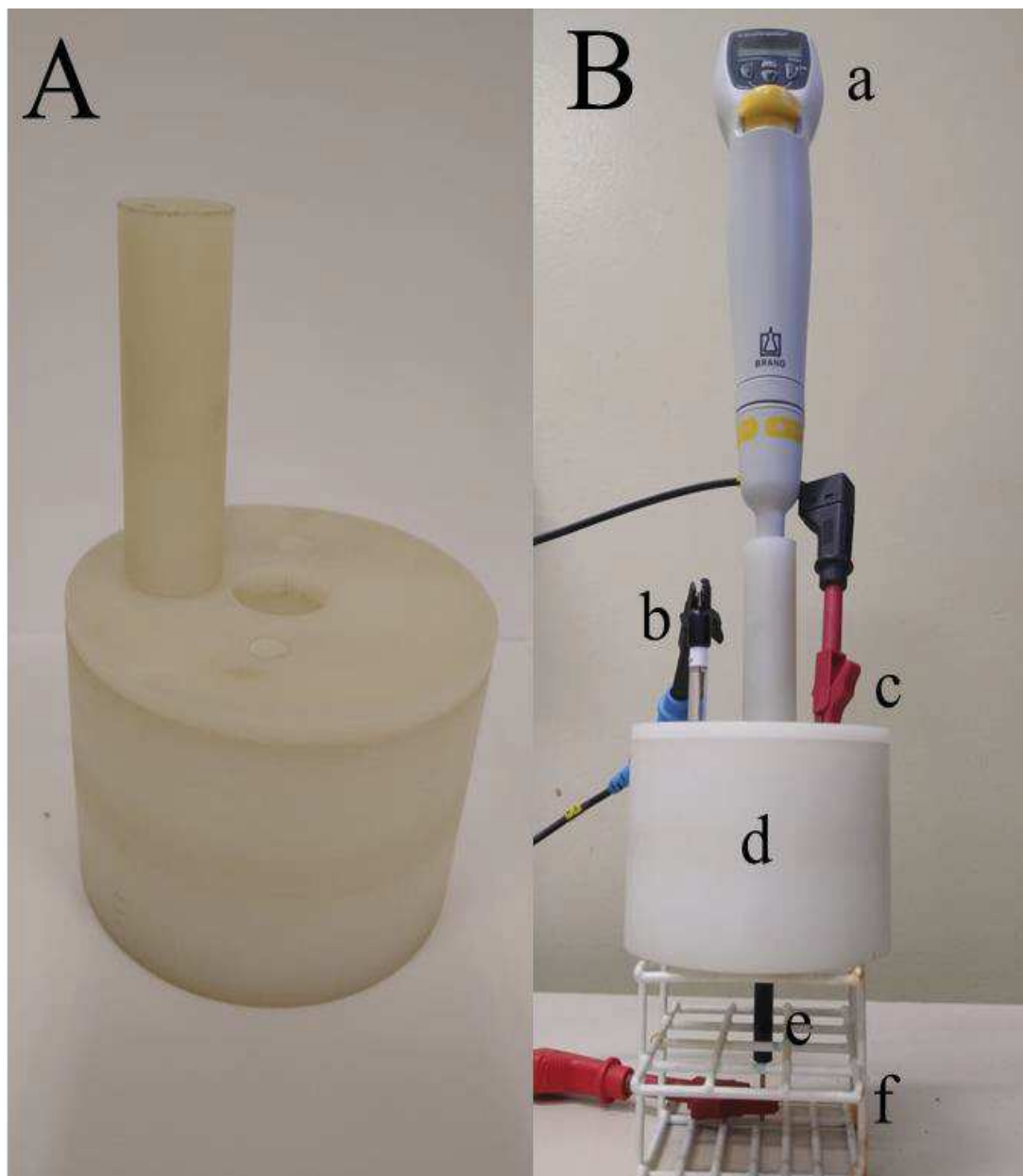


Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2021).

As análises pelo sistema BIA foram realizadas em uma célula de politetrafluoroetileno (PTFE) (diâmetro interno de 6,0 cm, altura de 3,0 cm e volume interno de aproximadamente 85 mL). Esta apresenta um orifício na extremidade inferior para posicionamento do eletrodo de trabalho na configuração “*wall-jet*”, e três aberturas na extremidade superior. 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, enquanto que as outras duas são destinadas ao posicionamento do eletrodo de referência e auxiliar. As injeções das amostras ou soluções padrões foram realizadas com uma micropipeta eletrônica (Eppendorf<sup>®</sup>, Multipette stream), que dispõe de volumes e velocidades de injeção nas faixas de 10 a 200  $\mu\text{L}$  e 16,5 e 370  $\mu\text{L s}^{-1}$ , respectivamente. Na Figura 15 está representado o sistema BIA utilizado nas análises.

Algumas estratégias foram usadas para aumentar a robustez deste sistema, como revestir a extremidade inferior da micropipeta eletrônica com teflon para fixá-la melhor no corpo da célula, impedindo que a ponteira da micropipeta se movimente durante as análises e a solução atinja locais diferentes da superfície do eletrodo de trabalho, gerando sinais irreprodutíveis. Além disso, a célula foi suportada sobre uma estante metálica para minimizar possíveis movimentos durante as medidas.

Figura 15 – (A) Representação da célula BIA e (B) componentes do sistema BIA utilizado nas análises eletroquímicas, (a) micropipeta eletrônica, (b) eletrodo de referência, (c) eletrodo auxiliar (d) corpo da célula, (e) eletrodo de trabalho, (f) estante metálica.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2021).

### 3.2 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada de alta pureza com resistividade maior ou igual a  $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ , obtida de um sistema de purificação de água



Milli Q (Millipore, Bedford, MA, USA). Todos os reagentes utilizados foram de pureza analítica.

Padrões analíticos de CIP, TET, CLO, bem como o GO e borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) foram adquiridos da Sigma Aldrich. Ácido fosfórico, acético e bórico (Vetec, Brasil) foram utilizados para a preparação do tampão Britton-Robinson (BR)  $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , o qual apresenta uma capacidade tamponante com valores de pH entre 2 e 12. Este foi selecionado como eletrólito suporte para todas medidas eletroquímicas. Como solvente para a dispersão do rGO foi utilizada a dimetilformamida (DMF) (Vetec, Brasil).

Soluções estoques de CIP, TET e CLO com concentrações na faixa de 2-10  $\text{mmol L}^{-1}$  foram preparadas diariamente em meio de ácido acético ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ), tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 10), e água/etanol (1:1), respectivamente.

### 3.3 SÍNTESE DO ÓXIDO DE GRAFENO REDUZIDO

O rGO foi obtido via redução química do GO com  $\text{NaBH}_4$ . Primeiramente foi preparada uma dispersão de óxido de grafeno em água ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) utilizando um banho ultrassônico (Unique, USC 2850, São Paulo, Brasil) com frequência de 25 KHz por 30 min. A redução procedeu-se na proporção de 1 mL de dispersão aquosa de GO ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) para 6 mg de  $\text{NaBH}_4$ , sob refluxo a  $125 \text{ }^\circ\text{C}$  por 180 min (GAO *et al.*, 2009). O sólido preto formado (rGO), foi filtrado em papel de filtro, lavado diversas vezes com água deionizada e seco a  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  em estufa por 24 horas.

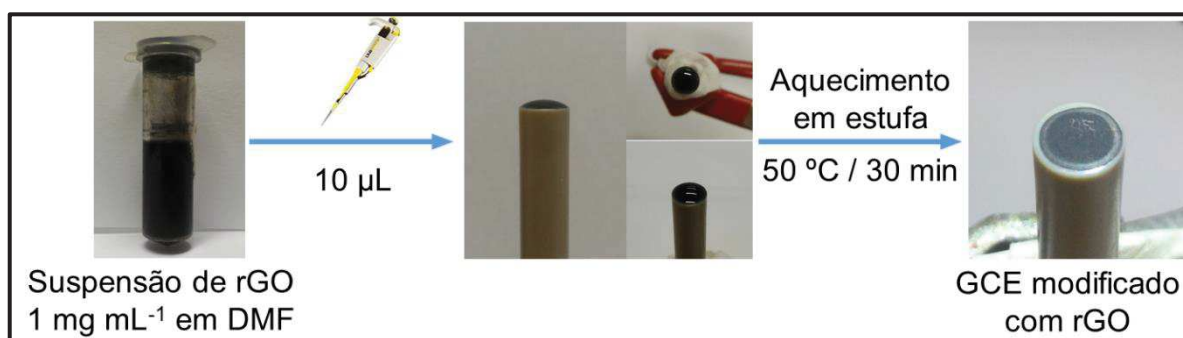
### 3.4 Modificação da superfície do GCE com rGO via *drop CASTING*

Neste trabalho todos os sensores foram preparados utilizando o GCE como substrato. Antes do processo de modificação, uma etapa de limpeza e condicionamento da superfície do GCE foi realizado. A limpeza consistiu no polimento da superfície do eletrodo em suspensão de alumina ( $0,3 \text{ } \mu\text{m}$ ), lavagem com água deionizada, sonicação em banho ultrassom por 5 min com etanol absoluto e com água deionizada, respectivamente, e posteriormente seco com pano liso.

Em seguida, 2 mL de DMF foram adicionados a 2 mg de rGO em um *ependorf* e sonicados em banho ultrassom por aproximadamente 30 min para promover a dispersão do material. Imediatamente após o tempo decorrido,  $10 \text{ } \mu\text{L}$  da dispersão de rGO foi

adicionada com o auxílio de uma micropipeta sobre a superfície do GCE, e posteriormente o eletrodo foi aquecido em estufa por 30 min a 50 °C para evaporação do solvente (ROCHA; DORNELLAS; *et al.*, 2018). Após a evaporação do solvente foi possível observar a superfície do GCE modificada com rGO (GCE/rGO), uma vez que conferiu ao eletrodo uma leve camada de material carbônico ao longo de sua superfície, que recobriu não somente a superfície condutora ativa, mas também o polímero base, conforme representado na Figura 16.

Figura 16 – Etapas do processo de modificação da superfície do GCE com uma suspensão de rGO.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2021).

Testes de modificações do rGO com nanopartículas de prata (AgNps) e ouro (AuNps) também foram realizados com intuito de avaliar o possível efeito sinérgico dos materiais. As nanopartículas metálicas foram sintetizadas segundo às metodologias descritas por Frens e Meisel, e fornecidas pelo grupo de pesquisa Labnano da Universidade Federal de Juiz de Fora (FRENS, 1973; LEE; MEISEL, 1982). Estas já se encontravam devidamente caracterizadas. A modificação do rGO foi feita por adição de 10 µL de suspensões coloidais de AuNps ou AgNps sobre a superfície do GCE/rGO, sendo o solvente novamente evaporado em estufa por 30 min a 50 °C (processo semelhante ao representado na Figura 16) (LI *et al.*, 2012).

Após todos os processos de modificação, o eletrodo foi lavado com água deionizada e eletrólito suporte. Para ativação do mesmo em meio de eletrólito suporte, realizou-se voltamogramas cíclicos até obter ciclos reprodutíveis. Geralmente, 4 ciclos eram suficientes para obter varreduras de potenciais reprodutíveis. A cada dia de trabalho foi realizada uma nova modificação da superfície do eletrodo.

### 3.5 CARACTERIZAÇÕES DOS MATERIAIS

Os materiais (GO e rGO) foram caracterizados por espectroscopia Raman, espectroscopia na região do infravermelho, microscopia eletrônica de varredura e difração de raios X. As análises relativas a espectroscopia Raman foram realizadas utilizando um espectrômetro Raman dispersivo da marca Bruker, modelo Senterra, e um laser He/Ne (633 nm) com potência de incidência de 20 mW. Os espectros Raman foram obtidos para amostras de GO e rGO na forma de pó, com acumulações de 5 a 10 e tempo de acumulação de 20 s na região de 500 a 2500  $\text{cm}^{-1}$ .

Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram efetuados através de um espectrômetro FT-IR Frontier Single Range – MIR da marca Perkin Elmer, entre 4000 e 600  $\text{cm}^{-1}$ . As análises dos materiais foram realizadas no estado sólido, utilizando o acessório de Reflectância Total Atenuada (ATR) com cristal de diamante.

Os difratogramas de raios X do GO e rGO foram obtidos em um equipamento Bruker, modelo D8 Advance DaVinci com geometria Bragg-Brentano, tubo de cobre (1,54056 Å), filtro de Ni e detector linear LynxEye, operando com voltagem de 40 kV e corrente de 40 mA, utilizando a faixa angular de 5° a 60° e fenda de 6 mm.

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram obtidas em um microscópio eletrônico da marca FEI, modelo Quanta 250, utilizando tensões entre 5 e 30 kV e ampliações de até 1000 vezes. Foram realizadas imagens do material na forma de pó e sobre o GCE/rGO, GCE/rGO/AgNps e GCE/rGO/AuNps.

### 3.6 AQUISIÇÕES E PREPARO DAS AMOSTRAS DE FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS E LEITE

Quatro amostras de formulações farmacêuticas, sendo duas com o princípio ativo de CIP (comprimidos) e duas de TET (cápsulas), de diferentes marcas, contendo 500 mg de cada um dos antibióticos, segundo as bulas dos fabricantes, foram fornecidas por usuários dos medicamentos. Uma procura em diversas farmácias e agropecuárias da cidade de Juiz de Fora a respeito de formulações farmacêuticas contendo o CLO foi realizada. Entretanto, em todos os estabelecimentos não foi verificada a presença de medicamentos com este princípio ativo (isto pode estar relacionado ao seu efeito tóxico, conforme discutido na seção 1.5.3).

As amostras farmacêuticas contendo a CIP foram previamente pulverizadas com o auxílio de um almofariz/pistilo, e em seguida, uma massa de 10 mg do fármaco foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL, e avolumado com eletrólito suporte tampão BR (0,04 mol L<sup>-1</sup>, pH 6,0). As amostras farmacêuticas contendo a TET já se encontravam pulverizadas no interior das cápsulas, portanto 10 mg das mesmas foram adicionadas a um balão volumétrico de 10 mL, o qual foi avolumado com eletrólito suporte tampão BR (0,04 mol L<sup>-1</sup>, pH 10,0). Ambos procedimentos de preparo não necessitaram de filtração. Estudos de adição e recuperação foram avaliados utilizando uma concentração de 25 µmol L<sup>-1</sup> de cada um dos antibióticos.

Quatro amostras de leite UHT (do inglês, *ultra-high temperature*), sendo dois integral e dois desnatado foram adquiridos em supermercados da cidade de Juiz de Fora. Estes foram selecionados devido à estudos reportarem a presença de resíduos de antibióticos mesmo após o processo de pasteurização (DU *et al.*, 2019). Após a aquisição, os leites foram estocados em um refrigerador (8-12 °C).

As amostras de leite foram diluídas cinquenta vezes em eletrólito suporte tampão BR (0,04 mol L<sup>-1</sup>), com base no trabalho de Silva e colaboradores (SILVA *et al.*, 2012). Testes com menores diluições demonstraram uma possível contaminação da superfície do eletrodo, onde sinais com baixa precisão (perda de intensidade ao longo das injeções) foram observados. Para as determinações envolvendo a CIP, TET e CLO, as amostras de leite foram fortificadas para uma concentração final de 10, 25 e 27 µmol L<sup>-1</sup>, respectivamente, na célula eletroquímica. Estes níveis de concentrações avaliados estão de acordo com os valores empregados em outros trabalhos eletroanalíticos recentemente reportados na literatura (DELGADO *et al.*, 2018; RAJAJI *et al.*, 2019; YUAN *et al.*, 2018). Cada estudo de fortificação foi realizado separadamente, uma vez que as determinações não foram simultâneas. Todas as análises foram realizadas em triplicatas autênticas.

### 3.7 DETERMINAÇÕES DOS ANTIBIÓTICOS POR CV, SWV, BIA E FIA COM DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA

Estudos preliminares com a CV, usando os diferentes sensores eletroquímicos na presença das soluções de CIP, TET e CLO foram efetuados com intuito de verificar o sensor mais adequado para quantificação dos antibióticos nas amostras de formulações farmacêuticas e leite. Além disso, a mesma foi empregada para a otimização do pH do

eletrólito suporte, avaliação do processo de transporte de massa de cada um dos analitos e investigação dos mecanismos de oxidação/redução.

Para quantificação da CIP nas amostras de fármacos e leite foram investigadas a SWV, FIA com detecção amperométrica (FIA-AMP) e BIA com detecção amperométrica (BIA-AMP). Parâmetros relacionados com a SWV (amplitude, frequência e incremento do potencial), FIA-AMP (potencial de análise, volume da alça de amostragem e vazão do eletrólito suporte), BIA-AMP (potencial de análise, volume e velocidade de injeção) foram devidamente otimizados. De forma semelhante, a TET foi avaliada pelos sistemas BIA-AMP e FIA-AMP. Finalmente, um método por DPV foi estudado para a quantificação de CLO nas amostras de leite, onde os parâmetros relacionados a técnica (amplitude, incremento de potencial e tempo de modulação) foram previamente otimizados.

### 3.8 DETERMINAÇÕES CROMATOGRÁFICAS DOS ANTIBIÓTICOS

Um cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Shimadzu, modelo LC-6AD, equipado com autoamostrador (SIL-10AF), detector de diodos UV-Vis (SPD-M20A) e uma coluna C18 (250 mm x 4,60 mm, 5 $\mu$ m, Phenomenex) foi utilizado para a determinação de CIP nas amostras de fármacos e leite. A fase móvel foi composta por uma mistura de 0,017 mol L<sup>-1</sup> de tampão fosfato (pH 2,3) e metanol (40:60) utilizando o modo isocrático. A coluna C18 foi utilizada a 40 °C, com vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, volume de injeção de 50  $\mu$ L e detecção UV no comprimento de onda de 278 nm. As amostras de formulações farmacêuticas foram dissolvidas diretamente no solvente e filtradas com filtros de seringa de membrana de PTFE, porosidade de 0,45  $\mu$ m.

Em relação às amostras de leite, 2 mL de HCl (2 mol L<sup>-1</sup>) foram adicionados a 1 mL de amostra. A mistura foi agitada e centrifugada a 2000 rpm por 10 min. Este processo de adição de HCl foi repetido três vezes. Os sobrenadantes foram coletados e o pH ajustado para 2,3 usando uma solução de NaOH (1 mol L<sup>-1</sup>). Em seguida, uma etapa de filtração foi realizada em filtro de membrana PTFE (porosidade de 0,45  $\mu$ m), e a solução resultante foi avolumada com fase móvel para um balão volumétrico de 10,00 mL.

Um cromatógrafo líquido ultra rápido 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  $\mu$ m), amostrador automático (SIL-20A UFLC) e detector espectrofotométrico UV-VIS (SPD-20A UFLC) foi utilizado para determinação da TET

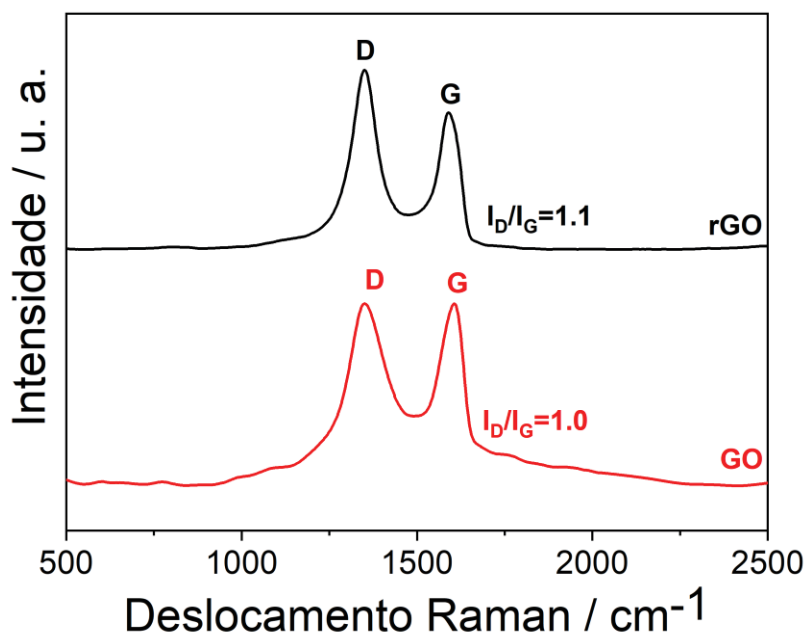
nas amostras de fármacos e CLO em leite. Para a TET utilizou-se eluição isocrática com solução de acetonitrila/ácido acético (20:80, pH 3,0), volume de injeção de 2  $\mu\text{L}$ , vazão de 0,7  $\text{mL min}^{-1}$  e detecção no comprimento de onda de 350 nm. Com relação ao CLO, as análises também foram realizadas no modo isocrático, com solução de metanol/ácido fosfórico (60:40, pH 3,0), volume de injeção de 10  $\mu\text{L}$ , vazão de 0,9  $\text{mL min}^{-1}$  e comprimento de onda de 280 nm. Os preparos das amostras de fármacos e leite foram similares ao descrito anteriormente para as análises com a CIP.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CARACTERIZAÇÕES DOS MATERIAIS

O GO e rGO foram primeiramente caracterizados por espectroscopia Raman. Na Figura 17 estão apresentados os espectros Raman obtidos para ambos os materiais. Duas bandas (D e G) foram observadas, sendo a banda D ( $1350\text{ cm}^{-1}$ ) relacionada à presença de defeito estrutural  $\text{sp}^3$ , presença de heteroátomo e/ou ligação incompleta e a banda G ( $1590\text{ cm}^{-1}$ ) associada a presença de carbono  $\text{sp}^2$  (AMBROSI; PUMERA, 2016). Após a redução química do GO com borohidreto de sódio houve um aumento da razão  $I_D/I_G$  de 1,0 para 1,1, o que resultou em um material mais desorganizado estruturalmente devido a formação de defeitos na estrutura do rGO (perda de domínios grafíticos) (ROCHA; DORNELLAS; *et al.*, 2018; YIĞIT *et al.*, 2016).

Figura 17 – Espectros Raman do GO (vermelho) e rGO (preto), obtidos utilizando um laser de He/Ne (633 nm) com potência de saída de 20 mW.

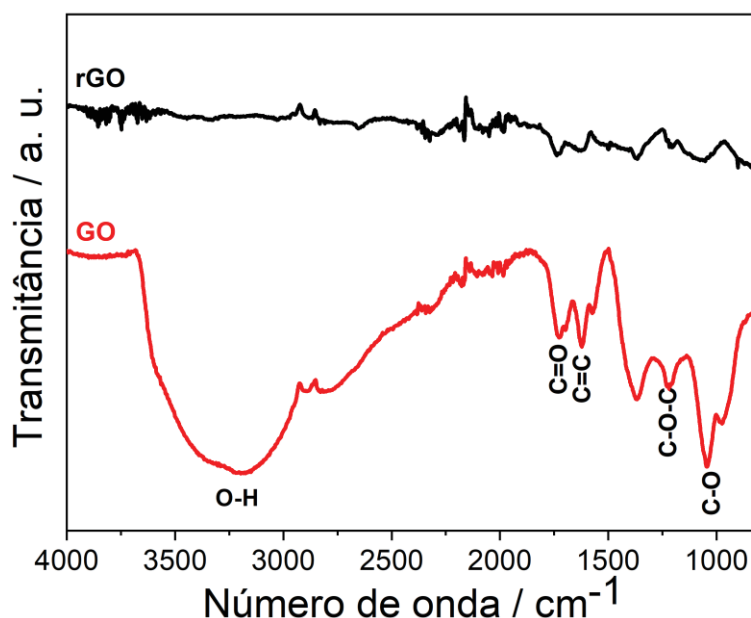


Fonte: Elaborada pelo próprio autor (2020).

Em seguida os materiais foram caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho (Figura 18) para confirmar se o processo da redução química do GO a rGO

foi eficiente. No espectro do GO é possível observar bandas em  $3200\text{ cm}^{-1}$  (correspondente ao alongamento O-H),  $1730\text{ cm}^{-1}$  (associado as vibrações C=O), e em  $1625\text{ cm}^{-1}$  (relacionada ao alongamento C=C de alcenos). As bandas em  $1220$  e  $1040\text{ cm}^{-1}$  correspondem aos modos de vibração de C-O-C e C-O, respectivamente (KONIOS *et al.*, 2014). Com respeito ao rGO, não foi verificada a presença da banda de absorção em  $3200\text{ cm}^{-1}$ , enquanto que houve uma diminuição na intensidade das bandas C-O-C e C=O, indicando a remoção da maioria dos grupos contendo oxigênio após a redução química.

Figura 18 – Espectros de infravermelho do GO (vermelho) e rGO (preto) obtidos pelo modo de reflectância total atenuada com cristal de diamante



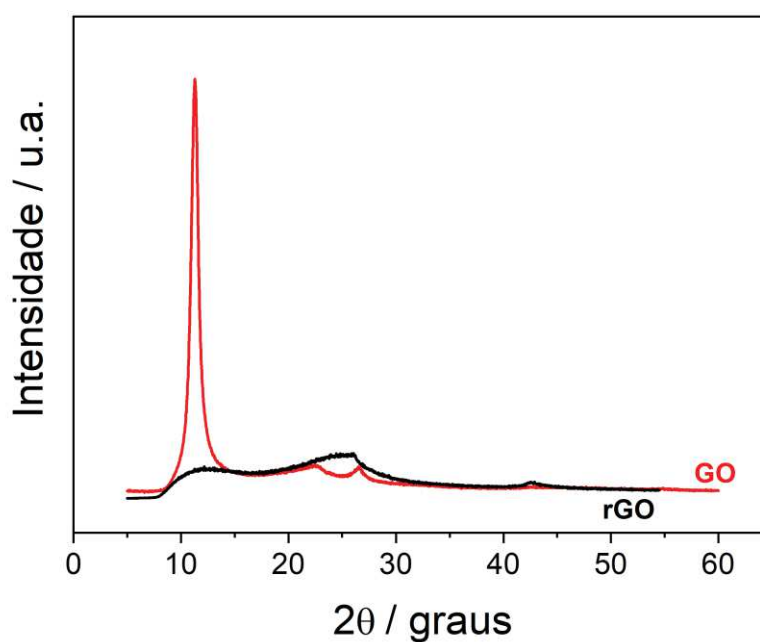
Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2021).

Difratogramas de raios X também foram obtidos para o GO e rGO, conforme mostrado na Figura 19. O GO apresentou um pico intenso em  $11,5^\circ$ , que está relacionado ao plano (002) do grafite, onde ocorre um aumento da distância interplanar entre as camadas do grafeno ( $0,830\text{ nm}$ ) devido à presença de grupos funcionais contendo oxigênio, característico do óxido de grafeno (MENG; PARK, 2012). Após a redução química do GO, pode-se notar no difratograma do rGO uma diminuição considerável da intensidade do pico em  $11,5^\circ$  e o aparecimento de dois picos, um mais intenso e largo centrado em aproximadamente  $26^\circ$  e outro em  $43^\circ$ , referentes aos planos de (002) e (100)



de estruturas gráficas. O pico largo em  $26^\circ$  pode estar relacionado a um empilhamento irregular do grafeno de acordo com a sua reorganização no estado sólido após a redução do material (JU *et al.*, 2010).

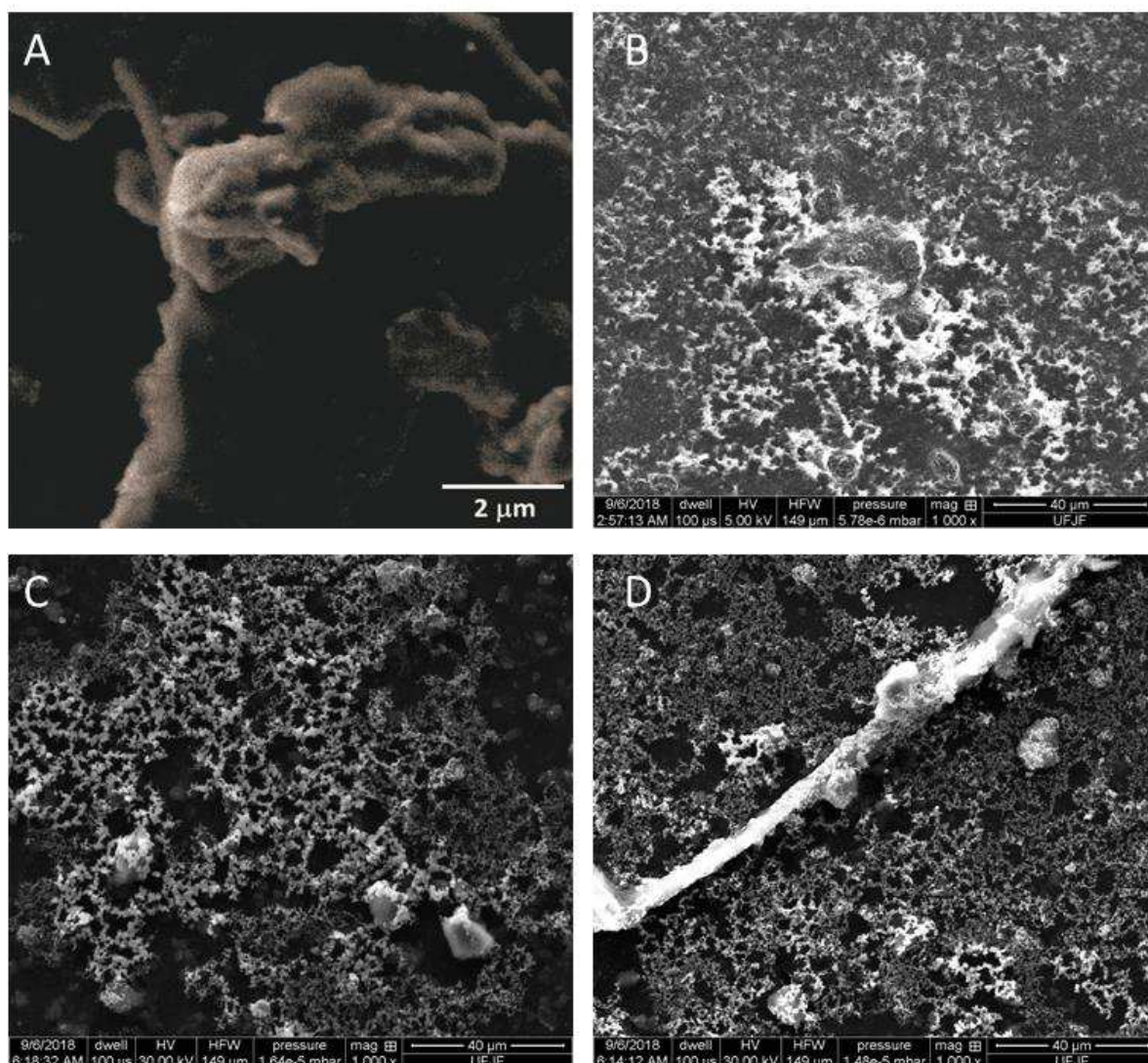
Figura 19 – Difratoograma de raios X obtidos para o GO e rGO. Condições de análise: tubo de cobre ( $1,54056\text{Å}$ ), filtro de Ni e detector linear LynxEye, operando com voltagem de 40 kV e corrente de 40 mA, utilizando a faixa angular de  $5^\circ$  a  $60^\circ$  e fenda de 6 mm.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2020).

Para a avaliação morfológica do rGO no estado sólido e nas superfícies modificadas (GCE/rGO, GCE/rGO/AgNps e GCE/rGO/AuNp)s foi utilizada a microscopia eletrônica de varredura. As imagens obtidas estão representadas na Figura 20.

Figura 20 – Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura para o (A) rGO no estado sólido, (B) para a superfície do GCE/rGO, (C) GCE/rGO/AgNps e (D) GCE/rGO/AuNps. Condições: tensão de 30 Kv e ampliações de 1000 vezes



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2020).

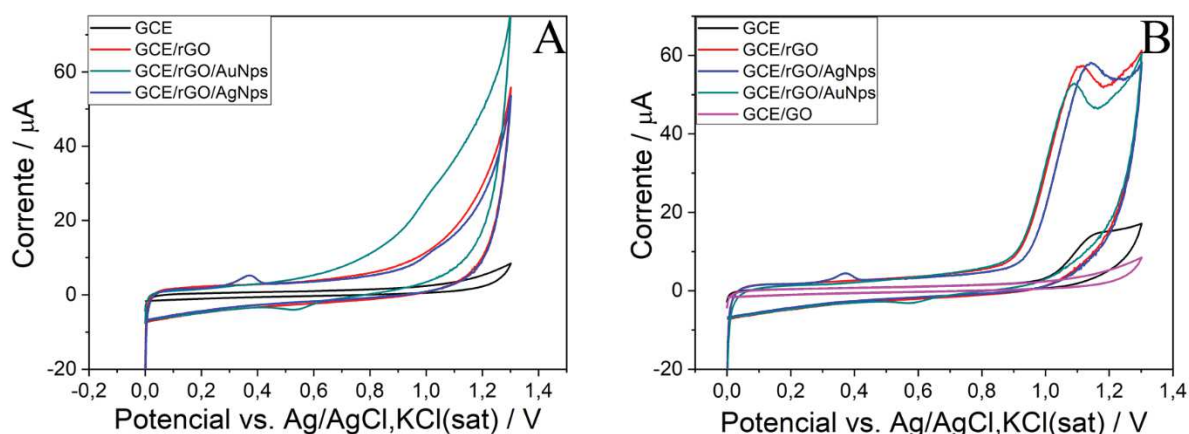
A partir da Figura 20A, verifica-se que o rGO no estado sólido apresentou folhas de grafeno agregadas com diferentes tamanhos na escala micrométrica. Após a modificação da superfície GCE com a suspensão de rGO (Figura 20B) foi observado a presença de flocos de grafeno recobrendo uma grande parte da superfície do eletrodo. Com relação as nanopartículas metálicas (Figura 20C e 20D), estas se aglomeraram depois do processo de secagem e ficaram localizadas sobre os flocos de rGO, e em regiões da superfície do GCE que não foram ocupadas pelo rGO. Não foi possível estimar o tamanho das nanopartículas, em virtude da baixa resolução do equipamento utilizado.

## 4.2 ESTUDOS ELETROQUÍMICOS COM A CIPROFLOXACINA

### 4.2.1 Investigação do comportamento eletroquímico da ciprofloxacina por CV

Um estudo inicial por CV na ausência e presença de uma solução de CIP ( $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em meio de eletrólito suporte, tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 6,0), foi realizado para comparação da resposta da CIP nos diferentes sensores (GCE, GCE/rGO, GCE/rGO/AgNps, GCE/rGO/AuNps e GCE/GO), a fim de selecionar o mais adequado para a quantificação do analito. Na Figura 21 estão representados os voltamogramas cíclicos obtidos na faixa de potencial de 0,0 a 1,3 V.

Figura 21 – Voltamogramas cíclicos obtidos com os diferentes sensores, GCE (preto), GCE/rGO (vermelho), GCE/rGO/AgNps (azul), GCE/rGO/AuNps (verde) e GCE/GO (rosa) na (A) ausência e (B) presença de uma solução de CIP ( $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em meio de tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 6,0), com velocidade de varredura de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ .



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2020).

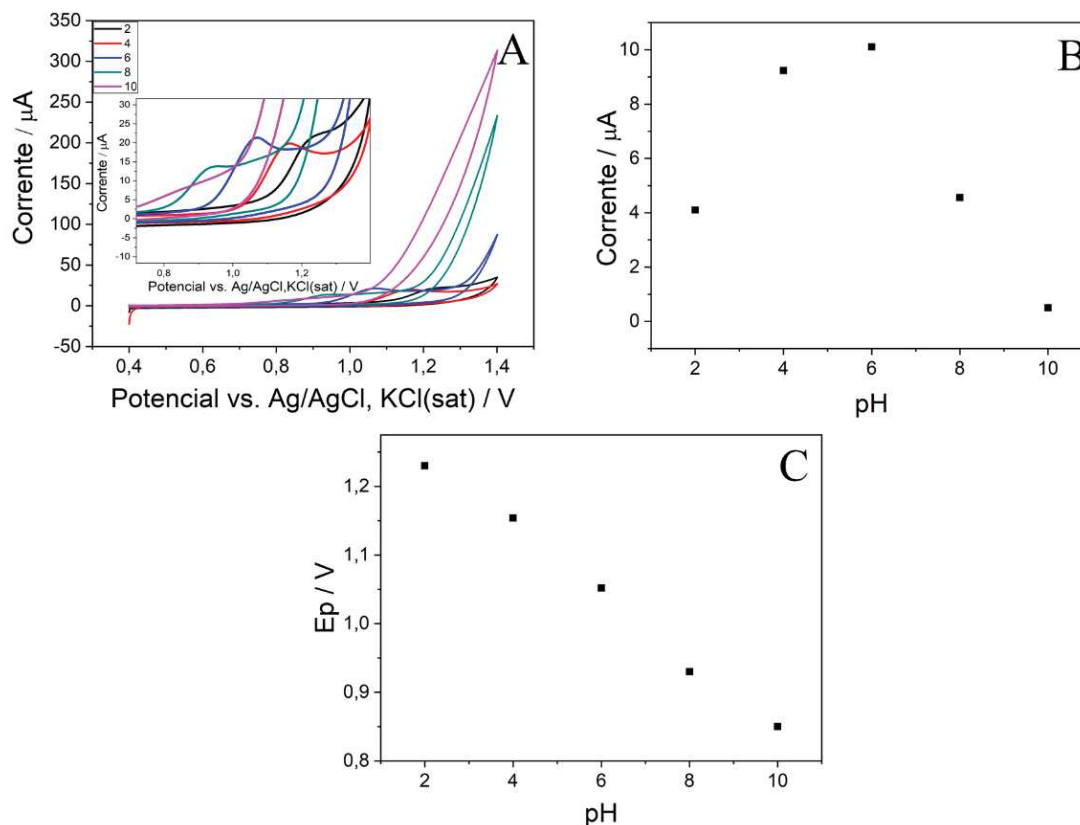
Sobre a superfície do GCE verificou-se um pico de oxidação irreversível da CIP em aproximadamente +1,2 V, enquanto que no GCE/rGO observou-se um pico de oxidação irreversível em +1,1 V (antecipação do potencial em 0,1 V) e um ganho de sinal analítico de cinco vezes frente ao GCE. Isto pode estar relacionado ao incremento da área eletroativa devido à rugosidade do nanomaterial (ROCHA; DORNELLAS; *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2020), bem como a possíveis efeitos eletrocatalíticos, uma vez que o processo de transferência eletrônica foi facilitado. O incremento na área eletroativa é evidenciado a partir dos voltamogramas na presença de apenas eletrólito suporte (Figura 21A), onde houve um aumento da corrente capacitiva de aproximadamente três vezes no

GCE/rGO em comparação ao eletrodo sem modificação. No GCE/GO não foi observada a oxidação da CIP, visto que as propriedades isolantes do material provavelmente dificultaram a transferência eletrônica (DREYER *et al.*, 2010).

Com os sensores GCE/rGO/AgNps e GCE/rGO/AuNps não foi notado um ganho de sinal analítico e/ou deslocamento de potencial significativo frente ao GCE/rGO. Um sinal anódico em 0,30 V e um catódico em 0,55 V, referentes à oxidação da prata e redução do ouro, respectivamente, foram observados. Após sucessivos ciclos com ambos sensores, observou-se que as intensidades dos sinais de prata e ouro diminuíram consideravelmente em razão de uma possível dessorção destas nanopartículas para a solução, o que ocasionou medidas eletroquímicas irreprodutíveis para a CIP. Neste sentido, o processo de imobilização das nanopartículas sobre o rGO necessita de uma melhor investigação (uso de polímeros e/ou outros modos de modificação). Diante disto, apenas o sensor GCE/rGO foi escolhido para os demais estudos com a CIP.

Para a otimização do pH do eletrólito suporte foram selecionados valores na faixa de 2,0 a 10,0; utilizando o tampão BR (0,04 mol L<sup>-1</sup>). Os voltamogramas cíclicos, bem como as relações dos sinais e potenciais de oxidação da CIP com o pH usando o GCE/rGO estão representados na Figura 22.

Figura 22 – (A) Voltamogramas cíclicos de uma solução de CIP ( $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em meio de tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ ) com valores de pH iguais a 2,0 (preto); 4,0 (vermelho); 6,0 (azul); 8,0 (verde); 10,0 (rosa); (B) relação entre a corrente e o pH e (C) relação entre o potencial de pico ( $E_p$ ) e o pH, com velocidade de varredura de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ .



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2020).

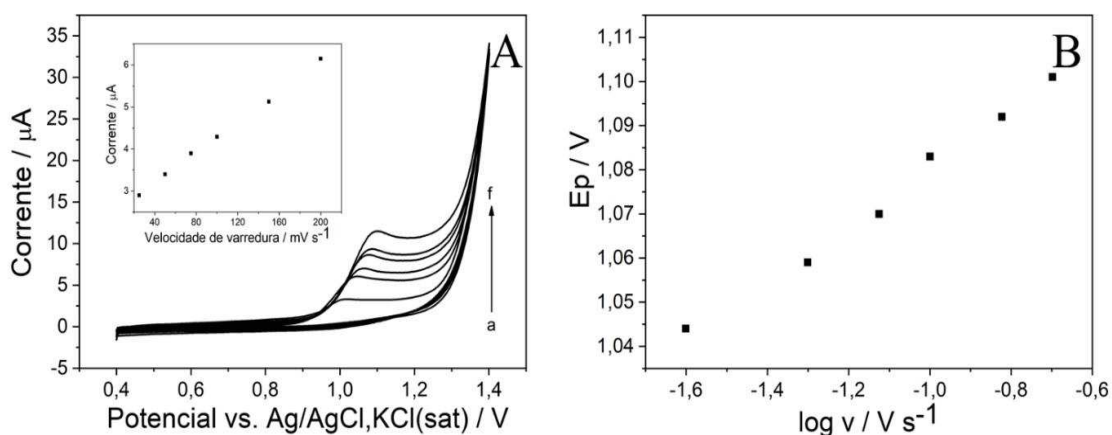
Através dos voltamogramas cíclicos obtidos (Figura 22A), observa-se que houve um deslocamento do potencial de pico para valores mais próximos de 0,0 V, a medida que o pH do meio aumentou, demonstrando uma maior facilidade de oxidar a CIP em meio alcalino. No entanto, de acordo com a Figura 22B, foi verificado ganho de sinal analítico somente até o pH 6,0; visto que a CIP apresenta baixa solubidade em meio básico (BLOKHINA *et al.*, 2016). Desta forma, o tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 6,0) foi selecionado.

A Figura 22C mostra uma relação linear ( $R^2 > 0,99$ ) entre  $E_p$  e pH (comportamento pH-dependente), que apresentou um coeficiente angular de  $-50 \text{ mV pH}^{-1}$ . Este valor é relativamente próximo do valor teórico de um sistema nerstiano ( $-59 \text{ mV}$

$\text{pH}^{-1}$ ), sugerindo que o número de prótons e elétrons envolvidos na oxidação da CIP são iguais.

O processo de transporte de massa da CIP sobre a superfície do GCE/rGO também foi investigado por CV, variando a velocidade de varredura de 25 a 200  $\text{mV s}^{-1}$ , na presença de 200  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de CIP em meio de tampão BR (0,04  $\text{mol L}^{-1}$ ,  $\text{pH } 6,0$ ), conforme apresentado na Figura 23.

Figura 23 – (A) Voltamogramas cíclicos de uma solução de CIP (200  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em meio de tampão BR (0,04  $\text{mol L}^{-1}$ ,  $\text{pH } 6,0$ ) com velocidades de varreduras, (a) 25, (b) 50, (c) 75, (d) 100, (e) 150 e (f) 200  $\text{mV s}^{-1}$  usando o GCE/rGO e; (B) Estudo do potencial de pico ( $E_p$ ) com o logaritmo da velocidade de varredura. O gráfico inserido em (A) representa o ajuste linear entre a corrente e a velocidade de varredura.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2020).

Usando o GCE/rGO foi obtido um ajuste linear ( $R^2 > 0,99$ ) entre a corrente de pico e a velocidade de varredura (Figura 23A), indicando que o regime de transporte de massa das espécies de CIP foi controlado predominantemente por adsorção. Comportamento diferente foi verificado sobre o GCE (não mostrado), onde obteve-se um ajuste linear entre a corrente de pico e a raiz quadrada da velocidade, caracterizando um transporte de massa por difusão. Neste sentido, a mudança do regime de transporte de massa da CIP após o processo de modificação pode estar associada à formação de uma fina camada porosa de rGO sobre a superfície do GCE, que poderia confinar as espécies de CIP no seu interior. Este aprisionamento das moléculas de CIP, provavelmente contribuiu para o incremento do sinal analítico no GCE/rGO frente ao GCE. Resultado

similar foi verificado em eletrodo modificado com nanotubos de carbono (JALAL *et al.*, 2019).

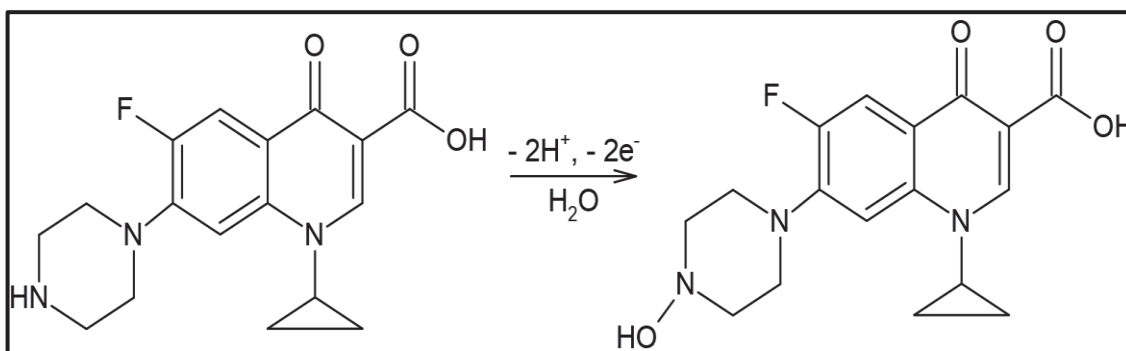
Nesta etapa de estudo do transporte de massa usando o GCE/rGO, foi observado um deslocamento do potencial de pico ( $E_p$ ) da CIP para valores mais positivos, conforme aumentava-se a velocidade de varredura ( $v$ ), sendo obtido uma relação linear ( $R^2 > 0,98$ ) entre  $E_p$  e  $\log v$  ( $E_p$  (V) = 1,145 + 0,064  $\log v$  (V s<sup>-1</sup>)), como mostrado na Figura 23B. Os coeficientes deste ajuste podem ser relacionados com a Equação 1, descrita por Laviron (para comportamento irreversível e controlado por adsorção), de forma a avaliar o número de elétrons envolvidos na reação de oxidação da CIP (LAVIRON, 1979).

$$E_p (V) = A + \frac{2.303 RT}{\alpha n F} \log v \text{ (Equação 1)}$$

Onde A é uma constante relacionada ao potencial formal do eletrodo  $E_0$ ,  $\alpha$  é o coeficiente de transferência eletrônica, n é o número de elétrons envolvidos na reação, R, T e F são a constante do gás ideal, temperatura e constante de Faraday, respectivamente.

De acordo com o coeficiente angular obtido, o número calculado de elétrons foi de 1,84 (assumindo  $\alpha = 0,5$ ), sugerindo que a oxidação eletroquímica da CIP envolveu dois elétrons. Como discutido anteriormente, no processo de oxidação da CIP o número de prótons é igual ao número de elétrons, portanto há dois prótons e dois elétrons na oxidação da mesma. Na Figura 24 está representado um possível mecanismo de oxidação da CIP, que é consistente com outros estudos da literatura científica (REDDY *et al.*, 2018).

Figura 24 – Mecanismo da oxidação eletroquímica da CIP

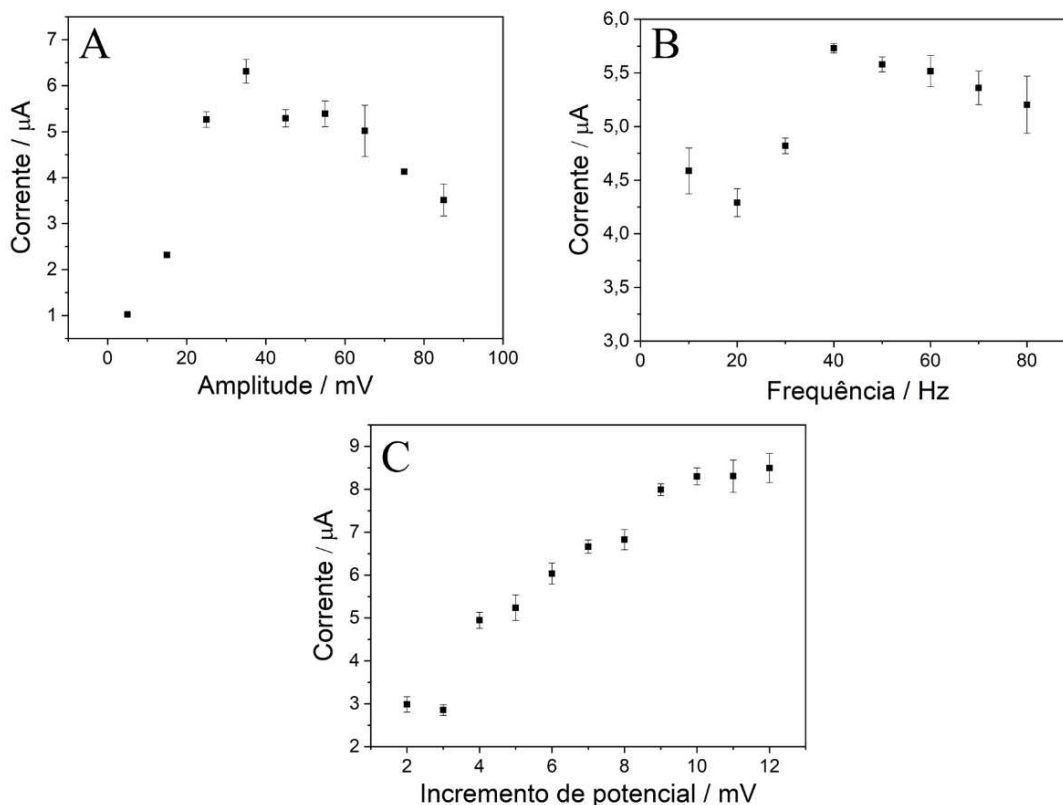


Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2020).

#### 4.2.2 Avaliação da ciprofloxacina por SWV

Devido à técnica de SWV possibilitar o uso de elevadas velocidades de varredura e proporcionar boa detectabilidade (minimização da contribuição capacitiva), a mesma foi selecionada para o desenvolvimento do primeiro método eletroanalítico usando GCE/rGO visando à determinação de CIP. Os parâmetros relacionados com a técnica (amplitude da onda, frequência e incremento de potencial) foram devidamente avaliados com o objetivo de obter a melhor resposta, em termos de intensidade da corrente e perfil voltamétrico. A otimização foi realizada em triplicata de maneira univariada utilizando uma solução de concentração de CIP  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Na Figura 25 estão representadas as respostas analíticas em função de cada um dos parâmetros avaliados.

Figura 25 – Resultados obtidos a partir da otimização da (A) amplitude, (B) frequência e (C) incremento do potencial, para a determinação de CIP por SWV usando GCE/rGO. Concentração de CIP:  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ , eletrólito suporte: tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 6,0) e eletrodo de referência: Ag/AgCl,KCl(sat).



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2019).



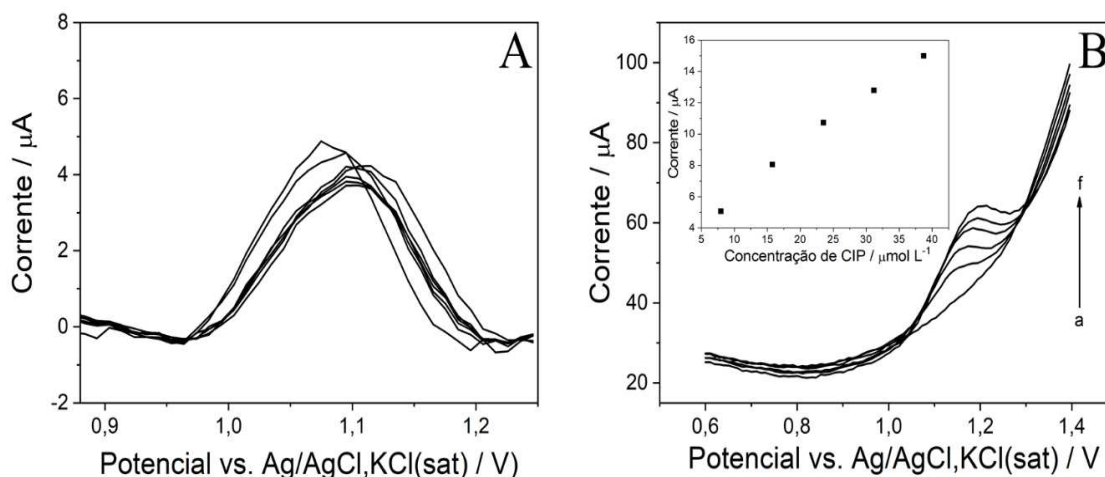
O primeiro parâmetro estudado foi a amplitude da onda, onde trabalhou-se com valores de 5 a 85 mV. De acordo com a Figura 25A, é possível observar que houve ganho considerável de sinal analítico até 35 mV de amplitude. Após este valor ocorreu uma diminuição e um alargamento significativo do sinal de oxidação da CIP. Portanto, 35 mV foi a condição otimizada.

Em seguida, a influência da frequência da onda foi avaliada no intervalo de 10 a 80 Hz. De acordo com a Figura 25B, tem-se que o maior sinal analítico foi em 40 Hz, sendo que a partir deste houve perda de intensidade e precisão das medidas. Desta forma, a frequência foi fixada em 40 Hz para dar continuidade ao processo de otimização.

Por fim, foi investigado o incremento do potencial, o qual associado com a frequência, fornece a velocidade de varredura. Através da Figura 25C, verifica-se que houve um aumento do sinal analítico significativo até o incremento de 10 mV, que pode estar relacionado a um menor consumo de espécies eletroativas. Após este valor, o sinal manteve-se constante com baixa precisão das medidas. Neste sentido, o incremento de potencial foi selecionado em 10 mV, o que conferiu a análise por SWV uma velocidade de varredura de  $400 \text{ mV s}^{-1}$ .

Sob os parâmetros previamente otimizados, um estudo de repetibilidade ( $n = 7$ ) com uma concentração de CIP de  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  foi realizado para verificar a precisão das respostas eletroquímicas sobre a superfície do GCE/rGO por SWV (Figura 26A). Um RSD menor que 7,0 % foi obtido, demonstrando uma adequada precisão das medidas. Em seguida, foi construída uma curva analítica com concentrações de CIP na faixa de 6 a  $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ , ( $I_p = 2,49 + 0,40 [\text{CIP}] / \mu\text{mol L}^{-1}$ ), a qual apresentou uma boa linearidade ( $R^2 = 0,991$ ), conforme representado na Figura 26B. Em concentrações abaixo de  $6 \mu\text{mol L}^{-1}$  não foi possível estabelecer relações lineares.

Figura 26 – (A) Voltamogramas referentes ao estudo de repetibilidade da CIP ( $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) por SWV usando GCE/rGO; e a (B) Curva analítica na faixa de 6 a  $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ , (a) tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 6,0) e (f)  $40 \mu\text{mol L}^{-1}$  de CIP. Condições instrumentais: amplitude 35 mV, frequência 40 Hz e incremento de potencial 10 mV, eletrólito suporte: tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 6,0) e eletrodo de referência: Ag/AgCl,KCl(sat).



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2019).

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados de acordo com a IUPAC (MOCÁK *et al.*, 1997), segundo as Equações 2 e 3:

$$LD = \frac{3sb}{S} \quad (\text{Equação 2}) \quad LQ = \frac{10sb}{S} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde  $sb$  é a incerteza associada ao coeficiente linear e  $S$  é o coeficiente angular.

Os valores de LD e LQ foram calculados em  $0,21$  e  $0,70 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. Neste sentido, o LD por SWV usando GCE/rGO (correspondente à  $0,069 \text{ mg L}^{-1}$ ) foi inferior ao LMR de CIP em leite ( $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ), mostrando detectabilidade adequada com a legislação brasileira. A frequência analítica por SWV foi estimada em 50 análises por hora, visto à necessidade da troca de béqueres e lavagem dos eletrodos no decorrer das análises.

#### 4.2.3 Avaliação da ciprofloxacina por FIA-AMP

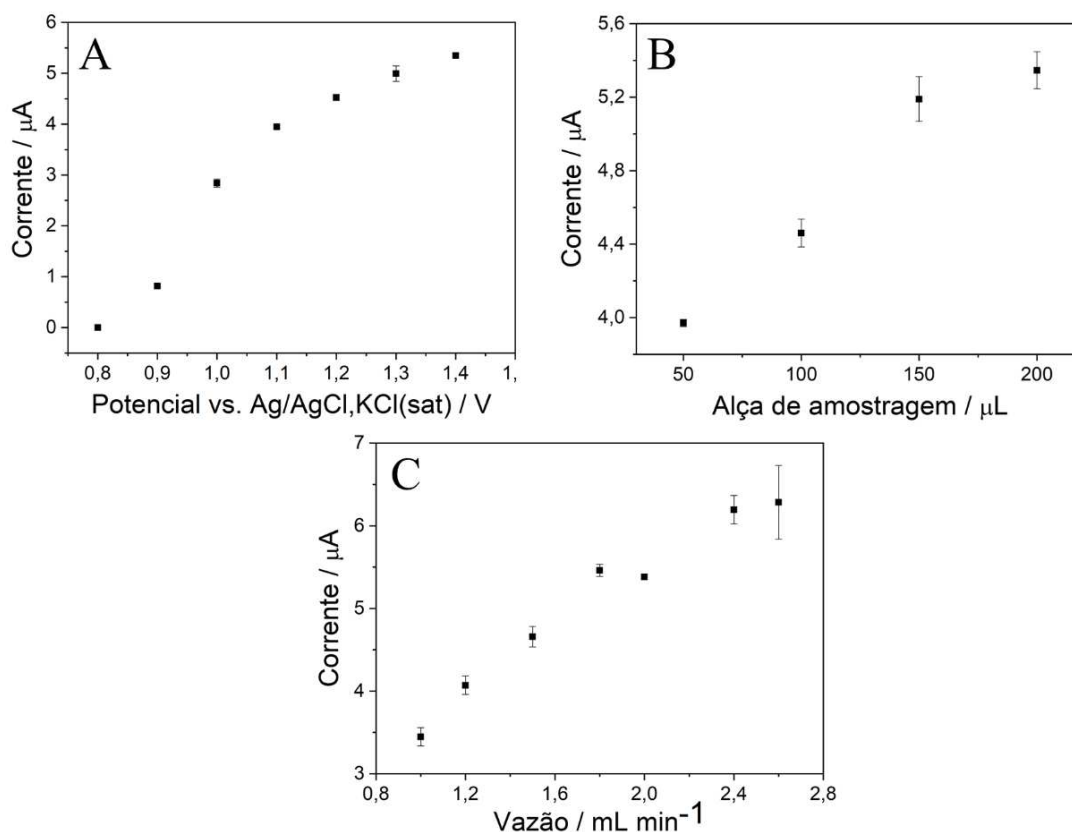
Para a determinação da CIP pelo sistema FIA-AMP foram investigadas as influências do potencial de análise, volume de alça de amostragem e vazão do eletrólito suporte sobre a resposta analítica da CIP, com o objetivo de se estabelecer um método rápido, preciso e sensível. Para estes estudos, foi utilizado uma solução de CIP com

concentração de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  e medidas eletroquímicas realizadas em triplicata ( $n = 3$ ). Na Figura 27 estão representados os resultados deste processo de otimização.

Primeiramente otimizou-se o potencial de análise (Figura 27A), onde cada potencial foi avaliado separadamente, em virtude do software NOVA 2.1.4 não possibilitar a análise por MPA. Trabalhou-se com potenciais de 0,8 a 1,4 V, onde foi observado o início da oxidação da CIP em 0,9 V e aumento significativo do sinal analítico até 1,1 V, o qual foi fixado para as demais otimizações.

Posteriormente investigou-se o volume da alça de amostragem (50 a 200  $\mu\text{L}$ ), conforme mostrado na Figura 27B. Foi verificado um aumento linear da intensidade de corrente até 150  $\mu\text{L}$ , sendo que após este valor o sinal tendeu a estabilidade, possivelmente devido à saturação dos sítios eletroativos da superfície eletródica. Desta forma, o volume de 150  $\mu\text{L}$  foi selecionado. Por último foi avaliada a vazão do eletrólito suporte, trabalhando com valores de 1,0 a 2,6  $\text{mL min}^{-1}$  (Figura 27C). Em vazões baixas, observou-se sinais alargados de pequena intensidade, em razão da dispersão do analito no percurso analítico. À medida que a vazão foi aumentando, sinais transientes bem definidos foram obtidos. Houve aumento de intensidade sem perda de precisão até 1,8  $\text{mL min}^{-1}$ , sendo esta a vazão otimizada.

Figura 27 – (A) Otimização do potencial de análise para CIP pelo sistema FIA-AMP usando GCE/rGO na faixa de 0,8 a 1,4 V; alça de amostragem: 50  $\mu\text{L}$  e vazão do eletrólito suporte: 1,5  $\text{mL min}^{-1}$ , (B) Otimização do volume da alça de amostragem no intervalo de 50 a 200  $\mu\text{L}$ ; potencial: 1,1 V e vazão do eletrólito suporte: 1,5  $\text{mL min}^{-1}$ ; (C) Otimização da vazão na faixa de 1,0 a 2,6  $\text{mL min}^{-1}$ ; potencial: 1,1 V e alça de amostragem de 150  $\mu\text{L}$ . Concentração de CIP: 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , eletrólito suporte: tampão BR (0,04  $\text{mol L}^{-1}$ , pH 6,0) e eletrodo de referência: Ag/AgCl,KCl(sat).

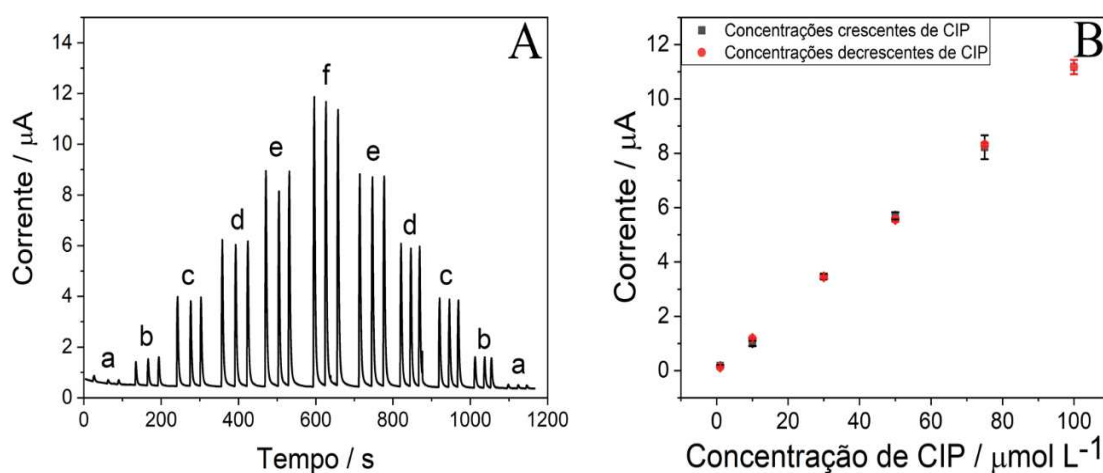


Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2020).

Sob os parâmetros otimizados, foram construídas curvas analíticas com incrementos crescentes e decrescentes de concentração de CIP (1-100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), para verificar a linearidade e o efeito de memória após sucessivas adições de padrão. O amperograma e as respectivas curvas analíticas referentes à este estudo estão representados na Figura 28. As curvas com concentrações crescentes (a-f), ( $I_p = 0,043 + 0,112 [\text{CIP}] / \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e decrescentes (f-a) ( $I_p = 0,032 + 0,111 [\text{CIP}] / \mu\text{mol L}^{-1}$ ), apresentaram bons ajustes lineares ( $R^2 = 0,999$ ) e coeficientes angulares equivalentes, evidenciando que não houve efeito de memória após sucessivas adições do padrão de CIP. Os valores de LD e LQ foram calculados em 0,28 e 0,93  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente, sendo

possível notar que o LD (correspondente à  $0,092 \text{ mg L}^{-1}$ ) também foi inferior ao LMR de CIP em leite.

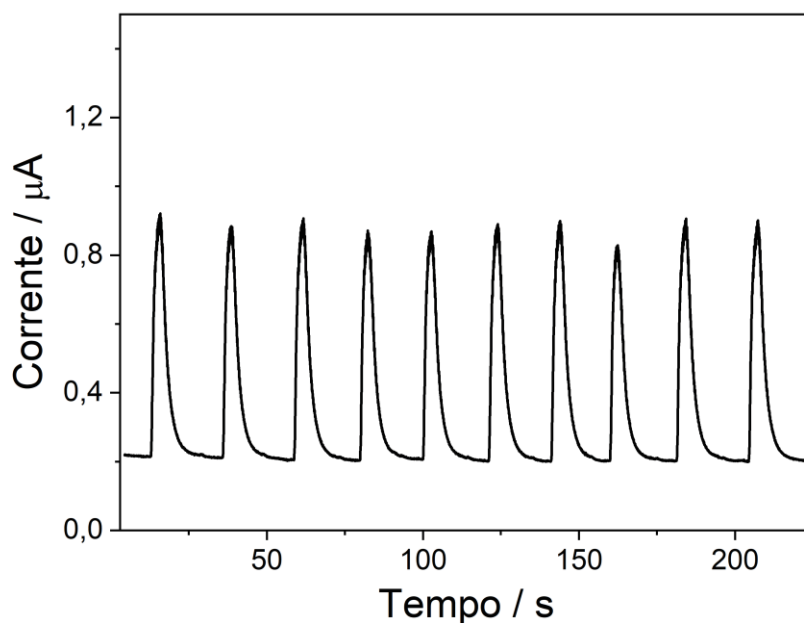
Figura 28 - (A) Amperograma obtido pelo sistema FIA-AMP usando GCE/rGO com concentrações crescentes e decrescentes de CIP, (a)  $1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ , (b)  $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ , (c)  $30 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ , (d)  $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ , (e)  $75 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  e (f)  $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (B) Respectivas curvas analíticas plotadas. Condições instrumentais, potencial de análise:  $1,1 \text{ V}$ , alça de amostragem:  $150 \text{ } \mu\text{L}$  e vazão do eletrólito suporte:  $1,8 \text{ mL min}^{-1}$ , eletrólito suporte: tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 6,0) e eletrodo de referência: Ag/AgCl,KCl(sat)



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2020).

Um estudo de repetibilidade ( $n = 10$ ) foi realizado com uma concentração de  $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  de CIP (Figura 29), sendo obtido um RSD de 2,8 %, demonstrando que não houve contaminação da superfície do eletrodo e que a resposta eletroquímica da CIP apresentou precisão adequada. A frequência analítica do sistema FIA-AMP foi estimada em aproximadamente 110 análises por hora.

Figura 29 – Estudo de repetibilidade (n = 10) do sistema de análise FIA-AMP utilizando uma concentração de CIP de  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Condições instrumentais, potencial de análise: 1,1 V, alça de amostragem:  $150 \mu\text{L}$  e vazão do eletrólito suporte:  $1,8 \text{ mL min}^{-1}$ , eletrólito suporte: tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 6,0) e eletrodo de referência: Ag/AgCl,KCl(sat)



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2020).

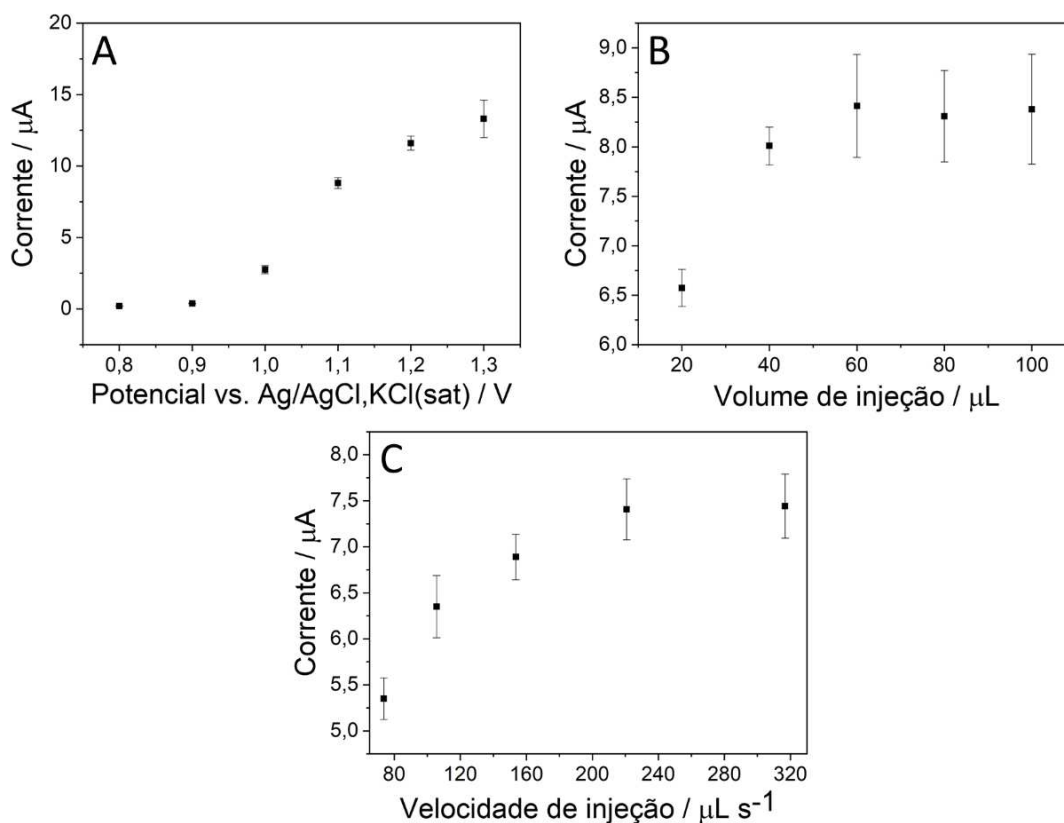
#### 4.2.4 Avaliação da ciprofloxacina por BIA-AMP

Semelhantemente a investigação pelo sistema FIA-AMP, inicialmente foram realizados estudos envolvendo a otimização das condições experimentais de análise (potencial, volume e velocidade de injeção), conforme mostrado na Figura 30. Para este fim, empregou-se uma solução de CIP  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  com medidas realizadas em triplicata (n = 3). Em potenciais superiores a 0,9 V, observou-se o processo de oxidação da CIP com incremento de sinal analítico até 1,3 V (Figura 30A). Entretanto, de forma a proporcionar uma melhor seletividade ao método, o potencial de 1,1 V foi selecionado.

O volume de injeção foi avaliado na faixa de 20 a  $100 \mu\text{L}$  (com incrementos de  $20 \mu\text{L}$ ), conforme mostrado na Figura 30B. Um aumento da intensidade do sinal instrumental foi verificado de 20 a  $60 \mu\text{L}$ , porém a partir de  $60 \mu\text{L}$  ocorreu uma perda considerável de precisão das medidas. Desta forma,  $40 \mu\text{L}$  foi a condição ótima definida

no experimento. Finalmente, a velocidade de injeção foi investigada de 73,6 a 316,8  $\mu\text{L s}^{-1}$  (Figura 30C), com relação proporcional ao aumento do sinal analítico até 220,8  $\mu\text{L s}^{-1}$ , a qual foi escolhida para as análises.

Figura 30 – (A) Otimização do potencial de análise para CIP pelo sistema BIA-AMP usando GCE/rGO na faixa de 0,8 a 1,3 V; volume de injeção: 40  $\mu\text{L}$  e velocidade de injeção: 220,6  $\mu\text{L s}^{-1}$ , (B) Otimização do volume de injeção no intervalo de 20 a 100  $\mu\text{L}$ ; potencial: 1,1 V e velocidade de injeção: 220,6  $\mu\text{L s}^{-1}$ ; (C) Otimização da velocidade de injeção na faixa de 73,6 a 316,8  $\mu\text{L s}^{-1}$ ; potencial: 1,1 V e volume de injeção de 40  $\mu\text{L}$ . Concentração de CIP: 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , eletrólito suporte: tampão BR (0,04 mol  $\text{L}^{-1}$ , pH 6,0) e eletrodo de referência: Ag/AgCl,KCl(sat).



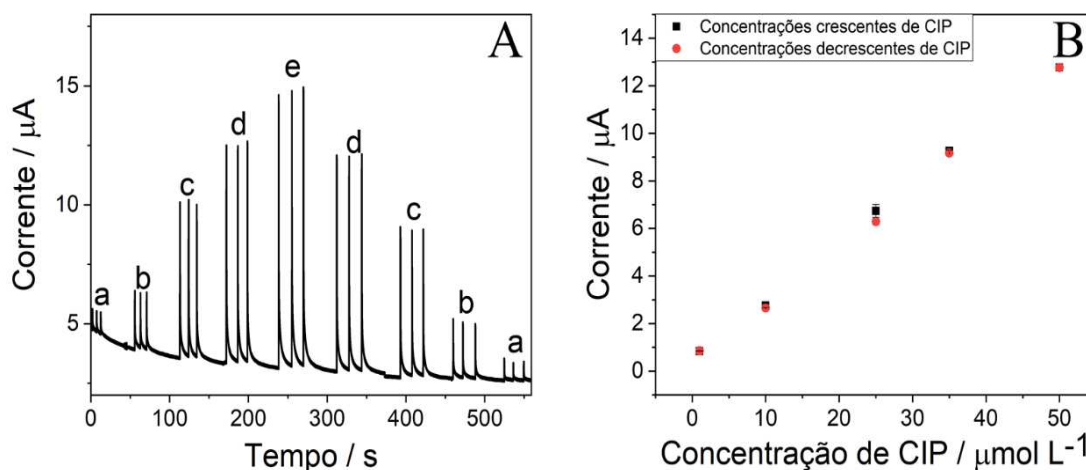
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Curvas analíticas com concentrações crescentes e decrescentes de CIP na faixa de 1 a 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  foram construídas para verificar a linearidade, assim como o efeito de memória durante as análises (Figura 31). As curvas com concentrações crescentes (a-e), ( $I_p = 0,584 + 0,247 [\text{CIP}] / \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $R^2 = 0,999$ ) e decrescentes (e-a) ( $I_p = 0,471 + 0,245$

[CIP] /  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $R^2 = 0,997$ ), apresentaram boa linearidade com sensibilidades semelhantes, ressaltando que não houve efeito de memória nesta faixa de concentração estudada.

Figura 31 – (A) Amperograma obtido pelo sistema BIA-AMP usando GCE/rGO com concentrações crescentes e decrescentes de CIP, (a)  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ , (b)  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ , (c)  $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ , (d)  $35 \mu\text{mol L}^{-1}$ , (e)  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; (B) Respectivas curvas analíticas plotadas.

Condições instrumentais, potencial de análise: 1,1 V, volume de injeção:  $40 \mu\text{L}$ , velocidade de injeção:  $220,8 \mu\text{L s}^{-1}$ , eletrólito suporte: tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 6,0) e eletrodo de referência: Ag/AgCl,KCl(sat).

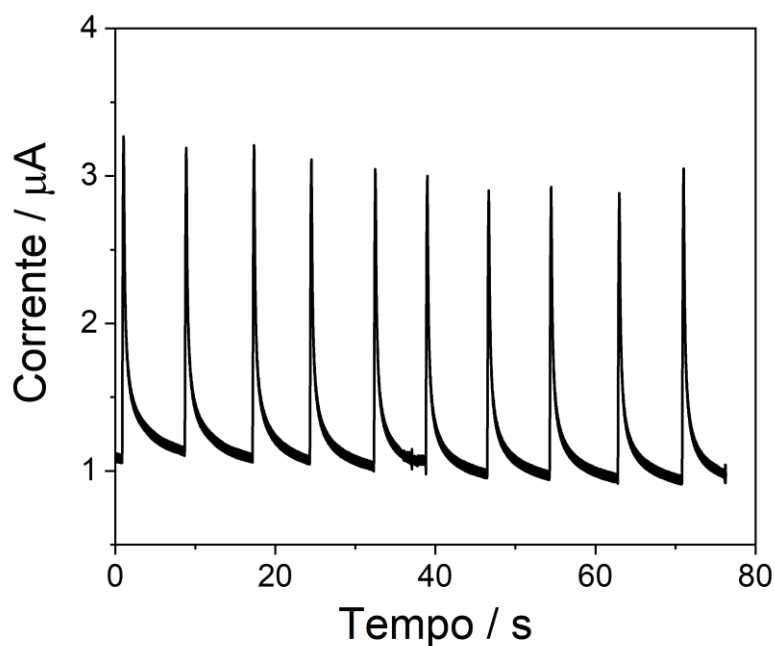


Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2020).

Os LD e LQ foram calculados em  $0,16$  e  $0,53 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente, onde novamente o LD (correspondente a  $0,052 \text{ mg L}^{-1}$ ) foi inferior ao LMR de CIP em leite. A precisão do método foi avaliada por meio de um estudo de repetibilidade ( $n = 10$ ) utilizando uma concentração de CIP de  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ , como mostrado na Figura 32. Obteve-se um RSD de 3,1 %, o que indicou uma boa precisão das medidas e ausência de contaminação da superfície do eletrodo. A frequência analítica foi estimada em 180 análises por hora.



Figura 32 – Estudo de repetibilidade ( $n = 10$ ) do sistema de análise BIA-AMP utilizando uma concentração de CIP de  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Condições instrumentais, potencial de análise: 1,1 V, volume de injeção:  $50 \mu\text{L}$ , velocidade de injeção:  $220,8 \mu\text{L s}^{-1}$ , eletrólito suporte: tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 6,0) e eletrodo de referência: Ag/AgCl,KCl(sat)



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2020).

Uma limitação do método BIA-AMP é o volume interno da célula, que permite um volume total de solução de 85 mL. Considerando a adição inicial de 50 mL de eletrólito suporte, a célula BIA permitiu a adição de 875 injeções de  $40 \mu\text{L}$ . Depois disso, a solução interna precisou ser substituída por uma nova solução de eletrólito suporte. Mesmo após essa troca de solução, o eletrodo modificado apresentou respostas estáveis com baixa variação de corrente para a CIP ( $< 7\%$ ). Porém, no início de cada dia, uma nova modificação da superfície do GCE era realizada.

#### 4.2.5 Aplicação dos métodos SWV, FIA-AMP e BIA-AMP para determinação de ciprofloxacina em amostras de formulações farmacêuticas e leite

Antes de proceder com as análises das amostras, foi realizado um estudo comparativo das características analíticas de ambos os métodos desenvolvidos para a determinação da CIP usando o GCE/rGO, como descrito na Tabela 1.

Tabela 1 – Comparação das características analíticas de ambos métodos desenvolvidos para a determinação da CIP.

Características analíticas	SWV	FIA-AMP	BIA-AMP
Faixa linear ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	6-40	1-100	1-50
LD ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	0,21	0,28	0,16
Sensibilidade ( $\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$ )	0,40	0,11	0,25
Volume de injeção ( $\mu\text{L}$ )	-	150	40
Velocidade de injeção ( $\mu\text{L s}^{-1}$ )	-	30 <sup>a</sup>	220,8
Frequência analítica ( $\text{a h}^{-1}$ )	50	110	180
% RSD (n = 10)	7,0	2,8	3,1

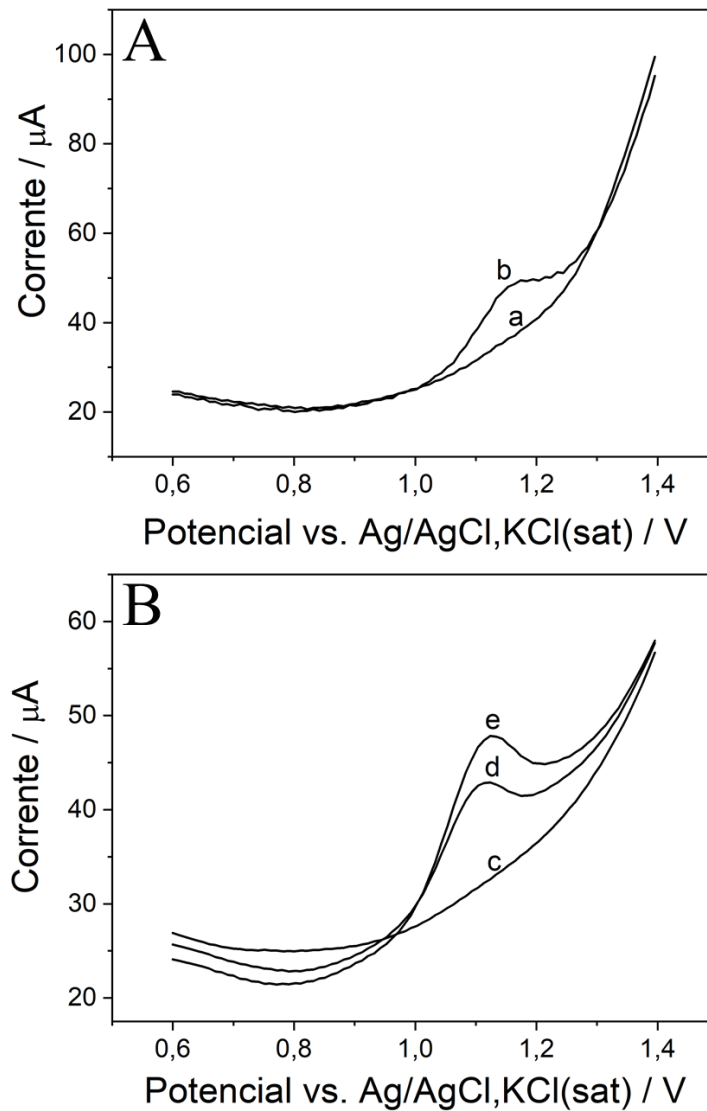
Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2020).

<sup>a</sup>1.80 mL min<sup>-1</sup> foi convertido para  $\mu\text{L s}^{-1}$ .

A partir da Tabela 1 nota-se que os três métodos foram precisos (RSD < 7,0 %) com detectabilidades na mesma ordem de concentração (submicromolar). Todavia, o método por SWV apresentou uma melhor sensibilidade, enquanto que FIA-AMP e BIA-AMP forneceram maiores faixa linear e frequência analítica, respectivamente. De maneira geral, as tendências observadas entre os sistemas BIA-AMP e FIA-AMP são bastante similares, no entanto, condições com melhores sensibilidades e detectabilidade (mesmo com menor volume de injeção) são alcançadas no sistema BIA-AMP, que pode estar relacionado a um transporte de massa mais eficiente (rápida injeção da amostra diretamente na superfície do eletrodo). Tendo em vista as particularidades de cada uma das metodologias, todas foram aplicadas para quantificação da CIP nas amostras de formulações farmacêuticas e leite.

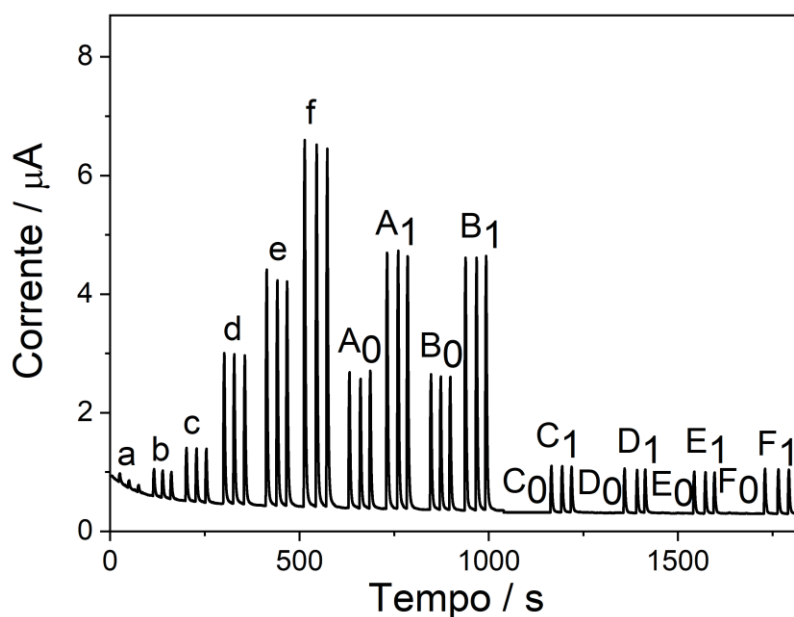
Nas Figuras 33, 34 e 35 estão representados os voltamogramas e amperogramas referentes às determinações de CIP nas amostras de formulações farmacêuticas e leite utilizando os métodos desenvolvidos.

Figura 33 – (A) Voltamogramas obtidos por SWV para determinação de CIP em amostra de leite, (a) leite desnatado, (b) leite desnatado fortificado ( $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ); e (B) em formulações farmacêuticas, (c) tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 6,0), (d) amostra de fármaco, (e) amostra de fármaco fortificada ( $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Condições instrumentais: amplitude 35 mV, frequência 40 Hz, incremento de potencial 10 mV, eletrodo de referência: Ag/AgCl,KCl(sat).



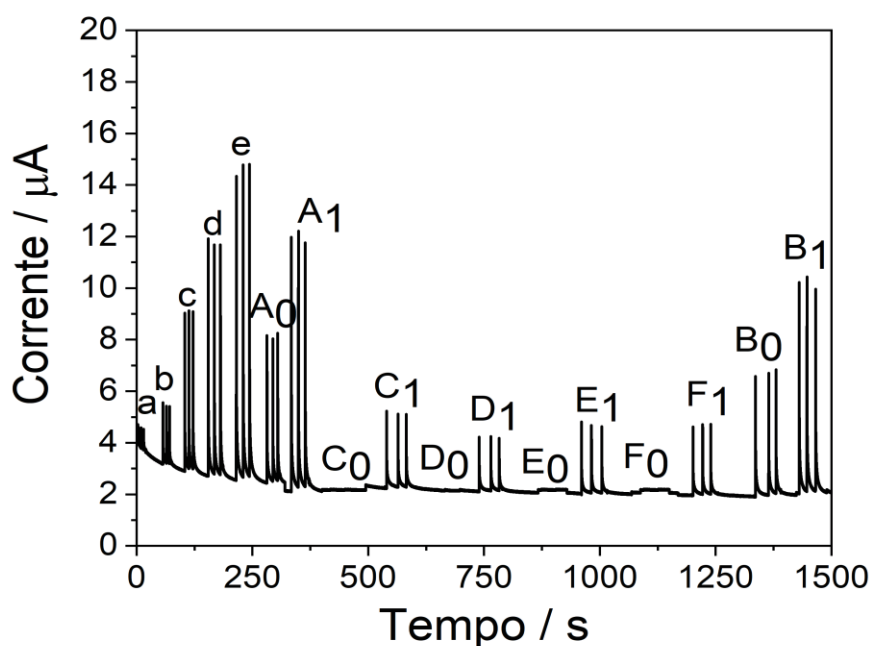
Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2020).

Figura 34 – Amperograma obtido pelo sistema FIA-AMP para determinação de CIP nas amostras de fármacos ( $A_0$  e  $B_0$ ), fármacos fortificados ( $A_1$ ,  $B_1$ ), leites desnatados ( $C_0$  e  $D_0$ ), leites desnatados fortificados ( $C_1$  e  $D_1$ ), leites integrais ( $E_0$  e  $F_0$ ), leites integrais fortificados ( $E_1$  e  $F_1$ ). Curva analítica: (a)  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ , (b)  $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ , (c)  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ , (d)  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ , (e)  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  e (f)  $75 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Condições instrumentais, potencial de análise: 1,1 V, alça de amostragem:  $150 \mu\text{L}$  e vazão do eletrólito suporte:  $1,8 \text{ mL min}^{-1}$ , eletrólito suporte: tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 6,0).



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2020).

Figura 35 – Amperograma obtido pelo sistema BIA-AMP para determinação de CIP nas amostras de fármacos ( $A_0$  e  $B_0$ ), fármacos fortificados ( $A_1$ ,  $B_1$ ), leites desnatados ( $C_0$  e  $D_0$ ), leites desnatados fortificados ( $C_1$  e  $D_1$ ), leites integrais ( $E_0$  e  $F_0$ ), leites integrais fortificados ( $E_1$  e  $F_1$ ). Curva analítica: (a)  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ , (b)  $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ , (c)  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ , (d)  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ , (e)  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  e (f)  $75 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Condições instrumentais, potencial de análise: 1,1 V, volume de injeção:  $40 \mu\text{L}$ , velocidade de injeção:  $220,8 \mu\text{L s}^{-1}$ , eletrólito suporte: tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 6,0)



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2020).

Primeiramente duas amostras de fármacos com teor de CIP (500 mg) foram analisadas. Estudos de adição e recuperação foram efetuados com uma concentração de CIP igual a  $25 \mu\text{mol L}^{-1}$  para avaliar a exatidão. Os excipientes presentes nas formulações farmacêuticas, celulose microcristalina, povidona, croscarmelose sódica, dióxido de silício, estearato de magnésio, copolímero de álcool polivinílico, polietilenoglicol, macrogol e dióxido de titânio, não foram eletroativos nas condições de análises estabelecidas para a CIP. A Tabela 2 mostra, os valores de recuperação, os teores obtidos e a comparação dos resultados com o HPLC.

Tabela 2 – Teores de CIP e percentuais de recuperação obtidos a partir das análises das amostras de fármacos por SWV, FIA-AMP, BIA-AMP e HPLC (n = 3).

Amostra	SWV		FIA-AMP		BIA-AMP		HPLC
	Massa (mg)	% recuperação	Massa (mg)	% recuperação	Massa (mg)	% recuperação	Massa (mg)
A	505 ± 34	102 ± 11	534 ± 6	113 ± 7	512 ± 29	89 ± 5	580 ± 25
B	496 ± 36	97 ± 12	528 ± 18	111 ± 3	497 ± 11	95 ± 2	464 ± 20

Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2020).  
 Valor fornecido pelos fabricantes: 500 mg.

De acordo com Tabela 2, verifica-se que os métodos desenvolvidos obtiveram percentuais de recuperações para CIP satisfatórios (89 a 113 %), demonstrando adequada exatidão das análises. Os teores de CIP determinados foram concordantes com valor fornecido nos rótulos dos medicamentos. Além disso, os resultados foram comparados com as análises por HPLC de forma simultânea utilizando a ANOVA fator único, onde à 95 % de confiança, não houve evidências de diferenças significativas entre os resultados, uma vez que o  $F_{\text{calculado}}$  (0,24) foi menor que o  $F_{\text{tabelado}}$  (6,59). Portanto, os métodos eletroanalíticos são atrativos para a determinação de CIP em amostras de fármacos, visto à confiabilidade dos resultados.

Em relação às análises de leite, conforme mostrado nas Figuras 33, 34 e 35, todas amostras analisadas ficaram com a concentração de CIP abaixo do LD. Com isso, para avaliar a aplicabilidade dos métodos utilizando o sensor a base de grafeno, as amostras foram intencionalmente contaminadas com concentração final de  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  de CIP na célula eletroquímica. Na Tabela 3 estão representados os percentuais de recuperação obtidos para cada uma das amostras avaliadas.

Tabela 3 – Valores de recuperação para CIP nas amostras de leite (n = 3).

Amostras	SWV (%) recuperação	FIA-AMP (%) recuperação	BIA-AMP (%) recuperação	HPLC (%) recuperação
C	$90 \pm 5$	$103 \pm 3$	$84 \pm 1$	$91 \pm 2$
D	$109 \pm 13$	$108 \pm 2$	$109 \pm 3$	$87 \pm 3$
E	$84 \pm 8$	$101 \pm 1$	$99 \pm 4$	$85 \pm 4$
F	$95 \pm 11$	$111 \pm 2$	$98 \pm 2$	$115 \pm 13$

Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2020).

C e D: leites desnatados, E e F: leites integrais.

Excelentes percentuais de recuperação da CIP (84 a 111 %) evidenciaram a exatidão das análises. Além disso, com 95 % de confiança, utilizando novamente a ANOVA fator único, não foi verificada diferenças significativas entre os resultados das análises eletroquímicas e o HPLC, uma vez que o  $F_{\text{calculado}}$  (1,04) foi inferior ao  $F_{\text{tabelado}}$  (3,49). Isto ressalta a confiabilidade dos resultados, e permite inferir que os constituintes das amostras de leite (gorduras, vitaminas, proteínas, entre outros) não influenciaram na

resposta eletroquímica da CIP sobre o GCE/rGO, após simples diluição das amostras de leite no eletrólito suporte.

Os três métodos desenvolvidos para CIP utilizando o sensor a base de grafeno foram comparados com outros métodos eletroanalíticos reportados na literatura, usando diferentes sensores e/ou técnicas (Tabela 4). Frente aos sensores de diamante dopado com boro e a maioria dos eletrodos modificados com nanotubos de carbono, uma melhor detectabilidade e um menor potencial de análise foram observados, mostrando um processo de transferência eletrônica facilitado sobre o GCE/rGO. Além disso, destaca-se as características portáteis dos sistemas FIA-AMP e BIA-AMP com elevada frequência analítica e aplicabilidade satisfatória em amostras de fármacos de leite.



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

Sensor	Método	Potencial vs Ag/AgCl,KCl(sat) / V	LD / $\mu\text{mol L}^{-1}$	Frequência analítica / a h <sup>-1</sup>	Amostras	Referências
PGE	SWV	1,05	5,6	60*	Fármacos	(ALVES <i>et al.</i> , 2021)
MWCNT/GCE	AMP	0,98	6,00	45*	Urina e soro	(FOTOUHI; ALAHYARI, 2010)
Nafion/MWCNT/BDD	DPV	1,40	0,005	35*	Água	(GAYEN; CHAPLIN, 2016)
BDD	DPV	1,20	2,46	30*	Urina	(GARBELLINI <i>et al.</i> , 2015)
BDD	BIA-AMP	1,20	0,30	80	Fármacos e leite	(MONTES <i>et al.</i> , 2014)
MWCNT/Grafite	BIA-AMP	1,20	5,90	90	n. m.	(SILVA <i>et al.</i> , 2019)
C-SPE	BIA-AMP	1,20	0,10	130	Fármacos	(STEFANO <i>et al.</i> , 2016)
MWCNT/V <sub>2</sub> O <sub>5</sub> /quitosana	EIS	-	0,0015	12	Leite	(HU <i>et al.</i> , 2018)
GCE/rGO	SWV	1,10	0,21	50	Fármacos e leite	Este trabalho
	FIA-AMP	1,10	0,28	110		
	BIA-AMP	1,10	0,10	180		

Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2020).

MWCNT: nanotubos de carbono de múltiplas camadas, PGE: pencil grafite electrode BDD: diamante dopado com boro, rGO: óxido de grafeno reduzido, GCE: eletrodo de carbono vítreo, AMP: detecção amperométrica, DPV: voltametria de pulso diferencial, SWV: voltametria de onda quadrada, EIS: espectroscopia de impedância eletroquímica, FIA-AMP: análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica, BIA-AMP: análise por injeção em batelada com detecção amperométrica C-SPE: eletrodo impresso de carbono; n.m: não mencionado; \*frequência analítica estimada pelo discente.

#### 4.2.6 Conclusões parciais

Experimentos por CV mostraram que dentre os sensores avaliados para a determinação de CIP, o mais adequado foi o GCE/rGO, onde ocorreu ganho de sinal analítico considerável (5 vezes) e antecipação do potencial de oxidação em 100 mV frente ao GCE. Estudos com as nanopartículas metálicas necessitam de uma melhor investigação no processo de modificação, visto que a partir das medidas eletroquímicas realizadas, provavelmente houve a dessorção destas para a solução. O transporte de massa da CIP sobre o GCE/rGO foi caracterizado por adsorção, enquanto que no GCE foi verificado um efeito difusional. Esta modificação do transporte de massa e os supostos efeitos eletrocatalíticos, podem ser responsáveis pelo aumento do sinal analítico em comparação ao GCE. Um mecanismo de oxidação da CIP foi proposto, com dois elétrons e dois prótons envolvidos na reação.

Os métodos (SWV, FIA-AMP, BIA-AMP) apresentaram boa detectabilidade ( $LD < 0,28 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), precisão ( $RSD < 7,0 \%$ ) e frequência analítica superior a 50 análises por hora. Estes foram aplicados satisfatoriamente em amostras de fármacos e leite com percentuais de recuperação na faixa de 84 a 113 %, e valores concordantes com o HPLC, o que demonstrou a confiabilidade das análises. Desta forma, mais especificamente os métodos BIA-AMP e FIA-AMP (em razão das maiores frequências analíticas e características portáteis) são promissores para análises de rotina envolvendo o controle de qualidade de formulações farmacêuticas. Em contrapartida, devido à SWV proporcionar uma melhor seletividade frente a AMP, esta se mostra mais adequada para avaliar resíduos de CIP em amostras de leite.

#### 4.2.7 Publicações

Os métodos desenvolvidos para determinação de CIP em amostras de formulações farmacêuticas e leite usando GCE/rGO foram publicados em periódicos reconhecidos internacionalmente.

Lucas V. Faria, Jian F. S. Pereira, Gustavo C. Azevedo, Maria A. C. Matos, Rodrigo A. A. Muñoz, Renato C. Matos, 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, n. 9, 1947-1954, 2019.

Lucas V. Faria, Thalles P. Lisboa, Guilherme F. Alves, Davi M. Farias, Maria A. C. Matos, Rodrigo A.A. Muñoz, Renato C. Matos, Electrochemical Study of Different Sensors for Simple and fast Quantification of Ciprofloxacin in Pharmaceutical Formulations and Bovine Milk, **Electroanalysis**, v. 32, n. 10, 2266-2272, 2020.

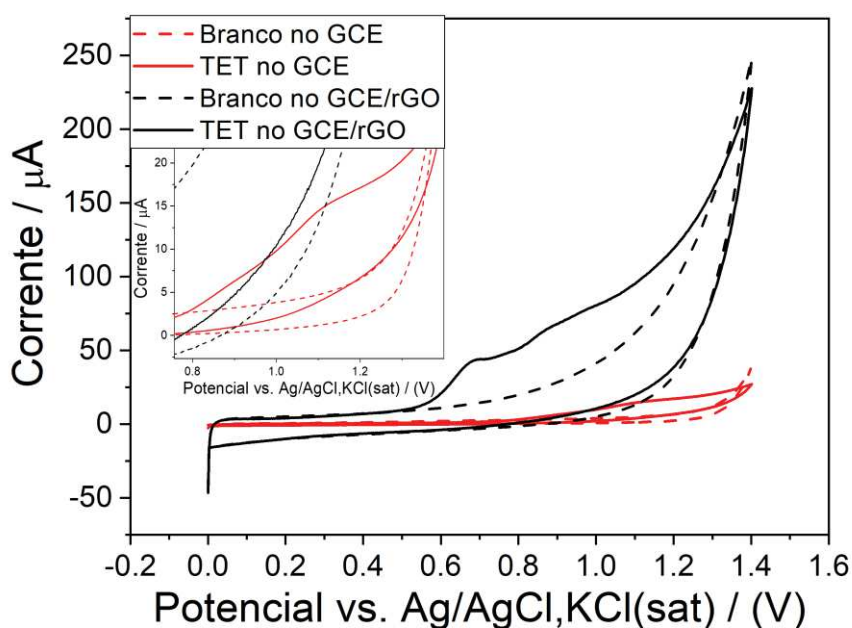
Lucas V. Faria, Davi M. Farias, Thalles P. Lisboa, Maria A. C. Matos, Rodrigo A. A. Muñoz, Renato C. Matos, Batch injection analysis with amperometric detection for fluoroquinolone determination in urine, pharmaceutical formulations, and milk samples using a reduced graphene oxide–modified glassy carbon electrode, **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, volume especial (Promising Early-Career (Bio)Analytical Researchers), 2021, doi: 10.1007/s00216-021-03342-3.

### 4.3 ESTUDOS ELETROQUÍMICOS COM A TETRACICLINA

#### 4.3.1 Investigação do comportamento eletroquímico da tetraciclina por CV

Voltamogramas cíclicos foram realizados na ausência e presença de  $300 \mu\text{mol L}^{-1}$  de TET, em meio de tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 10,0), na faixa de 0,0 a 1,4 V usando apenas o GCE e GCE/rGO, tendo em vista que conforme discutido anteriormente, o processo de modificação do rGO com as nanopartículas não foi eficiente. Este estudo foi efetuado de modo a investigar a necessidade da modificação da superfície do GCE com rGO. Na Figura 36 estão representados ambos os voltamogramas cíclicos.

Figura 36 – Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando GCE (vermelho) e GCE/rGO (preto) na ausência e presença de TET ( $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em meio de tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 10,0) com velocidade de varredura de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ .



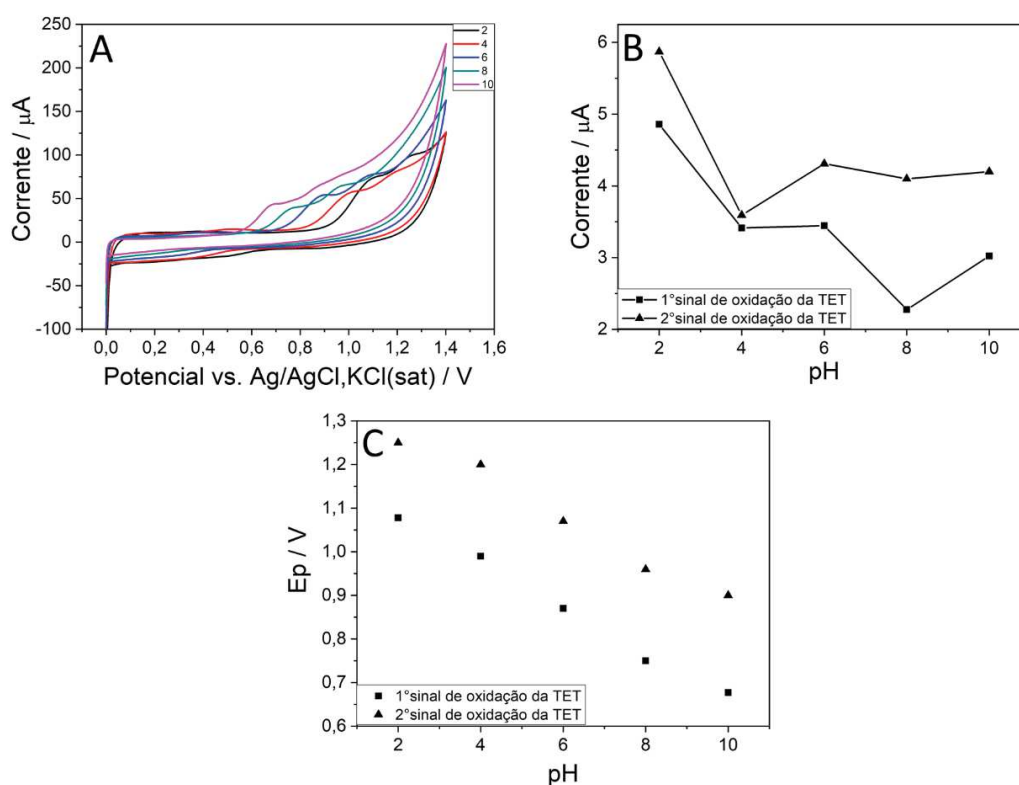
Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2019).

Sobre o GCE, dois processos de oxidações irreversíveis (0,92 e 1,10 V) com baixa intensidade de corrente foram verificados (destacados na ampliação inserida na Figura 36). Após a modificação com rGO, dois processos de oxidação irreversível (0,68 e 0,92 V) com ganho de sinal analítico de sete e três vezes, respectivamente, frente ao GCE foram observados. Além do incremento no sinal, houve também a antecipação dos

potenciais de oxidação da TET, mostrando que o rGO facilitou a transferência eletrônica, em virtude das prováveis características electrocatalíticas. Diante destas observações, o GCE/rGO foi selecionado para os demais estudos eletroquímicos envolvendo a TET.

Valores de pH na faixa de 2,0 a 10,0 foram selecionados para otimizar o pH do eletrólito suporte tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ ), visando a melhor condição para a resposta eletroquímica da TET. A Figura 37 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos e as relações do  $E_p$  e corrente de pico de ambos os processos de oxidação da TET com o pH do meio.

Figura 37 – (A) Voltamogramas cíclicos de uma solução de TET ( $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em meio de tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ ) com valores de pH iguais a 2,0 (preto); 4,0 (vermelho); 6,0 (azul); 8,0 (verde); 10,0 (rosa); (B) relação entre a corrente e o pH e (C) relação entre o  $E_p$  e o pH, com velocidade de varredura de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ .



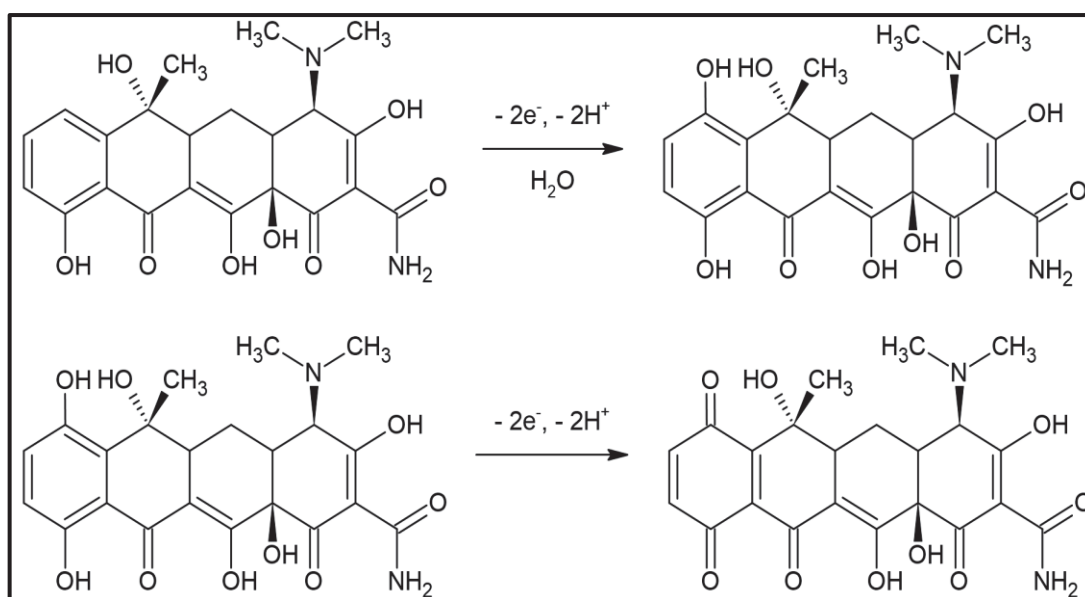
Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2019).

Neste estudo verificou-se que semelhantemente ao ocorrido com a CIP, o comportamento eletroquímico da TET também foi dependente do pH do meio. Ocorreu uma antecipação dos potenciais de ambos os processos de oxidação para regiões mais

próximas de 0,0 V; a medida que o meio foi se tornando alcalino, indicando uma maior facilidade da oxidação da TET em condições básicas (Figura 37A). Sinais analíticos com maiores intensidades foram alcançados utilizando o pH igual a 2,0; contudo, neste meio foram necessários elevados potenciais para promover a oxidação da TET. Com isso, no intuito de proporcionar uma melhor seletividade às medidas amperométricas, o pH 10,0 foi escolhido.

Os coeficientes angulares obtidos através das relações lineares entre o  $E_p$  e pH (Figura 37C) foram de  $-52$  e  $-48$   $\text{mV pH}^{-1}$ , os quais são relativamente próximos do valor teórico ( $-59$   $\text{mV pH}^{-1}$ ). Portanto, há evidências de que em ambas etapas de oxidação da TET, o número de prótons e elétrons são iguais. Segundo Kushikawa e colaboradores, nos dois processos de oxidação da TET estão envolvidos dois prótons e dois elétrons, como indicado na Figura 38 (KUSHIKAWA *et al.*, 2016).

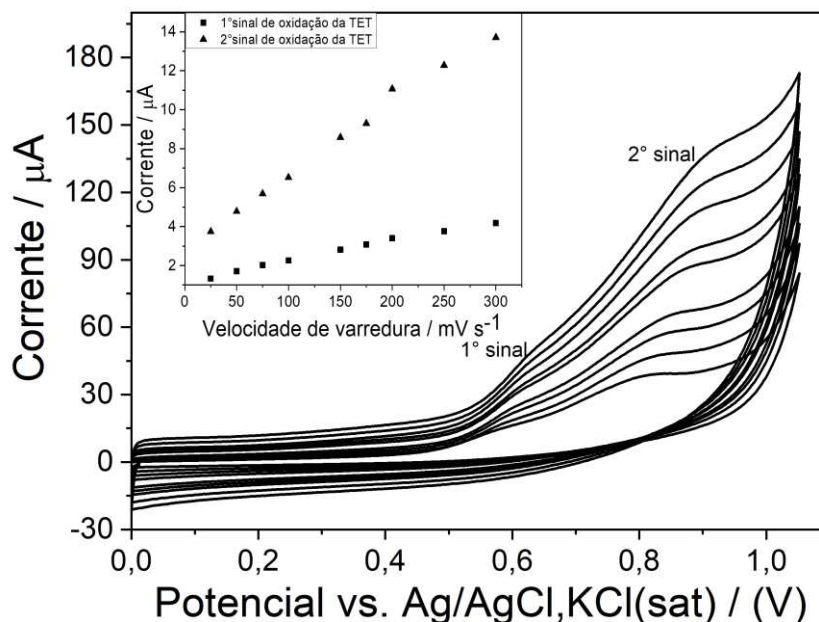
Figura 38 – Reações dos processos envolvendo a oxidação eletroquímica da TET



Fonte: Adaptado de (KUSHIKAWA *et al.*, 2016).

A investigação do transporte de massa da TET sobre a superfície do GCE e GCE/rGO, foi efetuada com velocidades de varredura no intervalo de 25 a 300  $\text{mV s}^{-1}$ , na presença de TET ( $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e eletrólito suporte tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , pH = 10,0). A Figura 39 representa os voltamogramas cíclicos realizados usando o GCE/rGO.

Figura 39 – Voltamogramas cíclicos de uma solução de TET ( $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em meio de tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 10,0) com velocidades de varreduras, (a) 25, (b) 50, (c) 75, (d) 100, (e) 150 e (f)  $200 \text{ mV s}^{-1}$  usando o GCE/rGO. O gráfico inserido em (A) representa o ajuste linear entre a corrente e a velocidade de varredura.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2019).

Foi evidenciado um transporte de massa caracterizado pela adsorção das espécies de TET sobre o GCE/rGO nas duas etapas de oxidação, visto que ajustes lineares entre as correntes de oxidação e a velocidade de varredura ( $R^2 > 0,99$ ) foram obtidos. Comportamento semelhante foi observado sobre o GCE (não mostrado) e em SPCE (HAYATI *et al.*, 2016).

#### 4.3.2 Avaliação da tetraciclina por FIA-AMP

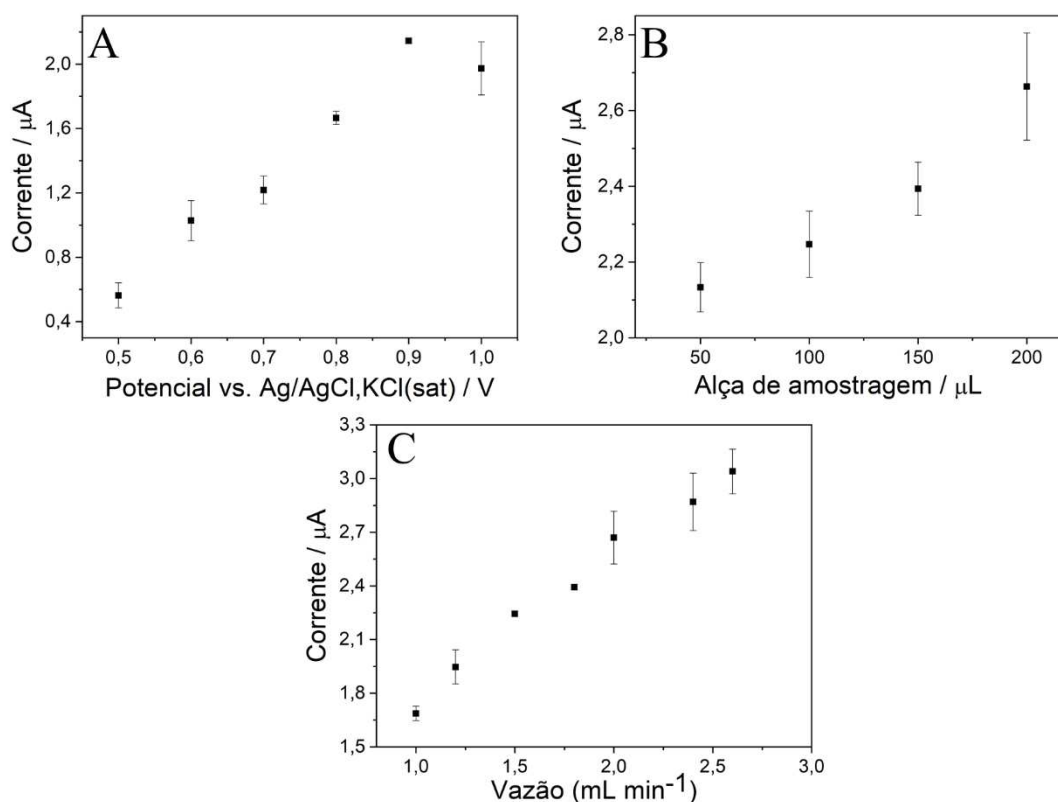
Em busca de uma metodologia simples e rápida para análises de rotina envolvendo a TET, o sistema FIA-AMP foi inicialmente avaliado. As otimizações dos parâmetros, potencial de análise, volume da alça de amostragem e vazão do eletrólito suporte foram realizadas usando uma solução de TET ( $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), com medidas eletroquímicas em triplicata ( $n = 3$ ). Na Figura 40 estão representados os resultados obtidos durante os estudos de cada um dos parâmetros.

O primeiro parâmetro avaliado foi o potencial de análise (Figura 40A), onde foi observado incremento de sinal analítico significativo sem perda de precisão até 0,9 V. Sob este potencial, certamente os dois processos de oxidação da TET ocorreram, visto os estudos preliminares por CV. Desta forma, 0,9 V foi fixado para as demais etapas de otimização.

Volumes de 50 a 200  $\mu\text{L}$  foram selecionados para a otimização da alça de amostragem (Figura 40B). As respostas analíticas aumentaram consideravelmente até 200  $\mu\text{L}$ , contudo, com esta condição houve uma maior variação entre as medidas (perda de precisão), por este motivo, 150  $\mu\text{L}$  foi a condição selecionada. As vazões do eletrólito suporte foram variadas de 1,0 a 2,6  $\text{mL min}^{-1}$  (Figura 40C). À medida que a vazão aumentava, um ganho no sinal analítico foi observado, em consequência de uma menor dispersão do analito no percurso analítico (25 cm). A vazão de 1,8  $\text{mL min}^{-1}$  foi escolhida, uma vez que após 2,0  $\text{mL min}^{-1}$  ocorreu perda de precisão nas medidas e o consumo de eletrólito aumentou em até 50 % para um ganho de sinal analítico de 25 % com relação a vazão selecionada, o que justificou a escolha em termos de custo-benefício.



Figura 40 – (A) Otimização do potencial de análise da TET por amperometria na faixa de 0,5 a 1,0 V; alça de amostragem: 50  $\mu\text{L}$  e vazão do eletrólito suporte: 1,5  $\text{mL min}^{-1}$ , (B) Otimização do volume da alça de amostragem no intervalo de 50 a 200  $\mu\text{L}$ ; potencial: 0,9 V e vazão do eletrólito suporte: 1,5  $\text{mL min}^{-1}$ ; (C) Otimização da vazão do eletrólito suporte na faixa de 1,0 a 2,6  $\text{mL min}^{-1}$ ; potencial: 0,9 V e alça de amostragem de 150  $\mu\text{L}$ . Concentração de TET igual a 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e eletrólito suporte, tampão BR (0,04  $\text{mol L}^{-1}$ , pH 10,0).

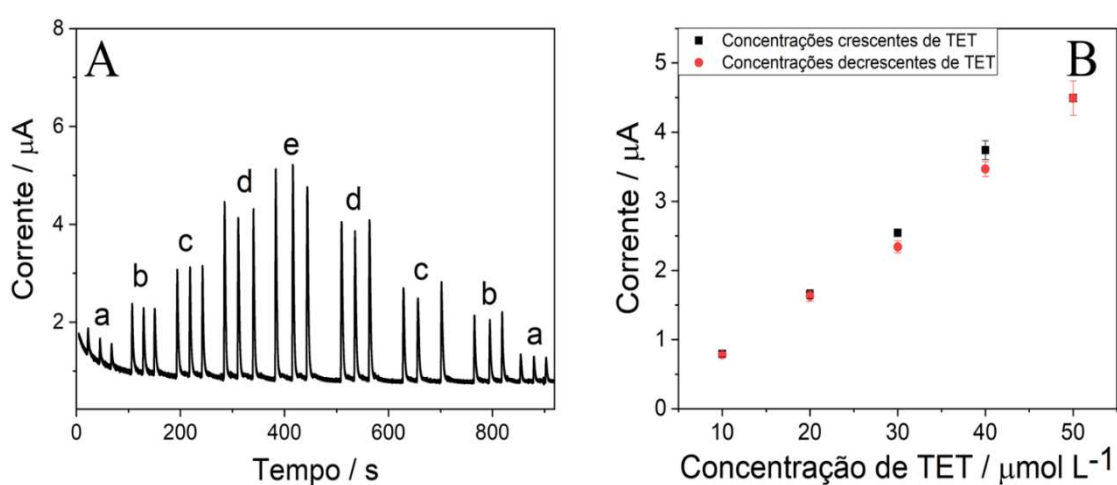


Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2020).

Curvas analíticas com concentrações de TET crescentes e decrescentes foram construídas na faixa de 10 a 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  sob as condições otimizadas, para avaliação do efeito de memória após sucessivas adições do padrão de TET (Figura 41A). As curvas com concentrações crescentes (a-e), ( $I_p = -0,123 + 0,090 [\text{TET} / \mu\text{mol L}^{-1}]$ ,  $R^2 = 0,995$ ) e decrescentes (e-a) ( $I_p = -0,073 + 0,088 [\text{TET}] / \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $R^2 = 0,993$ ), apresentaram adequadas linearidades com sensibilidades semelhantes, evidenciando que não ocorreu efeito de memória neste intervalo de concentração investigado, como mostrado na Figura 41B. Em experimentos posteriores foi observado um comportamento linear mais amplo,

de 10 a 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  ( $R^2 = 0,993$ ). Os valores de LD e LQ foram calculados em 1,06 e 3,53  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente.

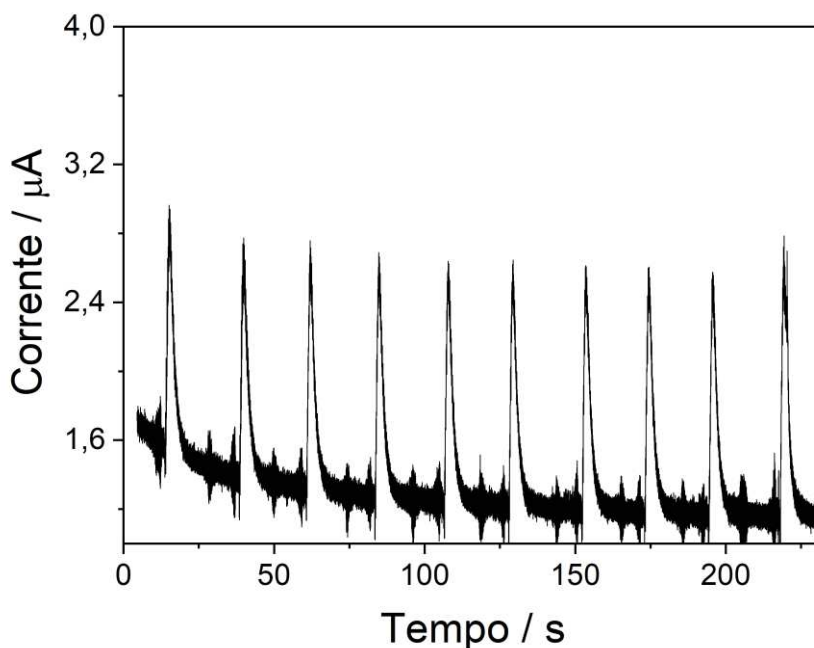
Figura 41 – (A) Amperograma obtido pelo sistema FIA-AMP usando GCE/rGO com concentrações crescentes e decrescentes de TET, (a) 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (b) 20  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (c) 30  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (d) 40  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (e) 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; (B) Respectivas curvas analíticas plotadas. Condições de análise, potencial de análise: 0,9 V, alça de amostragem: 150  $\mu\text{L}$  e vazão do eletrólito suporte: 1,8  $\text{mL min}^{-1}$ , eletrólito suporte: tampão BR (0,04  $\text{mol L}^{-1}$ , pH 10,0).



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2020).

Em seguida, foi efetuado um estudo de repetibilidade ( $n = 10$ ) utilizando uma concentração de TET de 25  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , sendo obtido um RSD igual a 2,9 %, mostrando que não houve contaminação do eletrodo e que as medidas eletroquímicas exibiram boa precisão (Figura 42). A frequência analítica deste método foi estimada em aproximadamente 103 análises por hora.

Figura 42 – Estudo de repetibilidade (n = 10) utilizando uma concentração de TET de  $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Condições instrumentais, potencial de análise: 0,9 V, alça de amostragem:  $150 \mu\text{L}$  e vazão do eletrólito suporte:  $1,8 \text{ mL min}^{-1}$ , eletrólito suporte: tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 10,0).



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2020).

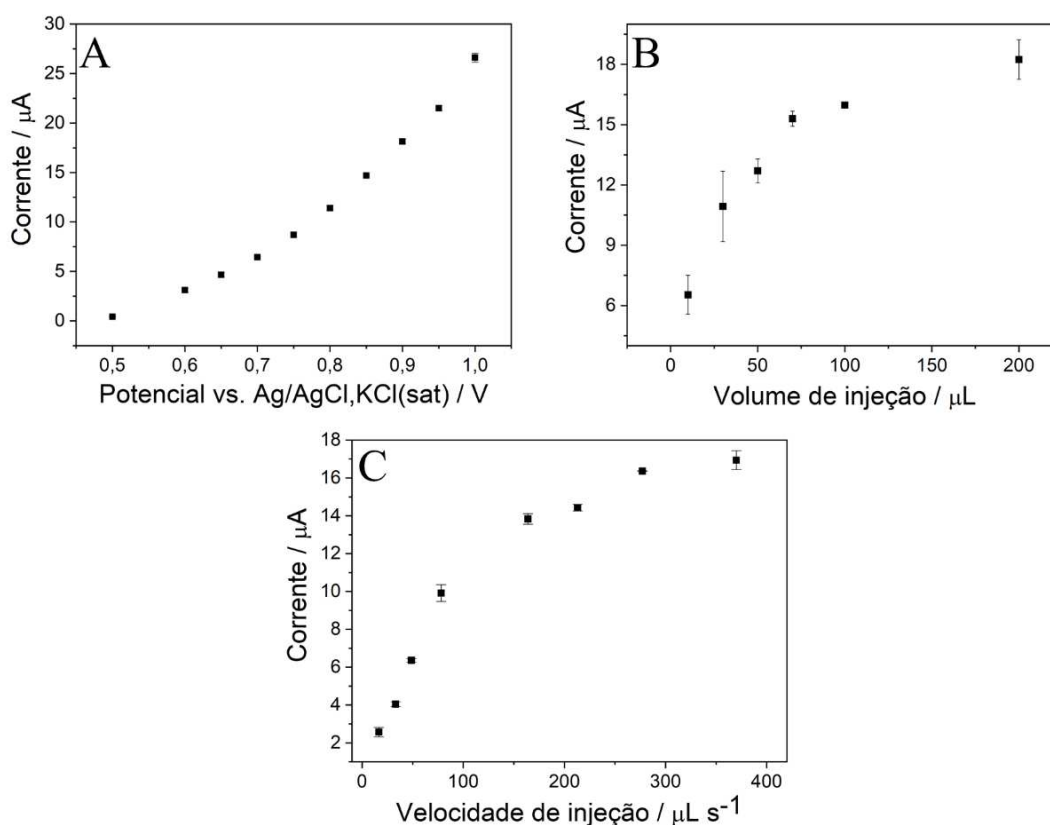
#### 4.3.3 Avaliação da tetraciclina por BIA-AMP

Um método por BIA-AMP foi investigado a fim de novamente realizar um estudo comparativo com FIA-AMP, em termos das características analíticas obtidas. Diante disto, fez-se necessário um estudo prévio dos parâmetros relacionados ao sistema de análise. As influências do potencial de análise, volume e velocidade de injeção foram avaliadas para a determinação rápida, simples e sensível de TET. Estes estudos foram realizados com medidas em triplicata (n = 3) utilizando uma concentração de TET de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  (Figura 43).

Em toda faixa de potencial estudada (0,5 a 1,0 V), conforme apresentado na Figura 43A, ocorreu um aumento do sinal analítico. Em potenciais a partir de 0,85 V foi observado um incremento mais abrupto de corrente por causa da contribuição do segundo processo de oxidação da TET. Apesar de 1,0 V promover uma maior intensidade de sinal, 0,9 V foi novamente selecionado com a finalidade de minimizar possíveis interferências

ao aplicar o método nas amostras (principalmente em leite). Volumes de 10 a 200  $\mu\text{L}$  foram estudados para otimização do volume de injeção. A Figura 43B mostra um aumento de sinal analítico considerável de 10 a 100  $\mu\text{L}$ . Após 100  $\mu\text{L}$ , o sinal tendeu a estabilidade provavelmente devido à saturação dos sítios eletroativos do GCE/rGO. Por esta razão, o volume de injeção de 100  $\mu\text{L}$  foi fixado para avaliar a velocidade de injeção, onde investigou-se velocidades de 16,5 a 370  $\mu\text{L s}^{-1}$ . Através da Figura 43C, nota-se acréscimo do sinal analítico sem perda de precisão até 277  $\mu\text{L s}^{-1}$ , sendo esta a condição otimizada.

Figura 43 – (A) Otimização do potencial de análise para TET pelo sistema BIA-AMP usando GCE/rGO na faixa de 0,5 a 1,0 V; (B) Otimização do volume de injeção no intervalo de 10 a 100  $\mu\text{L}$ ; (C) Otimização da velocidade de injeção na faixa de 16,5 a 370  $\mu\text{L s}^{-1}$ . Concentração de TET: 25  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , eletrólito suporte: tampão BR (0,04 mol  $\text{L}^{-1}$ , pH 10,0) e eletrodo de referência: Ag/AgCl,KCl(sat).

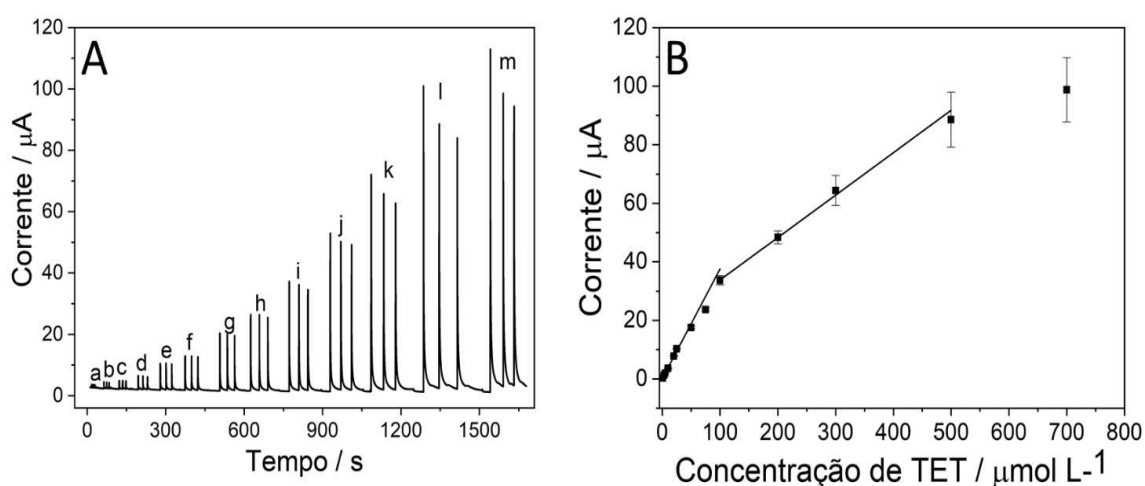


Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2020).

Curva analíticas com concentrações de TET na faixa de 1 a 700  $\mu\text{mol L}^{-1}$  foram construídas para avaliar a linearidade do método BIA-AMP (Figura 44A). Duas faixas

lineares foram obtidas, a primeira com maior sensibilidade de 10 a 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  ( $I_p = 0,149 + 0,374 [\text{TET}] / \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $R^2 = 0,992$ ) e a segunda de 100 a 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$  ( $I_p = 19,32 + 0,145 [\text{TET}] / \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $R^2 = 0,998$ ), como mostrado na Figura 44B. A perda de linearidade após 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$  está associada ao elevado efeito adsortivo da TET e/ou seus produtos de oxidação (conforme mostrado anteriormente na Figura 38) sobre os sítios ativos da superfície do GCE/rGO. Diante disto, o uso de agitação e/ou aplicação de um potencial adicional para limpeza da superfície do eletrodo poderia ampliar ainda mais a faixa linear, no entanto, para as aplicações propostas, os intervalos de concentrações lineares estabelecidos foram suficientes. Os valores de LD e LQ foram calculados em 0,035 e 0,116  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. Nota-se que o LD (correspondente a 0,015 mg  $\text{L}^{-1}$ ) foi inferior ao LMR (0,1 mg  $\text{L}^{-1}$ ) estabelecido pela legislação.

Figura 44 – (A) Amperograma obtido pelo sistema BIA-AMP usando GCE/rGO com concentrações de TET, (a) 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (b) 3  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (c) 5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (d) 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (e) 20  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (f) 25  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (g) 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (h) 75  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (i) 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (j) 200  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (k) 300  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (l) 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , (m) 700  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; (B) Respectivas curvas analíticas plotadas. Condições instrumentais, potencial de análise: 0,9 V, volume de injeção: 100  $\mu\text{L}$ , velocidade de injeção: 277  $\mu\text{L s}^{-1}$ , eletrólito suporte: tampão BR (0,04 mol  $\text{L}^{-1}$ , pH 10,0) e eletrodo de referência: Ag/AgCl, KCl(sat).

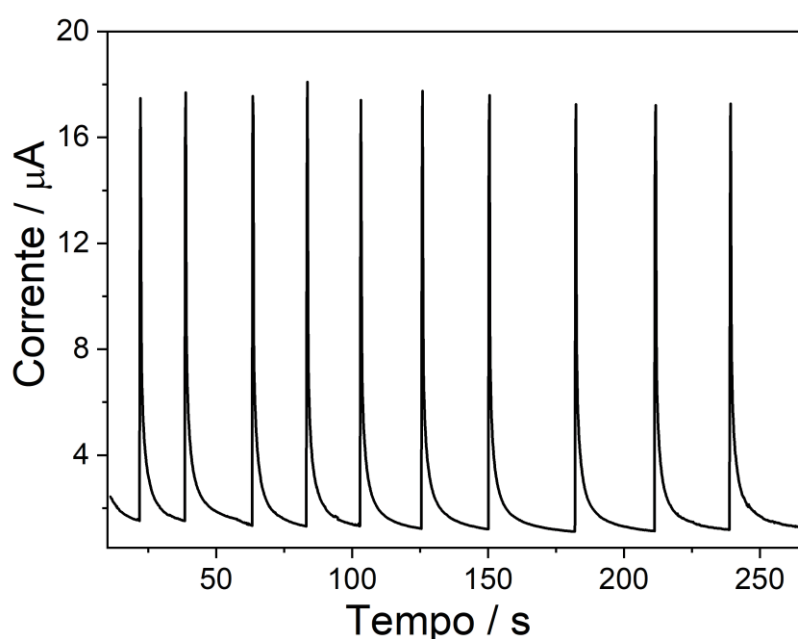


Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2020).

Um estudo de repetibilidade foi realizado através de injeções sucessivas ( $n = 10$ ) de uma solução de TET 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (Figura 45), o que resultou em um RSD de 1,6 %, indicando ausência de contaminação do eletrodo (em baixas concentrações) e adequada

precisão das medidas. Uma frequência analítica de aproximadamente 103 análises por hora foi obtida.

Figura 45 – Estudo de repetibilidade ( $n = 10$ ) do sistema de análise BIA-AMP utilizando uma concentração de TET de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Condições instrumentais, potencial de análise: 1,1 V, volume de injeção:  $100 \mu\text{L}$ , velocidade de injeção:  $277 \mu\text{L s}^{-1}$ , eletrólito suporte: tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 10,0) e eletrodo de referência: Ag/AgCl, KCl(sat).



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2020).

Considerando a adição inicial de 50 mL de eletrólito suporte, a célula BIA permitiu a adição de 350 injeções de  $100 \mu\text{L}$ . Após isso, a solução interna precisou ser substituída. Entretanto, mesmo após essa troca de solução, o eletrodo modificado apresentou respostas estáveis com baixa variação de corrente para a TET ( $< 8\%$ ). Todavia, no início de cada dia, uma nova modificação da superfície do GCE foi necessária.

#### 4.3.4 Aplicação dos métodos FIA-AMP e BIA-AMP para determinação de tetraciclina em amostras de formulações farmacêuticas e leite

Primeiramente foi realizado um estudo comparativo das características analíticas das metodologias desenvolvidas para determinação de TET, conforme descrito na Tabela 5.

Tabela 5 – Comparação das figuras de mérito de ambos métodos desenvolvidos para a determinação da TET.

Figuras de mérito	FIA-AMP	BIA-AMP
Faixa linear ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	10-100	1-100 e 100-500
LD ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	1,06	0,035
Sensibilidade ( $\mu\text{A L } \mu\text{mol}^{-1}$ )	0,073	0,374
Frequência analítica ( $\text{h}^{-1}$ )	103	103
Velocidade de injeção ( $\mu\text{L s}^{-1}$ )	30 <sup>a</sup>	277
Volume de injeção ( $\mu\text{L}$ )	150	100
RSD (n = 10) (%)	2,9	1,6

Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2020).

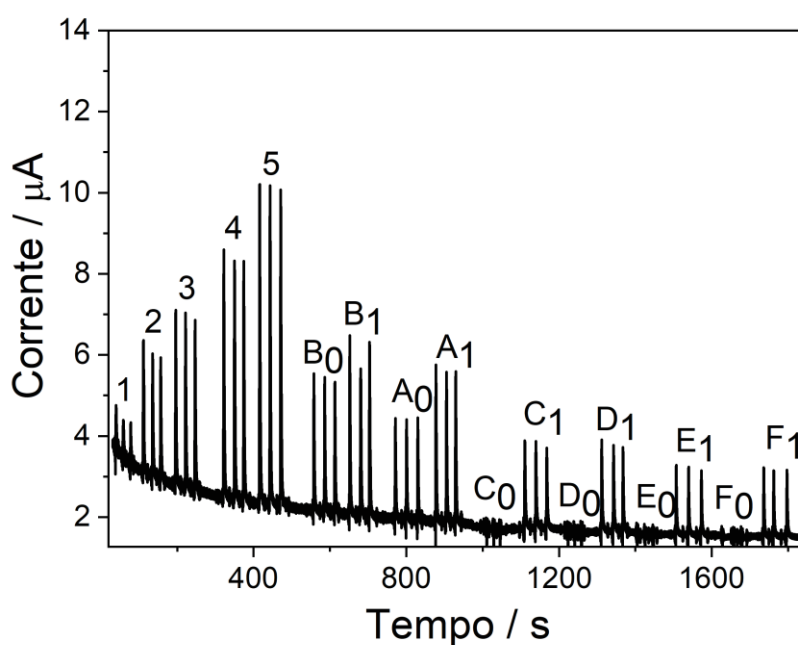
<sup>a</sup>1.80 mL min<sup>-1</sup> foi convertido para  $\mu\text{L s}^{-1}$ .

A partir da Tabela 5 verifica-se que o sistema BIA-AMP apresentou maior sensibilidade e menor LD, o qual foi inferior ao LMR de TET em leite estabelecido pela legislação. Isso pode ser explicado pela velocidade de injeção extremamente elevada (9 vezes) alcançado no sistema BIA-AMP quando comparado ao sistema FIA-AMP. Estas observações são condizentes ao verificado para a CIP e com outros estudos reportados na literatura científica que compararam os sistemas de análise FIA e BIA com detecção amperométrica (FERREIRA *et al.*, 2012; STEFANO *et al.*, 2016). Ambos os métodos necessitaram de pequenos volumes de amostras (< 150  $\mu\text{L}$ ), apresentaram ótima precisão (RSD < 2,9 %) com elevada frequência analítica (103 injeções por hora), o que os tornam atrativos para análises de rotina. Uma característica relevante observada para o GCE/rGO, foi sua estabilidade após um dia intenso na presença do padrão de TET em ambos sistemas de análise.

As Figuras 46 e 47 mostram os amperogramas relacionados às determinações de TET nas amostras de formulações farmacêuticas e de leite pelos métodos FIA-AMP e

BIA-AMP, respectivamente, usando o GCE/rGO (curvas analíticas e injeções das amostras).

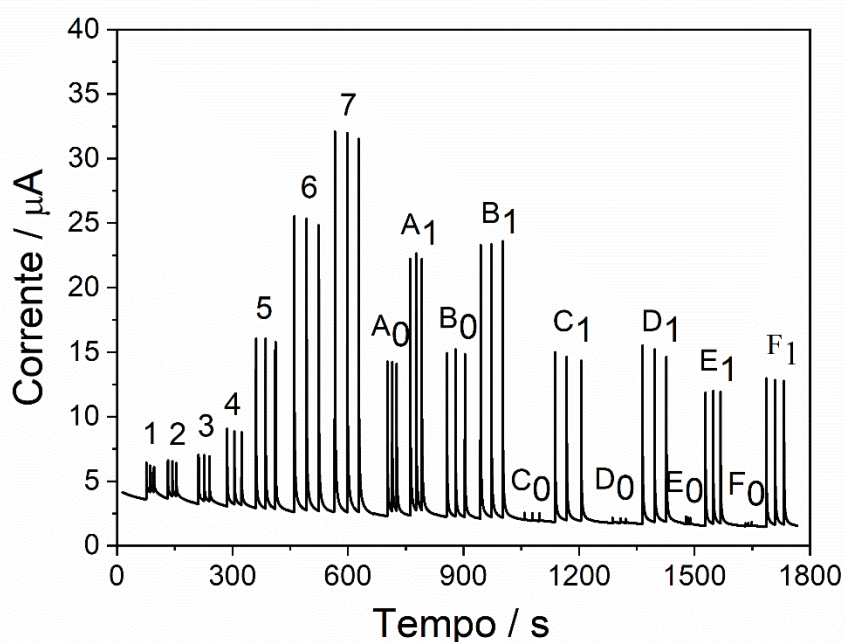
Figura 46 – Amperograma obtido pelo sistema FIA-AMP para determinação de TET nas amostras de fármacos ( $A_0$  e  $B_0$ ), fármacos fortificados ( $A_1$ ,  $B_1$ ), leites desnatados ( $C_0$  e  $D_0$ ), leites desnatados fortificados ( $C_1$  e  $D_1$ ), leites integrais ( $E_0$  e  $F_0$ ), leites integrais fortificados ( $E_1$  e  $F_1$ ), curva analítica (1)  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ , (2)  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ , (3)  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ , (4)  $75 \mu\text{mol L}^{-1}$  and (5)  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Condições instrumentais, potencial de análise:  $0,9 \text{ V}$ , alça de amostragem:  $150 \mu\text{L}$  e vazão do eletrólito suporte:  $1,8 \text{ mL min}^{-1}$ , eletrólito suporte: tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 10,0).



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2020).



Figura 47 – Amperograma obtido pelo sistema BIA-AMP para determinação de TET nas amostras de fármacos ( $A_0$  e  $B_0$ ), fármacos fortificados ( $A_1$ ,  $B_1$ ), leites desnatados ( $C_0$  e  $D_0$ ), leites desnatados fortificados ( $C_1$  e  $D_1$ ), leites integrais ( $E_0$  e  $F_0$ ), leites integrais fortificados ( $E_1$  e  $F_1$ ), curva analítica (1)  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ , (2)  $3 \mu\text{mol L}^{-1}$ , (3)  $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ , (4)  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ , (5)  $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ , (6)  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  and (7)  $75 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Condições instrumentais, potencial de análise:  $0,9 \text{ V}$ , volume de injeção:  $100 \mu\text{L}$  e velocidade de injeção:  $277 \mu\text{L s}^{-1}$ , eletrólito suporte: tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 10,0).



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2020).

Os métodos foram aplicados inicialmente para a determinação de TET em duas amostras farmacêuticas com teor nominal de  $500 \text{ mg}$ . Estudos de adição e recuperação foram realizados utilizando concentrações de TET iguais a  $15$  e  $25 \mu\text{mol L}^{-1}$  com o FIA-AMP e BIA-AMP, respectivamente, para avaliar a exatidão das análises. Os excipientes presentes nas amostras de formulações farmacêuticas analisadas, estearato de magnésio, laurilsulfato de sódio, crospovidona e talco, não foram eletroativos nas condições de análise para TET. Na Tabela 6 estão descritas as massas obtidas pelos métodos desenvolvidos e por cromatografia líquida ultra rápida (UFLC, do inglês *Ultra Fast Liquid Chromatography*), bem como os percentuais de recuperação.

Tabela 6 – Resultados referentes à determinação de TET nas amostras farmacêuticas por BIA-AMP, FIA-AMP e UFLC (n = 3).

Amostras	FIA-AMP		BIA-AMP		UFLC
	Massa (mg)	(%) recuperação	Massa (mg)	(%) recuperação	Massa (mg)
A	494 ± 11	117 ± 4	505 ± 14	85 ± 2	490 ± 13
B	534 ± 19	101 ± 4	553 ± 9	89 ± 3	530 ± 19

Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2020).

Valor fornecido pelos fabricantes: 500 mg.

Níveis de recuperação na faixa de 85 a 117 % demonstraram uma adequada exatidão das análises eletroquímicas em formulações farmacêuticas. Além disso, a ANOVA fator único foi novamente empregada para a comparação dos resultados de forma simultânea. Com nível de confiança de 95%, verificou-se que o valor de  $F_{\text{calculado}}$  (0,20) foi menor que o  $F_{\text{tabelado}}$  (9,55), portanto não há evidências de diferenças significativas entre os resultados obtidos por BIA-AMP e FIA-AMP frente ao UFLC. Estes resultados demonstram que as duas metodologias eletroanalíticas são confiáveis e excelentes alternativas para o monitoramento do princípio ativo (TET) em fármacos, de forma rápida e com baixo custo.

Todas as amostras de leite analisadas estavam com as concentrações de TET abaixo do LD de ambos os métodos. Desta forma, as amostras de leites integral e desnatado foram intencionalmente contaminadas com uma concentração final de 25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de TET na célula eletroquímica, para verificar a aplicabilidade do sensor a base de grafeno associado as medidas por BIA-AMP e FIA-AMP na determinação TET, após simples diluição das amostras. Os resultados obtidos para a análise das amostras de leite são mostrados na Tabela 7.

Tabela 7 – Percentuais de recuperação para TET nas amostras de leite (n = 3).

Amostras	FIA-AMP			BIA-AMP	
	Adicionado ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Determinado ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	(%) recuperação	Determinado ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	(%) recuperação
C	25,0	25,6 $\pm$ 1,4	102 $\pm$ 5	27,8 $\pm$ 1,0	111 $\pm$ 4
D	25,0	26,8 $\pm$ 1,9	107 $\pm$ 8	21,4 $\pm$ 1,6	85 $\pm$ 1
E	25,0	21,6 $\pm$ 0,6	86 $\pm$ 3	26,4 $\pm$ 1,4	106 $\pm$ 5
F	25,0	21,0 $\pm$ 0,9	84 $\pm$ 3	24,0 $\pm$ 0,6	96 $\pm$ 2

Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2020).  
C e D: leites desnatados, E e F: leites integrais.

Em razão da pandemia de Sars-CoV-2 e a consequente suspensão das atividades laboratoriais, não houve tempo hábil para a avaliação de TET nas amostras de leite por HPLC ou UFLC. Apesar disto, valores satisfatórios de recuperação foram verificados em ambos os métodos analíticos (84 - 111%), demonstrando que possíveis constituintes presentes nas amostras de leite (gorduras, vitaminas, proteínas, entre outros) não interferiram na resposta eletroquímica da TET, utilizando o GCE/rGO.

Os métodos (FIA-AMP e BIA-AMP) foram comparados com outras metodologias eletroanalíticas relatadas na literatura para determinação de TET, conforme mostrado na Tabela 8. Os dois sistemas propostos neste trabalho usando o GCE/rGO apresentaram vantagens, tais como: maior frequência analítica e melhor detectabilidade sob um menor potencial de oxidação (transferência eletrônica mais facilitada). Além disso, foram aplicados satisfatoriamente para a análise de amostras de fármacos e leite, envolvendo apenas dissoluções/diluições das amostras em eletrólito suporte.

Tabela 8 – Comparação das características analíticas dos métodos desenvolvidos (BIA-AMP e FIA-AMP) com outros métodos eletroanalíticos relatados na literatura para a determinação de TET.

Sensor	Método	Potencial vs Ag/AgCl,KCl(sat) / V	LD / $\mu\text{mol L}^{-1}$	Frequência analítica / a h <sup>-1</sup>	Amostra	Referências
Au	FIA-AMP	1,15	1,00	n.m.	Fármacos	(PALAHARN <i>et al.</i> , 2003)
PtNPs/C	CV	0,95	4,28	50*	Urina	(KUSHIKAWA <i>et al.</i> , 2016)
BiFE	FIA-AMP	-1,30	1,20	20	Fármacos	(SATTAYASAMITSAT HIT <i>et al.</i> , 2007)
Mel@ERGO/ GCE	DPV	0,92	5,00	30*	Urina	(KESAVAN <i>et al.</i> , 2017)
GCE/MWNT s-GNPs/MIP	CV	1,10	0,10	12*	n.m	(WANG <i>et al.</i> , 2011)
GPU	DPV	0,92	2,30	45*	Água	(CALIXTO <i>et al.</i> , 2012)
GR-SPCE	DPV	0,60	0,08	40*	Leite	(HAYATI <i>et al.</i> , 2016)
GPU	DPV	0,92	2,60	45*	Leite	(CALIXTO; CAVALHEIRO, 2017)
GCE/rGO	FIA-AMP BIA-AMP	0,90	1,06 0,035	103	Fármacos e leite	Este trabalho

Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2020).

Au: eletrodo de ouro; GCE: eletrodo de carbono vítreo; PtNPs/C: nanopartículas de platina suportadas em carbono; BiFE: eletrodo de filme de bismuto; Mel@ERGO: eletrodo quimicamente modificado com óxido de grafeno reduzido e polimelamina; MWNTs-GNPs/MIP: polímero molecularmente impresso modificado com nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro; GPU: compósito de grafite e poliuretano; rGO: óxido de grafeno reduzido; GR-SPCE: eletrodo impresso de carbono modificado com grafeno; FIA-AMP: análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica; CV: voltametria cíclica; DPV: voltametria de pulso diferencial; BIA-AMP: análise por injeção em batelada com detecção amperométrica; LD: limite de detecção;  $h^{-1}$ : análises por hora; n.m: não mencionado, \*frequência analítica estimada pelo discente segundo os parâmetros fornecidos nos artigos.

#### 4.3.5 Conclusões parciais

Estudos por CV mostraram um incremento considerável de sinal analítico, bem como antecipação dos processos de oxidação da TET sobre o GCE/rGO frente ao GCE, o que novamente pode estar relacionado aos efeitos eletrocatalíticos do rGO e ao aumento da área eletroativa. Investigações em diferentes valores de pH (2,0 a 10,0), revelaram transferência eletrônica facilitada em meio alcalino, visto o considerável deslocamento para regiões mais próximas de 0,0 V. Tanto no eletrodo não modificado como no modificado, o regime de transporte de massa foi caracterizado pela adsorção das moléculas de TET.

Dois métodos simples, rápidos e de baixo custo (BIA-AMP e FIA-AMP) foram desenvolvidos para a avaliação de TET em formulações farmacêuticas e leite. Os resultados com relação às amostras de fármacos apresentaram adequada exatidão, uma vez que foram concordantes, à 95 % de confiança, com os valores obtidos por UFLC. Além disso, as aplicações em leite com simples diluições em eletrólito suporte forneceram consideráveis faixas de recuperação (84 – 111 %), evidenciando que não houve efeito de matriz sobre as medidas eletroquímicas. Tendo em vista a melhor sensibilidade e detectabilidade, o método BIA se mostrou mais adequado para o monitoramento de resíduos de TET em leite. Adicionalmente, ambas metodologias forneceram melhores detectabilidades e maiores frequências analíticas sob um menor potencial de análise em comparação a outros estudos reportados pela literatura científica acerca da TET.

#### 4.3.6 Publicações

O estudo comparativo de ambas metodologias desenvolvidas para avaliação de TET em amostras de formulações farmacêuticas e leite usando GCE/rGO foi publicado em um periódico reconhecido internacionalmente.

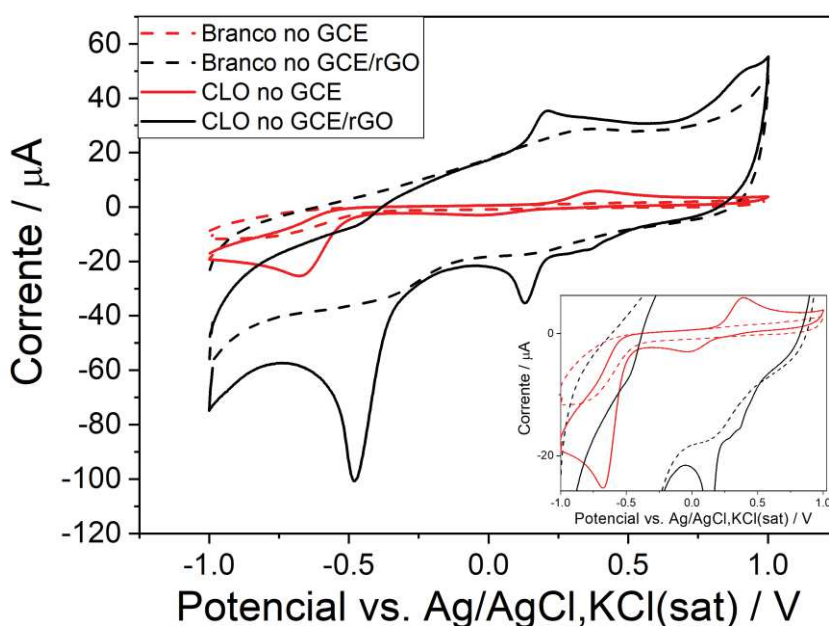
Lucas V. Faria, Ana P. Lima, Fausto M. Araújo, Thalles P. Lisboa, Maria A. C. Matos, Rodrigo A. A. Muñoz, Renato C. Matos, High-throughput amperometric determination of tetracycline residues in milk and quality control of pharmaceutical formulations: flow-injection versus batch-injection analysis, **Analytical Methods**, v.11, n. 41, 5328-5336, 2019.

#### 4.4 ESTUDOS ELETROQUÍMICOS COM O CLORANFENICOL

##### 4.4.1 Investigação do comportamento eletroquímico do cloranfenicol por CV

O comportamento eletroquímico do CLO foi investigado sobre o GCE e GCE/rGO, mediante a realização de voltamogramas cíclicos na faixa de -1,0 a 1,0 V, na presença de uma solução contendo  $450 \mu\text{mol L}^{-1}$  de CLO em meio de tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 2,0). Apesar das medidas serem efetuadas em uma faixa de potencial negativo, não foi verificado influência do oxigênio dissolvido sobre os processos de redução, portanto não houve a necessidade de purgar  $\text{N}_2$  nas soluções de análise. A Figura 48 representa as respostas eletroquímicas do CLO sobre os dois sensores eletroquímicos.

Figura 48 – Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando GCE (vermelho) e GCE/rGO (preto) na ausência e presença de CLO ( $450 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em meio de tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 2,0). Condições instrumentais: velocidade de varredura:  $100 \text{ mV s}^{-1}$ , potencial de condicionamento: -1,0 V, tempo de condicionamento: 15 s.



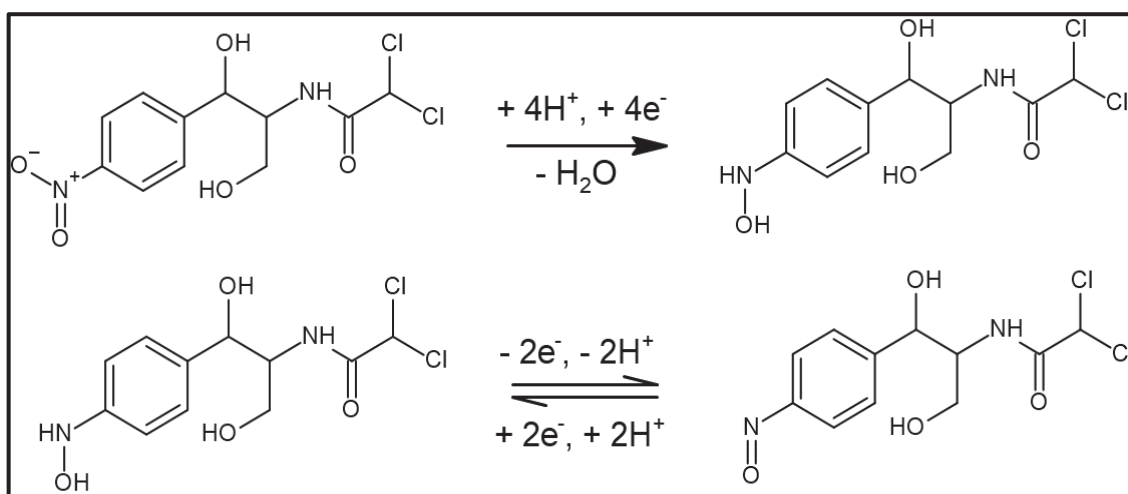
Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2021).

Em ambos os voltamogramas cíclicos foram observados um sinal anódico e dois catódicos. No GCE estes ocorreram em +0,38, -0,018 e -0,67 V, enquanto que no GCE/rGO os mesmos foram verificados em +0,21, +0,13 e -0,51 V, respectivamente.

Desta forma, notou-se que em todos os processos de eletrólise do CLO sobre o eletrodo modificado, houve deslocamento dos potenciais para valores mais próximos de 0,0 V, em relação ao eletrodo não modificado. Além disso, em termos de intensidade de corrente, percebeu-se um ganho de aproximadamente 4 vezes em cada um dos sinais eletroquímicos. Diante destas observações, evidencia-se uma provável ação electrocatalítica do rGO sobre as reações de redução e/ou oxidação dos grupos funcionais presentes na estrutura do CLO.

O mecanismo de oxidação/redução do CLO já é bem discutido na literatura científica. Segundo Govindasamy e colaboradores (GOVINDASAMY *et al.*, 2017), a eletrólise do CLO envolve primeiramente a redução irreversível do grupo nitro a hidroxilamina (-0,40 a -0,70 V), seguido pela oxidação da hidroxilamina a um derivado nitroso (+0,20 a +0,40 V) e a redução deste a novamente hidroxilamina (+0,1 a -0,1 V), conforme apresentado na Figura 49.

Figura 49 – Mecanismos das etapas de redução e oxidação eletroquímica do CLO.



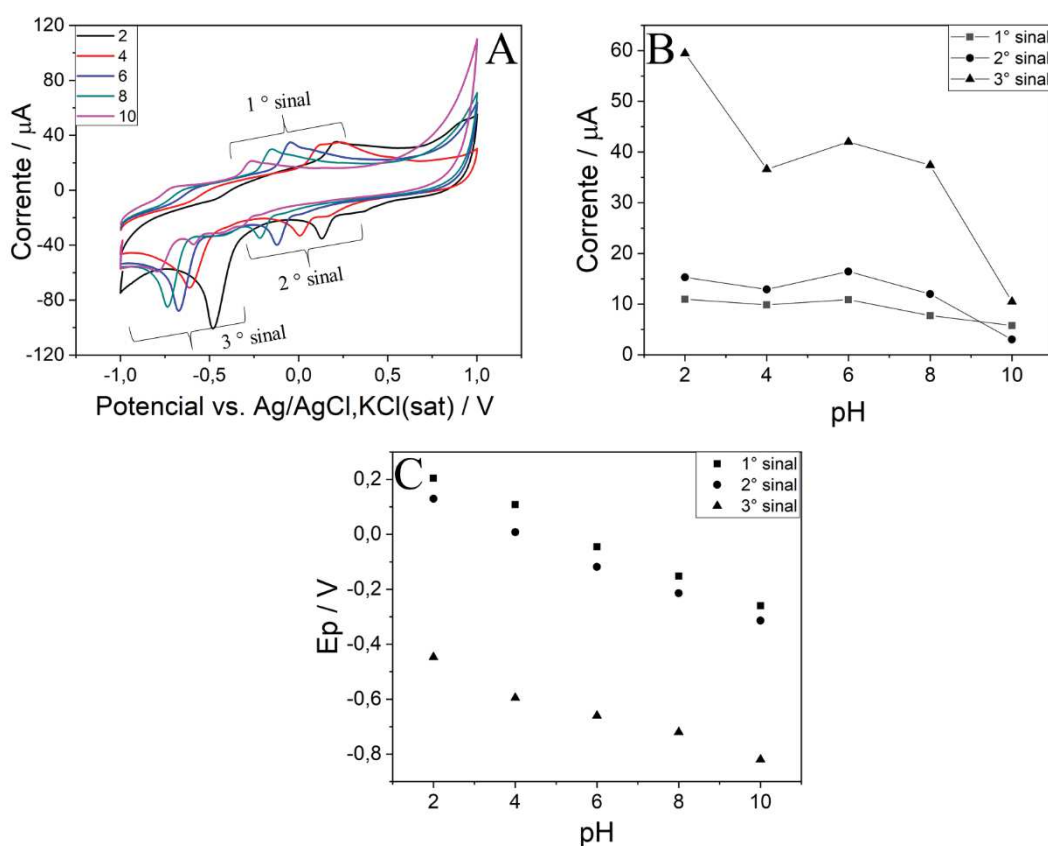
Fonte: Adaptado de (GOVINDASAMY *et al.*, 2017).

Como mostrado anteriormente na Figura 48, o sentido de varredura do potencial foi de -1,0 para +1,0 V, desta forma era de se esperar que na primeira varredura (sentido anódico), nenhum processo de oxidação fosse observado, visto à necessidade da redução do grupo nitro a hidroxilamina. No entanto, antes da etapa de varredura, um potencial de condicionamento de -1,0 V foi aplicado por 15 s para gerar a espécie reduzida na superfície do eletrodo, bem como minimizar uma descarga brusca capacitiva.



O pH do meio foi avaliado utilizando o tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ ) em um intervalo de 2,0 a 10,0; na presença de  $500 \mu\text{mol L}^{-1}$  de CLO. Na Figura 50 estão representados os voltamogramas cíclicos e as influências dos valores de pH sobre o  $E_p$  e corrente de pico.

Figura 50 – (A) Voltamogramas cíclicos de uma solução de CLO ( $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em meio de tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ ) com valores de pH iguais a 2,0 (preto); 4,0 (vermelho); 6,0 (azul); 8,0 (verde); 10,0 (rosa); (B) relação entre a corrente e o pH e (C) relação entre o  $E_p$  e o pH. Condições instrumentais: velocidade de varredura:  $100 \text{ mV s}^{-1}$ , potencial de condicionamento:  $-1,0 \text{ V}$ , tempo de condicionamento: 15 s.



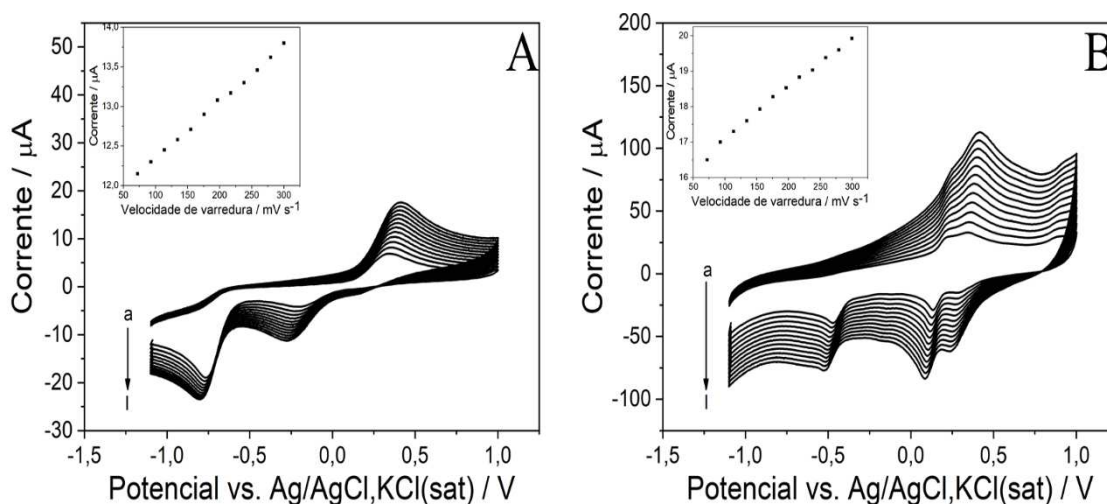
Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2021).

Analisando a Figura 50A, verifica-se um comportamento dependente do pH para todas as etapas de oxidação/redução. Conforme aumentou-se o pH do meio, ocorreram deslocamentos dos potenciais para regiões mais negativas, o que foi dificultando principalmente a redução do grupo nitro. Uma vez que as maiores intensidades de sinais analíticos foram obtidas em meio ácido (pH 2,0) (Figura 50B), este foi selecionado de modo a proporcionar sensibilidade e seletividade às futuras medidas eletroquímicas.

Ajustes lineares decrescentes entre o  $E_p$  e pH ( $R^2 > 0,98$ ) com coeficientes angulares de -59, -55 e -50  $V\text{ pH}^{-1}$  foram obtidos (Figura 50A), ressaltando mesmo número de prótons e elétrons durante as etapas de oxidação/redução do CLO, o que foi condizente com o reportado por Govindasamy e colaboradores (GOVINDASAMY *et al.*, 2017).

Voltamogramas cíclicos com diferentes velocidades de varredura (70 – 300  $\text{mV s}^{-1}$ ) foram realizados para investigar o regime de transporte de massa do CLO sobre as duas plataformas eletroquímicas (GCE e GCE/rGO), como mostrado na Figura 51.

Figura 51 – (A) Voltamogramas cíclicos de uma solução de CLO ( $400\ \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em meio de tampão BR ( $0,04\ \text{mol L}^{-1}$ , pH 2,0) com velocidades de varreduras, (a) 70, (b) 93, (c) 114, (d) 135, (e) 155, (f) 175 (g) 197, (h) 217, (i) 238, (j) 260, (k) 280, e (l) 300  $\text{mV s}^{-1}$  usando o GCE e; (B) usando GCE/rGO. Os gráficos inseridos representam os ajustes lineares entre a corrente (em módulo) e a velocidade de varredura.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2021).

Apesar da realização de voltamogramas cíclicos em uma ampla faixa de potencial (-1,0 a 1,0 V), apenas a etapa referente a redução do grupo nitro foi investigada, dado que as reações subsequentes são extremamente dependentes da ocorrência deste processo. Ajustes lineares entre as correntes de redução e as velocidades de varredura ( $R^2 > 0,98$ ), demonstraram que em ambas as superfícies eletródicas, o transporte de massa das espécies de CLO foi governado predominantemente por adsorção. Comportamentos semelhantes foram observados em plataformas eletroquímicas a base de carbono mesoporoso dopado com nitrogênio e nanotubos de carbono (BAIKELI *et al.*, 2020; KOR; ZAREI, 2014).

#### 4.4.2 Avaliação do cloranfenicol por DPV

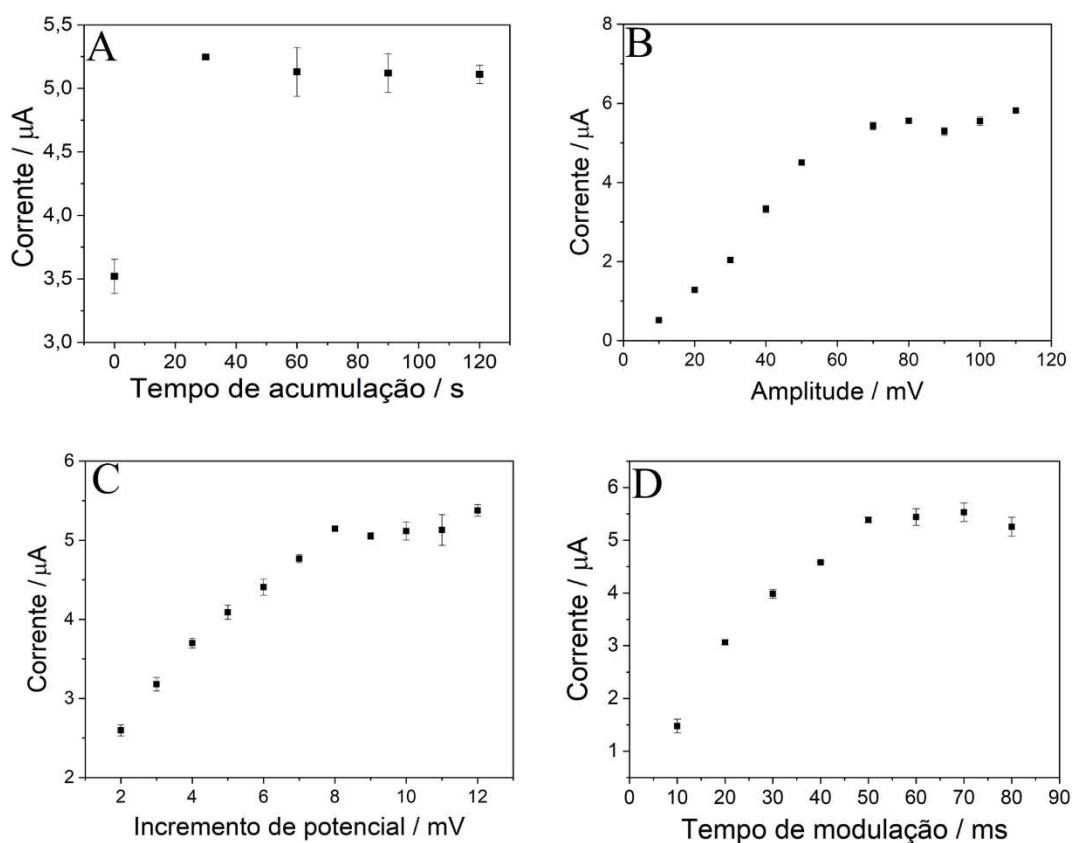
A DPV foi escolhida para avaliação da redução eletroquímica do CLO sobre o GCE/rGO. Tal como a SWV, esta permite o desenvolvimento de métodos com boa detectabilidade, dado a minimização da influência capacitiva frente a corrente faradaica. Tendo em vista que a partir dos estudos preliminares por CV foi comprovado um regime de transporte de massa caracterizado pela adsorção do CLO, além da otimização dos parâmetros instrumentais relacionados a DPV (amplitude, incremento de potencial e tempo de modulação), uma investigação do tempo de acumulação (0 a 120 s) sob circuito aberto foi realizado. Para estes estudos, utilizou-se uma concentração de  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$  de CLO em meio de tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 2,0) com medidas efetuadas em triplicata ( $n = 3$ ). As influências dos parâmetros estudados sobre as respostas eletroquímicas do CLO estão apresentadas na Figura 52.

Para a avaliação do efeito de acumulação das espécies do CLO sobre o GCE/rGO, o sistema foi mantido sob agitação constante (300 rpm) antes da etapa de varredura, com a finalidade de promover um transporte de massa mais eficiente. Em apenas 30 s de acumulação já foi notado uma saturação dos sítios ativos da superfície do eletrodo modificado (Figura 52A), com incremento de 50 % do sinal analítico em relação ao sistema em repouso. Estas observações ressaltam novamente o elevado caráter adsorptivo da molécula de CLO sobre o rGO, o que pode estar associado às interações com os grupos oxi-funcionais remanescentes da redução do material. Desta forma, o tempo de 30 s foi escolhido para a etapa de acumulação.

A amplitude do pulso foi investigada no intervalo de 10 a 110 mV. Observou-se aumento do sinal analítico sem perda de resolução do perfil voltamétrico até 70 mV, o qual foi escolhido e fixado para as demais otimizações (Figura 52B). Em seguida, a influência do incremento de potencial foi avaliada na faixa de 1 a 12 mV. Assim como na SWV, o incremento de potencial está relacionado com a velocidade de varredura da análise. Desta forma, espera-se que com o aumento deste parâmetro ocorra ganho de sinal analítico, em razão do menor consumo das espécies eletroativas. Foi observado uma relação linear crescente entre o sinal analítico e o incremento de potencial até 8 mV (Figura 52C). A partir deste valor, o sinal tendeu a estabilidade com perda de precisão em algumas situações (10 e 11 mV). Portanto, 8 mV foi a condição ótima, que conferiu a análise uma velocidade de  $18 \text{ mV s}^{-1}$ .

Finalmente investigou-se a influência do tempo de modulação do pulso sobre a resposta eletroquímica do CLO em um intervalo de 10 a 80 ms. Como discutido na introdução (seção 1.5), a amostragem da corrente na DPV é efetuada antes da aplicação do pulso e ao final do pulso, de modo a minimizar o efeito capacitivo. Desta forma, o tempo de modulação do pulso deve ser selecionado cuidadosamente com intuito de diminuir a contribuição capacitiva. Verificou-se ganho de sinal analítico até 50 ms, o qual certamente foi eficiente para uma discriminação do processo faradaico frente a descarga capacitiva (Figura 52D).

Figura 52 – Resultados obtidos a partir da otimização do (A) tempo de acumulação, (B) amplitude, (C) incremento do potencial e (D) tempo de modulação, para a redução de CLO por DPV usando GCE/rGO. Concentração de CLO:  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ , eletrólito suporte: tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 2,0) e eletrodo de referência: Ag/AgCl,KCl(sat).

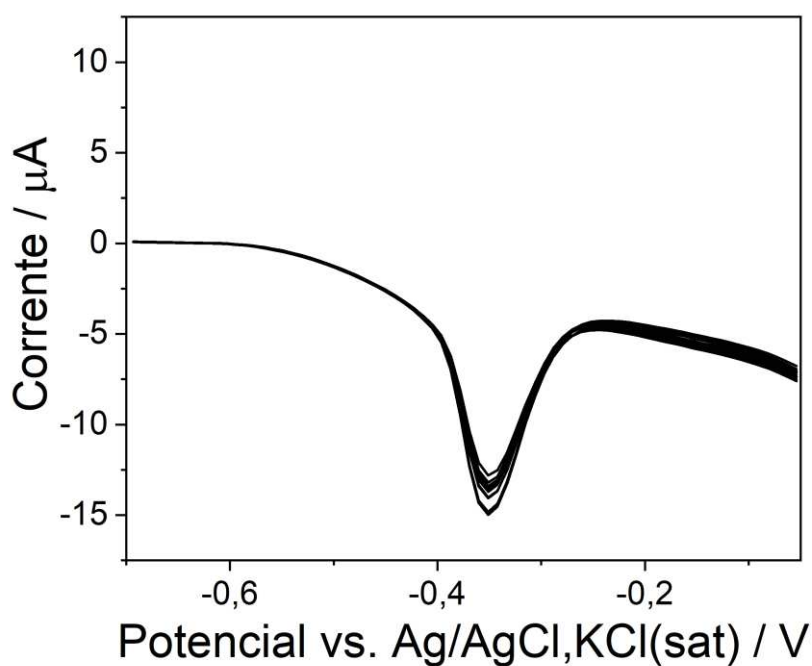


Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2021).

Sob as condições selecionadas, um estudo da repetibilidade ( $n = 10$ ) usando uma concentração de CLO de  $35 \mu\text{mol L}^{-1}$  foi efetuado para verificar precisão das respostas

eletroquímicas sobre o GCE/rGO (Figura 53). Um RSD de apenas 6,0 %, provou uma adequada precisão das medidas.

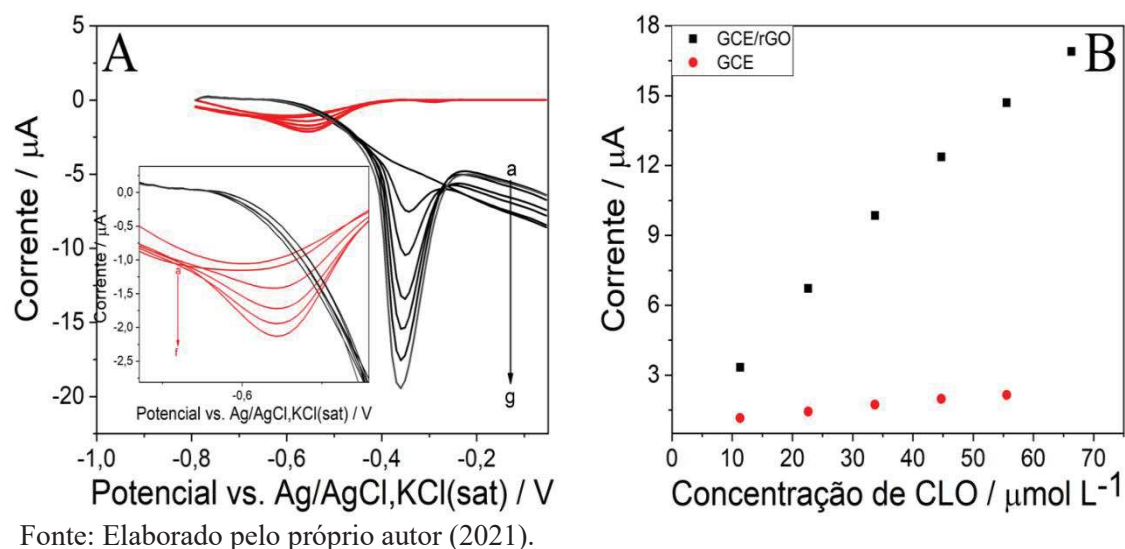
Figura 53 - Estudo de repetibilidade por DPV (n = 10) utilizando uma concentração de CLO de  $35 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Condições instrumentais, tempo de acumulação: 30 s, amplitude: 70 mV, incremento de potencial: 8 mV, tempo de modulação: 50 ms e eletrólito suporte: tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 2,0).



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2021).

Curvas analíticas com concentrações de CLO na faixa de 10 a  $66 \mu\text{mol L}^{-1}$  foram construídas sobre o GCE e GCE/rGO para verificar a linearidade, bem como para comparar ambas as plataformas eletroquímicas em termos de sensibilidade e detectabilidade. Na Figura 54 estão representados os voltamogramas correspondentes às curvas analíticas.

Figura 54 – (A) Voltamogramas obtidos por DPV a partir das curvas analíticas com concentrações de CLO variando de (a) tampão BR ( $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 2,0), (b) 11, (c) 22, (d) 34, (e) 45, (f) 56 e (g)  $66 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  utilizando GCE (vermelho) e GCE/rGO (preto); (B) respectivas curvas analíticas plotadas. Condições instrumentais, tempo de acumulação em circuito aberto: 30 s, amplitude: 70 mV, incremento de potencial: 8 mV, tempo de modulação: 50 ms



As características analíticas de ambos os sensores, tais como: sensibilidade, faixa linear, limites de detecção e quantificação, potencial de resposta eletroquímica e frequência analítica, estão descritas na Tabela 9.

Tabela 9 – Comparação das características analíticas usando GCE e GCE/rGO para a determinação de CLO por DPV

Características analíticas	Sensores	
	GCE	GCE/rGO
Faixa linear ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	11 – 55	11 – 66
LD ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	2,78	0,22
LQ ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	9,25	0,73
Equação do ajuste linear	$I_p = 0,93 + 0,023 [\text{CLO}]$	$I_p = 0,72 + 0,27 [\text{CLO}]$
Sensibilidade ( $\mu\text{A L}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}$ )	0,023	0,27
Potencial vs. Ag/AgCl, KCl(sat) / V	-0,56	-0,36
Frequência analítica	30	30

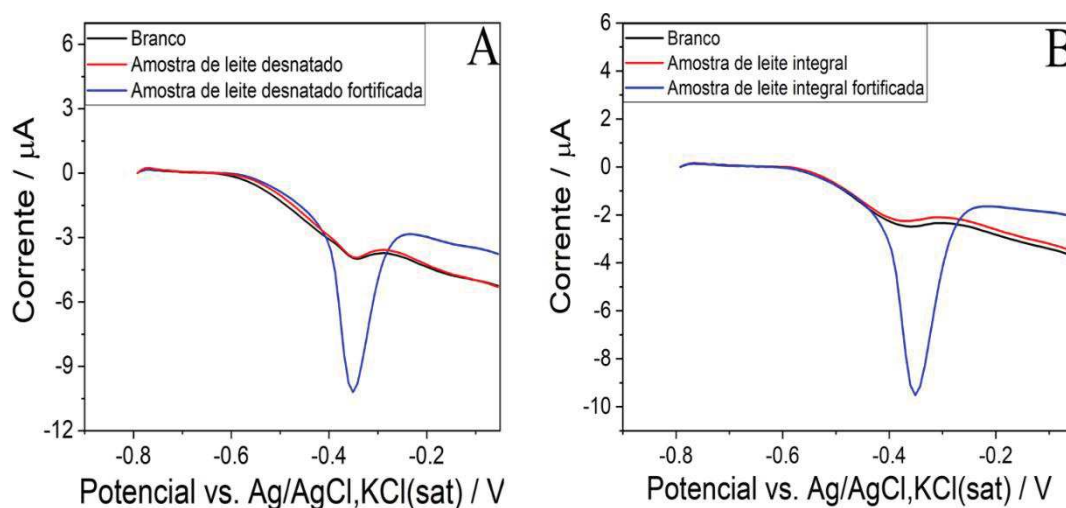
Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2021).

Através deste estudo comparativo, verificou-se que um melhor desempenho analítico foi atingido sobre a superfície do GCE/rGO. Destacam-se maior detectabilidade e sensibilidade (10 vezes superior), aliado a um potencial de redução mais próximo de 0,0 V, que pode auxiliar na seletividade das medidas eletroquímicas. Estes resultados são concordantes com as observações preliminares por voltametria cíclica. Desta forma, apenas o GCE/rGO foi avaliado para a determinação de resíduos de CLO em amostras de leite.

#### 4.4.3 Aplicação do método por DPV para determinação de cloranfenicol em amostras de leite

Como discutido anteriormente na parte experimental (seção 3.6), houve grande dificuldade em encontrar formulações farmacêuticas contendo o CLO como princípio ativo. Portanto, o método foi aplicado apenas nas amostras de leite desnatado e integral. Tendo em vista que os níveis de CLO ficaram abaixo do LD, as amostras de leite foram fortificadas para uma concentração final de  $27 \mu\text{mol L}^{-1}$  de CLO na célula eletroquímica, para investigar a aplicabilidade do método. Na Figura 55 estão representados os voltamogramas referentes às análises de uma amostra de leite desnatado e integral.

Figura 55 – (A) Voltamogramas obtidos por DPV para determinação de CLO em amostra de leite desnatado; e (B) em amostra de leite integral; branco (linha preta), amostras de leite (linhas vermelhas) e amostras de leite fortificadas com  $27 \mu\text{mol L}^{-1}$  de CLO (linhas azuis). Condições instrumentais, tempo de acumulação em circuito aberto: 30 s, amplitude: 70 mV, incremento de potencial: 8 mV, tempo de modulação: 50 ms.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2021).

Na Tabela 10 estão descritos os percentuais de recuperações obtidos para cada uma das amostras de leite analisadas por DPV usando o GCE/rGO. Em virtude da pandemia de Sars-CoV-2, e a conseqüente suspensão das atividades laboratoriais, foi possível analisar apenas duas amostras de leite (uma integral e uma desnatada) por UFLC para a comparação dos resultados.



Tabela 10 – Percentuais de recuperação para CLO nas amostras de leite (n = 3).

Amostras	DPV			UFLC	
	Adicionado ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Determinado ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	(%) recuperação	Determinado ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	(%) recuperação
C	27,0	29,2 $\pm$ 0,6	108 $\pm$ 2	-	-
D	27,0	26,7 $\pm$ 1,7	98 $\pm$ 6	23,5 $\pm$ 1,6	87 $\pm$ 6
E	27,0	25,2 $\pm$ 1,4	96 $\pm$ 5	24,3 $\pm$ 1,1	90 $\pm$ 4
F	27,0	25,9 $\pm$ 1,4	93 $\pm$ 5	-	-

Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2021).  
C e D: leites desnatados, E e F: leites integrais.

Percentuais de recuperação na faixa de 93 a 108 % demonstraram a exatidão, bem como a seletividade das medidas eletroquímicas, dado que não foi observado nenhum processo de redução dos constituintes do leite (gordura, açúcares, vitaminas, proteínas, entre outros) durante a varredura de potenciais para regiões catódicas. Além disso, com 95 % de confiança, não houve evidências de diferenças significativas entre os resultados obtidos por DPV frente ao UFLC, visto que o  $t_{\text{calculado}}$  (3,4) foi inferior ao  $t_{\text{tabelado}}$  (12,7), o que permitiu inferir sobre a confiabilidade dos resultados.

O desempenho analítico do método desenvolvido neste trabalho foi comparado com outros métodos eletroanalíticos reportados pela literatura científica para determinação de CLO, como mostrado na Tabela 11. Apesar de apresentar uma faixa linear mais estreita frente a grande parte dos trabalhos, boa detectabilidade associada à uma condição de transferência eletrônica facilitada (potencial de redução mais próximo de 0,0 V) foi alcançada. Além disso, muitos dos sensores avaliados necessitaram de um número maior de materiais e etapas para as modificações dos eletrodos (o que aumenta o custo e afeta a frequência analítica), enquanto que no presente trabalho, um simples protocolo de modificação via *drop casting* foi adequado para a incorporação do rGO sobre GCE. No que diz respeito aos estudos com as amostras de leite, a maioria dos sensores necessitaram de processos de extração, com uso de solventes orgânicos tóxicos para o preparo das amostras. Em contrapartida, simples diluição das amostras de leite em meio de tampão BR (pH 2,0) foi suficiente para aplicação do método desenvolvido.

Os resultados referentes à esta parte do trabalho foram submetidos para a *Food Analytical Methods*, e no momento encontra-se sob revisão.

Tabela 11 - Comparação do desempenho analítico do método desenvolvido por DPV usando GCE/rGO com outros métodos eletroanalíticos relatados na literatura para a determinação de CLO

Sensor	Método	Potencial vs Ag/AgCl,KCl (sat) / V	FL / $\mu\text{mol L}^{-1}$	LD / $\mu\text{mol L}^{-1}$	Amostras	Preparo de amostra	Referência
3D CNTs@Cu NPs@MIP	CV	0,50	10 – 5000	10	Leite	Extração com acetato de etila	(MUNAWAR <i>et al.</i> , 2018)
AuNPs/GO/GCE	AMP	-0,45	1,5 – 2,95	0,25	Leite	Adição de ácido perclórico, centrifugação e filtração	(KARTHIK <i>et al.</i> , 2016)
GCE/Co <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @rGO	DPV	-0,60	2 – 2000	1,16	Leite	Diluição em tampão fosfato (pH 7,0)	(YADAV <i>et al.</i> , 2019)
MMB/Au	FIA-AMP	-0,75	50 – 1000	44	Soluções oftalmológicas	Diluição em água deionizada	(CODOGNOTO <i>et al.</i> , 2010)
ZnWO <sub>4</sub> /GCE	CV	-0,58	30 – 500	0,32	n.m.	n.m.	(SHAD <i>et al.</i> , 2019)
$\beta$ -CD/CMK-3@PDA/GCE	SWV	-0,63	0,5 -500	0,20	Leite	Adição de ácido tricloroacético, centrifugação, extração com acetato de etila e filtração	(SUN <i>et al.</i> , 2018)
SPAN–MoS <sub>2</sub> /CPE	DPV	-0,70	0,1 -10	0,065	Soluções oftalmológicas	Diluição em tampão fosfato (pH 7,0)	(YANG <i>et al.</i> , 2015)
Si-Fe/NOMC/GCE	DPV	-0,67	1-500	0,03	Soluções oftalmológicas	Diluição em tampão fosfato (pH 7,0)	(YALIKUN <i>et al.</i> , 2018)
OMIMPF <sub>6</sub> /GNP/SWNT/GCE	n.m.	-0,66	0,01- 6	0,005	Leite	Extração com acetato de etila e adição de acetonitrila	(XIAO <i>et al.</i> , 2007)
GCE/rGO	DPV	-0,36	11 – 66	0,22	Leite	Diluição em tampão BR (pH 2,0)	Este trabalho

Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2021).

3D CNTs@Cu NPs@MIP: nanocompósito de nanotubos de carbono, nanopartículas de cobre e polímero molecularmente impresso; AuNPs/GO/GCE: eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de ouro e óxido de grafeno; GCE/Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@rGO: eletrodo de carbono vítreo modificado com nanocristais de óxido de cobalto e óxido de grafeno reduzido; MMB/Au: eletrodo de ouro modificado com 2-mercapto-5-metilbenzimidazol; ZnWO<sub>4</sub>/GCE: eletrodo de carbono vítreo modificado com tungstato de zinco; β-CD/CMK-3@PDA/GCE: eletrodo de carbono vítreo modificado com β-ciclodextrina, carbono mesoporoso ordenado e polidopamina; SPAN-MoS<sub>2</sub>/CPE: eletrodo de pasta de carbono modificado com polianilina e nanoesferas de sulfeto de molibdênio; Fe/NOMC/GCE: eletrodo de carbono vítreo modificado com nanocompósito de carbono-silício mesoporoso dopado com ferro e nitrogênio; OMIMPF<sub>6</sub>/GNP/SWNT/GCE: eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de ouro, nanotubos de carbono e líquido iônico; GCE/rGO: eletrodo de carbono vítreo modificado com óxido de grafeno reduzido; CV: voltametria cíclica; AMP: amperometria; DPV: voltametria de pulso diferencial, FIA-AMP: análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica; SWV: voltametria de onda quadrada; FL: faixa linear; LD: limite de detecção; n.m.: não mencionado.

#### 4.4.4 Conclusões parciais

Medidas eletroquímicas por CV revelaram uma ação eletrocatalítica do rGO sobre os processos de oxidação e/redução do CLO, dado os incrementos de corrente, assim como deslocamento dos potenciais para regiões próximas de 0,0 V, frente ao eletrodo não modificado. Em ambas as superfícies eletródicas foi evidenciado um transporte de massa caracterizado pela adsorção das moléculas de CLO. A partir da investigação do pH do meio com valores na faixa de 2,0 a 10,0, verificou-se que o comportamento eletroquímico do CLO é extremamente dependente do pH, sendo o pH 2,0, o mais adequado. Além disso, notou-se que em cada uma das etapas de eletrólise, o número de prótons e elétrons são iguais, conforme reportado por outros estudos na literatura.

Um método empregando a DPV foi desenvolvida para a detecção de CLO em amostras de leite. Em condições otimizadas, realizou-se uma comparação das figuras de mérito usando os sensores (GCE/rGO e GCE), sendo observado uma melhor performance analítica sobre a superfície modificada. Percentuais de recuperação variando de 93 a 108 % com RSD de 6,0 %, atestaram a exatidão e precisão das análises. Além do mais, com 95 % de confiança, os resultados foram comparáveis aos valores estabelecidos pelas análises por UFLC, comprovando a confiabilidade dos mesmos.

O desempenho analítico do método foi comparado com outros trabalhos reportados na literatura científica, destacando-se boa detectabilidade, aliada a um simples protocolo de modificação da superfície do eletrodo (via *drop casting*) e preparo de amostra (diluição em eletrólito suporte). Portanto, a metodologia proposta se mostra promissora para o monitoramento de resíduos de CLO em amostras de leite.

## 5 CONCLUSÕES FINAIS

No presente trabalho foi possível sintetizar o rGO a partir do GO via redução química com borohidreto de sódio. Ambos materiais foram devidamente caracterizados por espectroscopia Raman, espectroscopia na região do infravermelho, difração de raios X e microscopia eletrônica de varredura. A partir das caracterizações espectroscópicas constatou-se que a reação de redução do GO a rGO foi eficiente, enquanto que difratogramas de raios X mostraram um empilhamento irregular do rGO após sua reorganização estrutural no estado sólido. Imagens por microscopia eletrônica de varredura revelaram que uma grande parte da superfície do GCE foi efetivamente modificada com rGO, e que as AgNps e AuNps se agregaram após a etapa de secagem e ficaram localizadas sobre os flocos rGO, e em outros locais não preenchido pelo nanomaterial carbônico.

Estudos por CV na presença de cada um dos antibióticos (CIP, TET e CLO), mostraram que usando o GCE/rGO ocorreram antecipações dos potenciais de oxidação/redução com ganho considerável de sinal analítico frente ao eletrodo não modificado, o que pode estar correlacionado ao incremento da área eletroativa e a ação electrocatalítica do nanomaterial.

Medidas eletroquímicas, mais especificamente com a CIP, evidenciaram que as modificações do rGO com as nanopartículas de ouro e prata não ocasionaram melhoras analíticas ao sensor que justificassem as suas utilizações. Além do mais, as mesmas provavelmente foram facilmente desorvidas para o seio da solução, em virtude da diminuição de intensidade dos sinais redox de ouro e prata após a execução de sucessivos ciclos. Portanto, a etapa de modificação do rGO com as nanopartículas requer uma melhor investigação, como por exemplo, o uso de polímeros e/ou outros modos de modificação para melhorar a retenção destas sobre o eletrodo. Neste sentido, apenas o GCE/rGO foi utilizado para o desenvolvimento das metodologias eletroanalíticas.

Para as determinações dos antibióticos nas amostras de formulações farmacêuticas e no leite, diversos métodos eletroanalíticos foram propostos (SWV, BIA-AMP, FIA-AMP e DPV). Estes apresentaram importantes características analíticas, tais como: precisão, exatidão, detectabilidade adequadas, associadas a elevada frequência analítica (mais pronunciado no BIA-AMP e FIA-AMP) e simples preparo de amostra (diluição em eletrólito suporte).

Os teores dos princípios ativos determinados nas preparações farmacêuticas estavam de acordo com os valores pré-estabelecidos pelos rótulos dos fabricantes, enquanto que os níveis de antibióticos nas amostras de leite, ficaram abaixo dos LD. Percentuais de recuperação nas amostras de leite variando de 84 a 111 %, demonstraram que os constituintes do leite (gordura, vitaminas, proteínas, minerais, entre outros) não interferiram na resposta eletroquímica da CIP, TET e CLO utilizando o sensor a base de grafeno. Não houve evidências de diferenças significativas entre os resultados eletroquímicos e os cromatográficos, o que confirmou a confiabilidade dos mesmos.

Todos os métodos desenvolvidos nesta tese foram devidamente comparados com outras metodologias eletroanalíticas reportadas pela literatura científica, para a avaliação de CIP, TET e CLO. Na maioria dos casos, melhores condições analíticas foram obtidas, como: menores potenciais de oxidação/redução, maior detectabilidade, elevada frequência analítica, além de aplicabilidade em amostras de formulações farmacêuticas e leite com resultados satisfatórios e confiáveis. Em virtude disto, grande parte do trabalho já se encontra publicado em revistas científicas internacionais. De maneira geral, os métodos propostos são promissores para a investigação de antibióticos em análises de rotina envolvendo amostras de interesse alimentício, farmacêutico, clínico e ambiental.

## PERSPECTIVAS

As perspectivas deste trabalho são:

- a) Avaliar os sistemas de análises BIA-AMP e/ou FIA-AMP para a quantificação rápida e sensível de CLO em amostras de leite;
- b) Propor um método por técnica de pulso (DPV ou SWV) para a avaliação simultânea de CIP, CLO e TET;
- c) Estudar a etapa de modificação do rGO com as nanoestruturas metálicas, a partir de um tratamento eletroquímico e uso de polímeros, de modo a melhorar adsorção das mesmas sobre a superfície eletrodo;
- d) Aplicar os métodos desenvolvidos em outras amostras de interesse alimentício, clínico e ambiental;
- e) Investigar a aplicabilidade do GCE/rGO para antibióticos de outras classes, como os beta-lactâmicos e as sulfanilamidas.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-HAMID, R.; RABIA, M. K.; NEWAIR, E. F. Electrochemical behaviour of antioxidants: Part 2. Electrochemical oxidation mechanism of quercetin at glassy carbon electrode modified with multi-wall carbon nanotubes. **Arabian Journal of Chemistry**, 9, n. 3, p. 350-356, 2016.

ADELOJU, S. B. AMPEROMETRY. *In*: WORSFOLD, P.; TOWNSHEND, A., *et al* (Ed.). **Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)**. Oxford: Elsevier, 2005. p. 70-79.

AL-AFY, N.; SERESHTI, H.; HIJAZI, A.; RASHIDI NODEH, H. 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**, 1092, p. 480-488, 2018.

ALVES, G. F.; LISBOA, T. P.; DE FARIA, L. V.; DE FARIAS, D. M. *et al*. Disposable Pencil Graphite Electrode for Ciprofloxacin Determination in Pharmaceutical Formulations by Square Wave Voltammetry. **Electroanalysis**, 33, n. 2, p. 543-549, 2021.

AMARE, M.; ADMASSIE, S. Potentiodynamic fabrication and characterization of poly(4-amino-3-hydroxynaphthalene sulfonic acid) modified glassy carbon electrode. **Journal of Materials Research and Technology**, 9, n. 5, p. 11484-11496, 2020.

AMBROSI, A.; PUMERA, M. Inside Back Cover: Electrochemically Exfoliated Graphene and Graphene Oxide for Energy Storage and Electrochemistry Applications (Chem. Eur. J. 1/2016). **Chemistry – A European Journal**, 22, n. 1, p. 435-435, 2016.

ANACLETO, S. d. S.; BORGES, M. M. C.; DE OLIVEIRA, H. L.; VICENTE, A. R. *et al*. Evaluation of physicochemical properties as supporting information on quality control of raw materials and veterinary pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, 8, n. 3, p. 168-175, 2018.

ASHWINI, K. S.; SHARAD, S. U.; CHAITALI, R. R.; NINAD, S. P. *et al*. Voltammetric Techniques for the Analysis of Drugs using Nanomaterials based Chemically Modified Electrodes. **Current Analytical Chemistry**, 15, n. 3, p. 249-276, 2019.

BAGHAYERI, M.; AMIRI, A.; FAYAZI, M.; NODEHI, M. *et al*. Electrochemical detection of bisphenol a on a MWCNTs/CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanocomposite modified glassy carbon electrode. **Materials Chemistry and Physics**, 261, p. 124247, 2021.

BAIG, N.; SAJID, M.; SALEH, T. A. Recent trends in nanomaterial-modified electrodes for electroanalytical applications. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 111, p. 47-61, 2019.

BAIKELI, Y.; MAMAT, X.; HE, F.; XIN, X. *et al*. Electrochemical determination of chloramphenicol and metronidazole by using a glassy carbon electrode modified with

iron, nitrogen co-doped nanoporous carbon derived from a metal-organic framework (type Fe/ZIF-8). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 204, p. 111066, 2020.

BARD, A. J. **Electrochemical methods: fundamentals and applications** New York: 1980.

BERGAMIN F<sup>o</sup>, H.; ZAGATTO, E. A. G.; KRUG, F. J.; REIS, B. F. Merging zones in flow injection analysis: Part 1. Double proportional injector and reagent consumption. **Analytica Chimica Acta**, 101, n. 1, p. 17-23, 1978.

BESHARATI, M.; HAMED, J.; HOSSEINKHANI, S.; SABER, R. A novel electrochemical biosensor based on TetX2 monooxygenase immobilized on a nanoporous glassy carbon electrode for tetracycline residue detection. **Bioelectrochemistry**, 128, p. 66-73, 2019.

BILIBIO, U. **Determinação eletroanalítica individual e simultânea das fluoroquinolonas, levofloxacina e norfloxacina, empregando meio micelar e procedimento de deconvolução**. 2014. (Dissertação (Mestrado em Química)) -, Universidade Federal da Grande Dourados, 2014.

BLOKHINA, S. V.; SHARAPOVA, A. V.; OL'KHOVICH, M. V.; VOLKOVA, T. V. *et al.* Solubility, lipophilicity and membrane permeability of some fluoroquinolone antimicrobials. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 93, p. 29-37, 2016.

BRASIL. Limites Máximos de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal. **Gerência de Avaliação de Risco e Eficácia e Gerência Geral de Alimentos**, Brasília, pp. 136.

BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O.; MITOSERIU, L. C. Amperometric batch injection analysis: Theoretical aspects of current transients and comparison with wall-jet electrodes in continuous flow. **Electroanalysis**, 7, n. 3, p. 225-229, 1995.

BROWNSON, D. A. C.; BANKS, C. E. Graphene electrochemistry: an overview of potential applications. **Analyst**, 135, n. 11, p. 2768-2778, 2010.

CALIXTO, C. M. F.; CAVALHEIRO, É. T. G. Determination of Tetracycline in Bovine and Breast Milk Using a Graphite-Polyurethane Composite Electrode. **Analytical Letters**, 50, n. 14, p. 2323-2334, 2017.

CALIXTO, C. M. F.; CERVINI, P.; CAVALHEIRO, É. T. G. Determination of tetracycline in environmental water samples at a graphite-polyurethane composite electrode. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 23, p. 938-943, 2012.

CARDOSO, R. M.; MENDONÇA, D. M. H.; SILVA, W. P.; SILVA, M. N. T. *et al.* 3D printing for electroanalysis: From multiuse electrochemical cells to sensors. **Analytica Chimica Acta**, 1033, p. 49-57, 2018.

CERDÀ, V.; FERRER, L.; AVIVAR, J.; CERDÀ, A. Chapter 1 - Evolution and Description of the Principal Flow Techniques. *In*: CERDÀ, V.; FERRER, L., *et al* (Ed.). **Flow Analysis**. Boston: Elsevier, 2014. p. 1-42.

- CESARINO, I.; SIMÕES, R. P.; LAVARDA, F. C.; BATAGIN-NETO, A. Electrochemical oxidation of sulfamethazine on a glassy carbon electrode modified with graphene and gold nanoparticles. **Electrochimica Acta**, 192, p. 8-14, 2016.
- CHEN, D.; FENG, H.; LI, J. Graphene Oxide: Preparation, Functionalization, and Electrochemical Applications. **Chemical Reviews**, 112, n. 11, p. 6027-6053, 2012.
- CHENG, Q.; OKAMOTO, Y.; TAMURA, N.; TSUJI, M. *et al.* Graphene-Like-Graphite as Fast-Chargeable and High-Capacity Anode Materials for Lithium Ion Batteries. **Scientific Reports**, 7, n. 1, p. 14782, 2017.
- CINQUINA, A. L.; ROBERTI, P.; GIANNETTI, L.; LONGO, F. *et al.* Determination of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in goat milk by high-performance liquid chromatography with diode-array detection: Optimization and validation. **Journal of Chromatography A**, 987, n. 1, p. 221-226, 2003.
- COBELO-GARCÍA, A.; FILELLA, M. Electroanalytical techniques for the quantification of technology-critical elements in environmental samples. **Current Opinion in Electrochemistry**, 3, n. 1, p. 78-90, 2017.
- CODOGNOTO, L.; WINTER, E.; DORETTO, K. M.; MONTEIRO, G. B. *et al.* Electroanalytical performance of self-assembled monolayer gold electrode for chloramphenicol determination. **Microchimica Acta**, 169, n. 3, p. 345-351, 2010.
- DA SILVA, F. D.; ROCHA, R. G.; ROCHA, D. P.; SILVA, M. N. T. *et al.* In situ electrochemical exfoliation of embedded graphite to superficial graphene sheets for electroanalytical purposes. **Electrochimica Acta**, 354, p. 136762, 2020.
- DA COSTA OLIVEIRA, T.; SANTANA, M. H. P.; BANKS, C. E.; MUNOZ, R. A. A. *et al.* Electrochemical Portable Method for on site Screening of Scopolamine in Beverage and Urine Samples. **Electroanalysis**, 31, n. 3, p. 567-574, 2019.
- DA SILVA, M. K. L.; PLANA SIMÕES, R.; CESARINO, I. Evaluation of Reduced Graphene Oxide Modified with Antimony and Copper Nanoparticles for Levofloxacin Oxidation. **Electroanalysis**, 30, n. 9, p. 2066-2076, 2018.
- DAS, M. K.; CHAKRABORTY, T. Chapter 14 - ANN in Pharmaceutical Product and Process Development. *In*: PURI, M.; PATHAK, Y., *et al.* (Ed.). **Artificial Neural Network for Drug Design, Delivery and Disposition**. Boston: Academic Press, 2016. p. 277-293.
- DE FARIA, L. V.; LISBOA, T. P.; CAMPOS, N. d. S.; ALVES, G. F. *et al.* Electrochemical methods for the determination of antibiotic residues in milk: A critical review. **Analytica Chimica Acta**, 1173, p. 338569, 2021.
- DE FARIA, L. V.; LISBOA, T. P.; DE FARIAS, D. M.; ARAUJO, F. M. *et al.* Direct analysis of ascorbic acid in food beverage samples by flow injection analysis using reduced graphene oxide sensor. **Food Chemistry**, 319, p. 126509, 2020.

DELGADO, K. P.; RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.; CAMPOS, A. M.; OLIVEIRA JR., O. N. *et al.* Ultralow Cost Electrochemical Sensor Made of Potato Starch and Carbon Black Nanoballs to Detect Tetracycline in Waters and Milk. **Electroanalysis**, 30, n. 9, p. 2153-2159, 2018.

DONINI, C. A.; DA SILVA, M. K. L.; SIMÕES, R. P.; CESARINO, I. Reduced graphene oxide modified with silver nanoparticles for the electrochemical detection of estriol. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 809, p. 67-73, 2018.

DREYER, D. R.; PARK, S.; BIELAWSKI, C. W.; RUOFF, R. S. The chemistry of graphene oxide. **Chemical Society Reviews**, 39, n. 1, p. 228-240, 2010.

DU, B.; WEN, F.; ZHANG, Y.; ZHENG, N. *et al.* Presence of tetracyclines, quinolones, lincomycin and streptomycin in milk. **Food Control**, 100, p. 171-175, 2019.

EBRAHIMI, M.; NIKOOFARD, H.; FARIDBOD, F.; DEZFULI, A. S. *et al.* A ceria NPs decorated graphene nano-composite sensor for sulfadiazine determination in pharmaceutical formulation. **Journal of Materials Science: Materials in Electronics**, 28, n. 22, p. 16704-16712, 2017.

EC. COMMISSION REGULATION (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. : Official Journal of the European Union. L 15: 1-72 p. 2010.

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.

ELGRISHI, N.; ROUNTREE, K. J.; MCCARTHY, B. D.; ROUNTREE, E. S. *et al.* A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. **Journal of Chemical Education**, 95, n. 2, p. 197-206, 2018.

EVTUGYN, G.; HIANIK, T. Chapter 9 - Electroanalytical Bioplatfroms Based on Carbon Nanostructures as New Tools for Diagnosis. *In*: NIKOLELIS, D. P. e NIKOLELI, G.-P. (Ed.). **Nanotechnology and Biosensors**: Elsevier, 2018. p. 269-306.

FAO. Maximum Residue Limits (MRLs) and Risk Management Recommendations (RMRs) for Residues of Veterinary Drugs in Foods. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization: CODEX ALIMENTARIUS 2018.

FEDOROWICZ, J.; SĄCZEWSKI, J. Modifications of quinolones and fluoroquinolones: hybrid compounds and dual-action molecules. **Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly**, 149, n. 7, p. 1199-1245, 2018.

FERREIRA, L. M. C.; FELIX, F. S.; ANGNES, L. Fast Determination of Ciclopirox in Pharmaceutical Products by Amperometry in Flow and Batch Injection Systems. **Electroanalysis**, 24, n. 4, p. 961-966, 2012.

- FERREIRA, R.; CHAAR, J.; BALDAN, M.; BRAGA, N. Simultaneous voltammetric detection of Fe<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> e Cd<sup>2+</sup> in fuel ethanol using anodic stripping voltammetry and boron-doped diamond electrodes. **Fuel**, 291, p. 120104, 2021.
- FLEXER, V.; IELMINI, M. V.; CALVO, E. J.; BARTLETT, P. N. Extracting kinetic parameters for homogeneous [Os(bpy)<sub>2</sub>ClPyCOOH]<sup>+</sup> mediated enzyme reactions from cyclic voltammetry and simulations. **Bioelectrochemistry**, 74, n. 1, p. 201-209, 2008.
- FOTOUHI, L.; ALAHYARI, M. Electrochemical behavior and analytical application of ciprofloxacin using a multi-walled nanotube composite film-glassy carbon electrode. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 81, n. 1, p. 110-114, 2010.
- FRADE, V. M. F.; DIAS, M.; TEIXEIRA, A. C. S. C.; PALMA, M. S. A. Environmental contamination by fluoroquinolones. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 50, p. 41-54, 2014.
- FREITAS, J. M.; RAMOS, D. L. O.; SOUSA, R. M. F.; PAIXÃO, T. R. L. C. *et al.* A portable electrochemical method for cocaine quantification and rapid screening of common adulterants in seized samples. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 243, p. 557-565, 2017.
- FREITAS, J. M.; SILVA, P. R. L.; MUNOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. Fast and portable voltammetric method for the determination of the amphetamine adulterant ephedrine in natural over-the-counter weight-loss products. **Microchemical Journal**, 160, p. 105757, 2021.
- FRENS, G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. **Nature Physical Science**, 241, n. 105, p. 20-22, 1973.
- GAN, T.; SHI, Z.; SUN, J.; LIU, Y. Simple and novel electrochemical sensor for the determination of tetracycline based on iron/zinc cations-exchanged montmorillonite catalyst. **Talanta**, 121, p. 187-193, 2014.
- GAO, W.; ALEMANY, L. B.; CI, L.; AJAYAN, P. M. New insights into the structure and reduction of graphite oxide. **Nature Chemistry**, 1, n. 5, p. 403-408, 2009.
- GARBELLINI, G. S.; ROCHA-FILHO, R. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Voltammetric determination of ciprofloxacin in urine samples and its interaction with dsDNA on a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode. **Analytical Methods**, 7, n. 8, p. 3411-3418, 2015.
- GAYEN, P.; CHAPLIN, B. P. Selective Electrochemical Detection of Ciprofloxacin with a Porous Nafion/Multiwalled Carbon Nanotube Composite Film Electrode. **ACS Applied Materials & Interfaces**, 8, n. 3, p. 1615-1626, 2016.
- GIKAS, E.; KORMALI, P.; TSIPI, D.; TSARBOPOULOS, A. Development of a Rapid and Sensitive SPE-LC-ESI MS/MS Method for the Determination of Chloramphenicol in Seafood. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52, n. 5, p. 1025-1030, 2004.

GONZÁLEZ-LÓPEZ, A.; FERNÁNDEZ ABEDUL, M. T. Chapter 9 - Electrochemical detection of melatonin in a flow injection analysis system. *In*: FERNANDEZ ABEDUL, M. T. (Ed.). **Laboratory Methods in Dynamic Electroanalysis**: Elsevier, 2020. p. 85-97.

GOVINDASAMY, M.; CHEN, S.-M.; MANI, V.; DEVASENATHIPATHY, R. *et al.* Molybdenum disulfide nanosheets coated multiwalled carbon nanotubes composite for highly sensitive determination of chloramphenicol in food samples milk, honey and powdered milk. **Journal of Colloid and Interface Science**, 485, p. 129-136, 2017.

GOVINDASAMY, M.; WANG, S.-F.; KUMARAVEL, S.; RAMALINGAM, R. J. *et al.* Facile synthesis of copper sulfide decorated reduced graphene oxide nanocomposite for high sensitive detection of toxic antibiotic in milk. **Ultrasonics Sonochemistry**, 52, p. 382-390, 2019.

GROSSER, D. K. **Voltammetry: Simulation and Analysis of Reaction Mechanisms**. New York: VHC, 1993.

HALDORAI, Y.; VILIAN, A. T. E.; RETHINASABAPATHY, M.; HUH, Y. S. *et al.* Electrochemical determination of dopamine using a glassy carbon electrode modified with TiN-reduced graphene oxide nanocomposite. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 247, p. 61-69, 2017.

HAN, H.; HE, Z.; ZENG, Y.; RSQUO. Chemiluminescence Determination of Tetracyclines Using a Tris(2,2&prime;-bipyridine)ruthenium(II) and Potassium Permanganate System. **Analytical Sciences**, 15, n. 5, p. 467-470, 1999.

HAO, H.; WANG, J.; LV, Q.; JIAO, Y. *et al.* Interfacial engineering of reduced graphene oxide for high-performance supercapacitor materials. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 878, p. 114679, 2020.

HARIDAS, V.; YAAKOB, Z.; K, R. N.; SUGUNAN, S. *et al.* Selective electrochemical determination of paracetamol using hematite/graphene nanocomposite modified electrode prepared in a green chemical route. **Materials Chemistry and Physics**, 263, p. 124379, 2021.

HASSAN, M. M.; EL ZOWALATY, M. E.; LUNDKVIST, Å.; JÄRHULT, J. D. *et al.* Residual antimicrobial agents in food originating from animals. **Trends in Food Science & Technology**, 111, p. 141-150, 2021.

HAYATI, F.; ASIYE, A. A.; SEVDA, A.; DILEK, O. *et al.* Determination of Tetracycline on the Surface of a High- Performance Graphene Modified Screen-Printed Carbon Electrode in Milk and Honey Samples. **Current Nanoscience**, 12, n. 4, p. 527-533, 2016.

HERNÁNDEZ, M.; BORRULL, F.; CALULL, M. Analysis of antibiotics in biological samples by capillary electrophoresis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 22, n. 7, p. 416-427, 2003.

- HERNÁNDEZ, P.; AGUILAR-LIRA, G. Y.; ISLAS, G.; RODRIGUEZ, J. A. Development of a New Voltammetric Methodology for the Determination of Ciprofloxacin in Beef Samples Using a Carbon Paste Electrode Modified with Nafion and Fullerenes. **Electroanalysis**, 33, n. 6, p. 1539-1546, 2021.
- HU, X.; GOUD, K. Y.; KUMAR, V. S.; CATANANTE, G. *et al.* Disposable electrochemical aptasensor based on carbon nanotubes- V2O5-chitosan nanocomposite for detection of ciprofloxacin. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 268, p. 278-286, 2018.
- HUANG, J.-Y.; BAO, T.; HU, T.-X.; WEN, W. *et al.* Voltammetric determination of levofloxacin using a glassy carbon electrode modified with poly(o-aminophenol) and graphene quantum dots. **Microchimica Acta**, 184, n. 1, p. 127-135, 2017.
- HUANG, Y.; XU, J.; CHEN, L.; YUAN, D. *et al.* Flow injection analysis method with on-line resin separation for determining trace Fe(II) and Fe(II + III) using catalytic spectrophotometry. **Microchemical Journal**, 162, p. 105840, 2021.
- HUMMERS, W. S.; OFFEMAN, R. E. Preparation of Graphitic Oxide. **Journal of the American Chemical Society**, 80, n. 6, p. 1339-1339, 1958.
- IDOWU, O. R.; PEGGINS, J. O. Simple, rapid determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in bovine milk and plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 35, n. 1, p. 143-153, 2004.
- JALAL, N. R.; MADRAKIAN, T.; AFKHAMI, A.; GHAMSARI, M. Polyethylenimine@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@carbon nanotubes nanocomposite as a modifier in glassy carbon electrode for sensitive determination of ciprofloxacin in biological samples. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 833, p. 281-289, 2019.
- JIAN, J.-M.; FU, L.; JI, J.; LIN, L. *et al.* Electrochemically reduced graphene oxide/gold nanoparticles composite modified screen-printed carbon electrode for effective electrocatalytic analysis of nitrite in foods. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 262, p. 125-136, 2018.
- JU, H.-M.; HUH, S. H.; CHOI, S.-H.; LEE, H.-L. Structures of thermally and chemically reduced graphene. **Materials Letters**, 64, n. 3, p. 357-360, 2010.
- JUANG, Z.-Y.; WU, C.-Y.; LU, A.-Y.; SU, C.-Y. *et al.* Graphene synthesis by chemical vapor deposition and transfer by a roll-to-roll process. **Carbon**, 48, n. 11, p. 3169-3174, 2010.
- KALIYARAJ SELVA KUMAR, A.; ZHANG, Y.; LI, D.; COMPTON, R. G. A mini-review: How reliable is the drop casting technique? **Electrochemistry Communications**, 121, p. 106867, 2020.
- KALUNKE, R. M.; GRASSO, G.; D'OVIDIO, R.; DRAGONE, R. *et al.* Detection of ciprofloxacin residues in cow milk: A novel and rapid optical  $\beta$ -galactosidase-based screening assay. **Microchemical Journal**, 136, p. 128-132, 2018.

KARTHIK, R.; GOVINDASAMY, M.; CHEN, S.-M.; MANI, V. *et al.* Green synthesized gold nanoparticles decorated graphene oxide for sensitive determination of chloramphenicol in milk, powdered milk, honey and eye drops. **Journal of Colloid and Interface Science**, 475, p. 46-56, 2016.

KESAVAN, S.; KUMAR, D. R.; LEE, Y. R.; SHIM, J.-J. Determination of tetracycline in the presence of major interference in human urine samples using polymelamine/electrochemically reduced graphene oxide modified electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 241, p. 455-465, 2017.

KONIOS, D.; STYLIANAKIS, M. M.; STRATAKIS, E.; KYMAKIS, E. Dispersion behaviour of graphene oxide and reduced graphene oxide. **Journal of Colloid and Interface Science**, 430, p. 108-112, 2014.

KOR, K.; ZAREI, K. Electrochemical determination of chloramphenicol on glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotube–cetyltrimethylammonium bromide–poly(diphenylamine). **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 733, p. 39-46, 2014.

KUMAR, N.; ROSY; GOYAL, R. N. Gold-palladium nanoparticles aided electrochemically reduced graphene oxide sensor for the simultaneous estimation of lomefloxacin and amoxicillin. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 243, p. 658-668, 2017.

KUMAR, S.; KARFA, P.; MAJHI, K. C.; MADHURI, R. Photocatalytic, fluorescent BiPO<sub>4</sub>@Graphene oxide based magnetic molecularly imprinted polymer for detection, removal and degradation of ciprofloxacin. **Materials Science and Engineering: C**, 111, p. 110777, 2020.

KUSHIKAWA, R. T.; SILVA, M. R.; ANGELO, A. C. D.; TEIXEIRA, M. F. S. Construction of an electrochemical sensing platform based on platinum nanoparticles supported on carbon for tetracycline determination. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 228, p. 207-213, 2016.

LA NASA, J.; NARDELLA, F.; ANDREI, L.; GIANI, M. *et al.* Profiling of high molecular weight esters by flow injection analysis-high resolution mass spectrometry for the characterization of raw and archaeological beeswax and resinous substances. **Talanta**, 212, p. 120800, 2020.

LAERTE PEREIRA DE, A.; RAQUEL LEAO, V.; DAISE APARECIDA, R.; ANDREA LEAO, C. *et al.* Resíduos de antibioticos em leite de propriedades rurais da regio de Uberlandia-MG. **Bioscience Journal**, 19, n. 3 p. 83-87, 2006.

LAVIRON, E. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, 101, n. 1, p. 19-28, 1979.

LEE, P. C.; MEISEL, D. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. **The Journal of Physical Chemistry**, 86, n. 17, p. 3391-3395, 1982.



- LENCASTRE, R.; DELERUE-MATOS, C.; GARRIDO, J.; BORGES, F. *et al.* Voltammetric quantification of fluoxetine: Application to quality control and quality assurance processes. **Journal of Food and Drug Analysis**, 14, p. 242-246, 2006.
- LI, J.; YANG, J.; YANG, Z.; LI, Y. *et al.* Graphene–Au nanoparticles nanocomposite film for selective electrochemical determination of dopamine. **Analytical Methods**, 4, n. 6, p. 1725-1728, 2012.
- LI, Z.; XU, K.; LIANG, B.; LI, Y. Determination of trace tetracyclines in surface water by aluminum hydroxide coprecipitation coupled with high-performance liquid chromatography. **Analytical Methods**, 5, n. 14, p. 3516-3522, 2013.
- LOW, C. T. J.; WALSH, F. C.; CHAKRABARTI, M. H.; HASHIM, M. A. *et al.* Electrochemical approaches to the production of graphene flakes and their potential applications. **Carbon**, 54, p. 1-21, 2013.
- MAMANI, M. C. V.; AMAYA-FARFAN, J.; REYES, F. G. R.; SILVA, J. A. F. d. *et al.* Use of experimental design and effective mobility calculations to develop a method for the determination of antimicrobials by capillary electrophoresis. **Talanta**, 76, n. 5, p. 1006-1014, 2008.
- MAMANI, M. C. V.; FARFÁN, J. A.; REYES, F. G. R.; RATH, S. Simultaneous determination of tetracyclines in pharmaceuticals by CZE using experimental design. **Talanta**, 70, n. 2, p. 236-243, 2006.
- MANJULA, N.; CHEN, S.-M. Synthesis of highly electroactive nanoflowers like manganese oxide and electroanalytical application for chloramphenicol determination in milk and honey samples. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 880, p. 114914, 2021.
- MARTINS JÚNIOR, H. A.; BUSTILLOS, O. V.; PIRES, M. A. F.; LEBRE, D. T. *et al.* Determinação de resíduos de cloranfenicol em amostras de leite e mel industrializados utilizando a técnica de espectrometria de massas em "tandem" (CLAE-EM/EM). **Química Nova**, 29, p. 586-592, 2006.
- MASAWAT, P.; SLATER, J. M. The determination of tetracycline residues in food using a disposable screen-printed gold electrode (SPGE). **Sensors and Actuators B: Chemical**, 124, n. 1, p. 127-132, 2007.
- MATERÓN, E. M.; WONG, A.; FREITAS, T. A.; FARIA, R. C. *et al.* A sensitive electrochemical detection of metronidazole in synthetic serum and urine samples using low-cost screen-printed electrodes modified with reduced graphene oxide and C60. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, 2021.
- MCINTYRE, J.; CHOONARA, I. Drug Toxicity in the Neonate. **Neonatology**, 86, n. 4, p. 218-221, 2004.
- MEDEIROS, R. A.; LOURENÇÃO, B. C.; ROCHA-FILHO, R. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Simple Flow Injection Analysis System for Simultaneous Determination of

Phenolic Antioxidants with Multiple Pulse Amperometric Detection at a Boron-Doped Diamond Electrode. **Analytical Chemistry**, 82, n. 20, p. 8658-8663, 2010.

MEKASSA, B.; TESSEMA, M.; CHANDRAVANSI, B. S. Simultaneous determination of caffeine and theophylline using square wave voltammetry at poly(l-aspartic acid)/functionalized multi-walled carbon nanotubes composite modified electrode. **Sensing and Bio-Sensing Research**, 16, p. 46-54, 2017.

MENG, L.-Y.; PARK, S.-J. Influence of pH condition on colloidal suspension of exfoliated graphene oxide by electrostatic repulsion. **Journal of Solid State Chemistry**, 186, p. 99-103, 2012.

MICHALSKA, K.; PAJCHEL, G.; TYSKI, S. Determination of ciprofloxacin and its impurities by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, 1051, n. 1, p. 267-272, 2004.

MIRCESKI, V.; SKRZYPEK, S.; STOJANOV, L. Square-wave voltammetry. **ChemTexts**, 4, n. 4, p. 17, 2018.

MOCAK, J.; BOND, A. M.; MITCHELL, S.; SCOLLARY, G. A statistical overview of standard (IUPAC and ACS) and new procedures for determining the limits of detection and quantification: Application to voltammetric and stripping techniques (Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*. 69: 297 p. 1997.

MOHEBI, A.; SAMADI, M.; TAVAKOLI, H. R.; PARASTOUEI, K. Homogenous liquid-liquid extraction followed by dispersive liquid-liquid microextraction for the extraction of some antibiotics from milk samples before their determination by HPLC. **Microchemical Journal**, 157, p. 104988, 2020.

MONTES, R. H. O.; MARRA, M. C.; RODRIGUES, M. M.; RICHTER, E. M. *et al.* Fast Determination of Ciprofloxacin by Batch Injection Analysis with Amperometric Detection and Capillary Electrophoresis with Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection. **Electroanalysis**, 26, n. 2, p. 432-438, 2014.

MORENO-GONZÁLEZ, D.; HAMED, A. M.; GILBERT-LÓPEZ, B.; GÁMIZ-GRACIA, L. *et al.* Evaluation of a multiresidue capillary electrophoresis-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry method for the determination of antibiotics in milk samples. **Journal of Chromatography A**, 1510, p. 100-107, 2017.

MOSES, P. R.; WIER, L.; MURRAY, R. W. Chemically modified tin oxide electrode. **Analytical Chemistry**, 47, n. 12, p. 1882-1886, 1975.

MUNAWAR, A.; TAHIR, M. A.; SHAHEEN, A.; LIEBERZEIT, P. A. *et al.* Investigating nanohybrid material based on 3D CNTs@Cu nanoparticle composite and imprinted polymer for highly selective detection of chloramphenicol. **Journal of Hazardous Materials**, 342, p. 96-106, 2018.

NANDA, S. S.; PAPAETHYMIU, G. C.; YI, D. K. Functionalization of Graphene Oxide and its Biomedical Applications. **Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences**, 40, n. 5, p. 291-315, 2015.

NAQVI, T. K.; SRIVASTAVA, A. K.; KULKARNI, M. M.; SIDDIQUI, A. M. *et al.* Silver nanoparticles decorated reduced graphene oxide (rGO) SERS sensor for multiple analytes. **Applied Surface Science**, 478, p. 887-895, 2019.

NELIS, J. L. D.; MIGLIORELLI, D.; MÜHLEBACH, L.; GENERELLI, S. *et al.* Highly sensitive electrochemical detection of the marine toxins okadaic acid and domoic acid with carbon black modified screen printed electrodes. **Talanta**, 228, p. 122215, 2021.

NI, Y.; DENG, N.; KOKOT, S. A simple kinetic spectrophotometric method for simultaneous determination of tetracyclines by use of chemometrics. **Analytical Methods**, 2, n. 9, p. 1302-1309, 2010.

NIANG, E. M. M.; ASSOUMY, A. M.; TEKO AGBO, A.; AKODA, K. *et al.* Chloramphenicol residue levels of marketed farm gate milk in Senegal. **Food Control**, 72, p. 249-254, 2017.

NICHOLSON, R. S.; SHAIN, I. Theory of Stationary Electrode Polarography. Single Scan and Cyclic Methods Applied to Reversible, Irreversible, and Kinetic Systems. **Analytical Chemistry**, 36, n. 4, p. 706-723, 1964.

O'ROURKE, A.; BEYHAN, S.; CHOI, Y.; MORALES, P. *et al.* Mechanism-of-Action Classification of Antibiotics by Global Transcriptome Profiling. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 64, n. 3, p. e01207-01219, 2020.

PACHECO, W. F.; SEMAAN, F. S.; ALMEIDA, V. G. K.; RITTA, A. G. S. L. *et al.* Voltamétrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos. **Revista Virtual de Química**, 5, n. 4, p. 516-537, 2013.

PALAHARN, S.; CHAROENRAKS, T.; WANGFUENGGANAGUL, N.; GRUDPAN, K. *et al.* Flow injection analysis of tetracycline in pharmaceutical formulation with pulsed amperometric detection. **Analytica Chimica Acta**, 499, n. 1, p. 191-197, 2003.

PARVEZ, K.; YANG, S.; FENG, X.; MÜLLEN, K. Exfoliation of graphene via wet chemical routes. **Synthetic Metals**, 210, p. 123-132, 2015.

PEREIRA-MAIA, E. C.; SILVA, P. P.; ALMEIDA, W. B. d.; SANTOS, H. F. d. *et al.* Tetraciclina e gliciliclinas: uma visão geral. **Química Nova**, 33, p. 700-706, 2010.

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

PHONG, N. H.; TOAN, T. T. T.; TINH, M. X.; TUYEN, T. N. *et al.* Simultaneous Voltammetric Determination of Ascorbic Acid, Paracetamol, and Caffeine Using Electrochemically Reduced Graphene-Oxide-Modified Electrode. **Journal of Nanomaterials**, 2018, p. 15, 2018.

- PIOVESAN, J. V.; SANTANA, E. R.; SPINELLI, A. Reduced graphene oxide/gold nanoparticles nanocomposite-modified glassy carbon electrode for determination of endocrine disruptor methylparaben. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 813, p. 163-170, 2018.
- PRUNEANU, S.; BIRIS, A. R.; POGACEAN, F.; SOCACI, C. *et al.* The influence of uric and ascorbic acid on the electrochemical detection of dopamine using graphene-modified electrodes. **Electrochimica Acta**, 154, p. 197-204, 2015.
- PULGARÍN, J. A. M.; MOLINA, A. A.; BORAS, N. Rapid determination of ciprofloxacin in urine by matrix isopotential synchronous spectrometry. **Analytical Methods**, 4, n. 10, p. 3413-3419, 2012.
- PUMERA, M.; AMBROSI, A.; BONANNI, A.; CHNG, E. L. K. *et al.* Graphene for electrochemical sensing and biosensing. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 29, n. 9, p. 954-965, 2010.
- PUSHPANJALI, P. A.; MANJUNATHA, J. G.; HAREESHA, N.; SOUZA, E. S. D. *et al.* Voltammetric Analysis of Antihistamine Drug Cetirizine and Paracetamol at poly(L-Leucine) Layered Carbon Nanotube Paste Electrode. **Surfaces and Interfaces**, p. 101154, 2021.
- QUINTINO, M. S. M.; ANGNES, L. Batch Injection Analysis: An Almost Unexplored Powerful Tool. **Electroanalysis**, 16, n. 7, p. 513-523, 2004.
- RAJAJI, U.; MUTHUMARIAPPAN, A.; CHEN, S.-M.; CHEN, T.-W. *et al.* Facile sonochemical synthesis of porous and hierarchical manganese(III) oxide tiny nanostructures for super sensitive electrocatalytic detection of antibiotic (chloramphenicol) in fresh milk. **Ultrasonics Sonochemistry**, 58, p. 104648, 2019.
- REDDY, K. R.; BRAHMAN, P. K.; SURESH, L. Fabrication of high performance disposable screen printed electrochemical sensor for ciprofloxacin sensing in biological samples. **Measurement**, 127, p. 175-186, 2018.
- RENATA CABRERA DE, O.; ÉRIKA, B.; MIGUEL MACHINSKI, J. Ocorrência de cloranfenicol em leite pasteurizado comercializado no Estado do Paraná. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, 29, n. 1, p. 59-62, 2007.
- RIAZ, L.; ANJUM, M.; YANG, Q.; SAFEER, R. *et al.* Chapter 23 - Treatment technologies and management options of antibiotics and AMR/ARGs. *In*: HASHMI, M. Z. (Ed.). **Antibiotics and Antimicrobial Resistance Genes in the Environment**: Elsevier, 2020. v. 1, p. 369-393.
- ROCHA, D. P.; CARDOSO, R. M.; MENDONÇA, D. M. H.; RICHTER, E. M. *et al.* Solenoid Micro-pumps: A New Tool for Sample Introduction in Batch Injection Analysis Systems with Electrochemical Detection. **Electroanalysis**, 30, n. 1, p. 180-186, 2018.

ROCHA, D. P.; CARDOSO, R. M.; TORMIN, T. F.; DE ARAUJO, W. R. *et al.* Batch-injection Analysis Better than ever: New Materials for Improved Electrochemical Detection and On-site Applications. **Electroanalysis**, 30, n. 7, p. 1386-1399, 2018.

ROCHA, D. P.; DORNELLAS, R. M.; CARDOSO, R. M.; 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 and Actuators B: Chemical**, 254, p. 701-708, 2018.

ROCHA, R. G.; RIBEIRO, J. S.; SANTANA, M. H. P.; RICHTER, E. M. *et al.* 3D-printing for forensic chemistry: voltammetric determination of cocaine on additively manufactured graphene–polylactic acid electrodes. **Analytical Methods**, 13, n. 15, p. 1788-1794, 2021.

RODRÍGUEZ, M. P.; PEZZA, H. R.; PEZZA, L. Simple and clean determination of tetracyclines by flow injection analysis. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 153, p. 386-392, 2016.

ROSANA GOMES, F.; BERNARDETE FERAZ, S.; IRACEMA MARIA DE CARVALHO DA, H.; MYCHELLE ALVES, M. *et al.* Panorama da ocorrência de resíduos de medicamentos veterinários em leite no Brasil. **Segurança Alimentar e Nutricional**, 19, n. 2, 2012.

RUDNICKI, K.; SIPA, K.; BRYCHT, M.; BORGUL, P. *et al.* Electrochemical sensing of fluoroquinolone antibiotics. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 128, p. 115907, 2020.

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

ŘUŽIČKA, J.; HANSEN, E. H.; ZAGATTO, E. A. Flow injection analysis: Part VII. Use of ion-selective electrodes for rapid analysis of soil extracts and blood serum. Determination of potassium, sodium and nitrate. **Analytica Chimica Acta**, 88, n. 1, p. 1-16, 1977.

SAJID, M.; BAIG, N.; ALHOOSHANI, K. Chemically modified electrodes for electrochemical detection of dopamine: Challenges and opportunities. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 118, p. 368-385, 2019.

SANTOS, A. M.; SILVA, T. A.; VICENTINI, F. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Flow injection analysis system with electrochemical detection for the simultaneous determination of nanomolar levels of acetaminophen and codeine. **Arabian Journal of Chemistry**, 13, n. 1, p. 335-345, 2020.

SANTOS, A. M.; VICENTINI, F. C.; FIGUEIREDO-FILHO, L. C. S.; DEROCO, P. B. *et al.* Flow injection simultaneous determination of acetaminophen and tramadol in pharmaceutical and biological samples using multiple pulse amperometric detection with a boron-doped diamond electrode. **Diamond and Related Materials**, 60, p. 1-8, 2015.

SANTOS, W. T. P. d.; GIMENES, D. T.; ALMEIDA, E. G. N. d.; EIRAS, S. d. P. *et al.* Simple flow injection amperometric system for simultaneous determination of dipyrone and paracetamol in pharmaceutical formulations. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 20, p. 1249-1255, 2009.

SAQUIB, M.; HALDER, A. Reduced graphene oxide supported gold nanoparticles for electrocatalytic reduction of carbon dioxide. **Journal of Nanoparticle Research**, 20, n. 2, p. 46, 2018.

SATTAYASAMITSATHIT, S.; THAVARUNGKUL, P.; KANATHARANA, P. Bismuth Film Electrode for Analysis of Tetracycline in Flow Injection System. **Electroanalysis**, 19, n. 4, p. 502-505, 2007.

SCHERER, R.; PEREIRA, J.; FIRME, J.; LEMOS, M. *et al.* Determination of Ciprofloxacin in Pharmaceutical Formulations Using HPLC Method with UV Detection. **Indian journal of pharmaceutical sciences**, 76, n. 6, p. 541-544, 2014.

SHAD, N. A.; BAJWA, S. Z.; AMIN, N.; TAJ, A. *et al.* Solution growth of 1D zinc tungstate (ZnWO<sub>4</sub>) nanowires; design, morphology, and electrochemical sensor fabrication for selective detection of chloramphenicol. **Journal of Hazardous Materials**, 367, p. 205-214, 2019.

SHEN, J.; XIA, X.; JIANG, H.; LI, C. *et al.* Determination of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol, and florfenicol amine in poultry and porcine muscle and liver by gas chromatography-negative chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, 877, n. 14, p. 1523-1529, 2009.

SHI, Z. Ultra-Sensitive Aptasensor Based on IL and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles for Tetracycline Detection. **International Journal of Electrochemical Science**, 12, p. 7426-7434, 2017.

SHLAES, D. M. An update on tetracyclines. **Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000)**, 7, n. 2, p. 167-171, 2006.

SILVA, F. D. d.; ROCHA, D. P.; SILVA, M. N. T.; NOSSOL, E. *et al.* Chemically Reduced Graphene Oxide on Gold Electrodes from Recordable CDs: Characterization and Potential Sensing Applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 31, p. 429-437, 2020.

SILVA, L. A. J.; STEFANO, J. S.; CARDOSO, R. M.; PRADO, N. S. *et al.* Evaluation of graphite sheets for production of high-quality disposable sensors. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 833, p. 560-567, 2019.

SILVA, R. A. B.; MONTES, R. H. O.; RICHTER, E. M.; MUNOZ, R. A. A. Rapid and selective determination of hydrogen peroxide residues in milk by batch injection analysis with amperometric detection. **Food Chemistry**, 133, n. 1, p. 200-204, 2012.

SIMÕES, F. R.; XAVIER, M. G. 6 - Electrochemical Sensors. *In*: DA RÓZ, A. L.; FERREIRA, M., *et al* (Ed.). **Nanoscience and its Applications**: William Andrew Publishing, 2017. p. 155-178.

- SMADEL, J. E. Chloramphenicol (Chloromycetin) and Tropical Medicine. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 43, n. 6, p. 555-574, 1950.
- SOUSA, J.; ALVES, G.; FORTUNA, A.; FALCÃO, A. Analytical methods for determination of new fluoroquinolones in biological matrices and pharmaceutical formulations by liquid chromatography: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 403, n. 1, p. 93-129, 2012.
- SOUZA, D. d.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Química Nova**, 26, p. 81-89, 2003.
- SOUZA, M. d. F. B. Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise: uma breve abordagem. **Química Nova**, 20, p. 191-195, 1997.
- SPEER, B. S.; SHOEMAKER, N. B.; SALYERS, A. A. Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. **Clinical Microbiology Reviews**, 5, n. 4, p. 387, 1992.
- STEFANO, J. S. **Utilização de análise por injeção em fluxo e em batelada com detecção amperométrica e eletrodos impressos para determinação de ciprofloxacina**. 2016. Dissertação de Mestrado - Departamento de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2016.
- STEFANO, J. S.; CORDEIRO, D. S.; MARRA, M. C.; RICHTER, E. M. *et al.* Batch-injection versus Flow-injection Analysis Using Screen-printed Electrodes: Determination of Ciprofloxacin in Pharmaceutical Formulations. **Electroanalysis**, 28, n. 2, p. 350-357, 2016.
- STEFANO, J. S.; TORMIN, T. F.; DA SILVA, J. P.; RICHTER, E. M. *et al.* Amperometric determination of omeprazole on screen-printed electrodes using batch injection analysis. **Microchemical Journal**, 133, p. 398-403, 2017.
- SULLIVAN, C.; LU, D.; SENEAL, A.; KURUP, P. Voltammetric detection of arsenic (III) using gold nanoparticles modified carbon screen printed electrodes: Application for facile and rapid analysis in commercial apple juice. **Food Chemistry**, 352, p. 129327, 2021.
- SUN, Y.; WEI, T.; JIANG, M.; XU, L. *et al.* Voltammetric sensor for chloramphenicol determination based on a dual signal enhancement strategy with ordered mesoporous carbon@polydopamine and  $\beta$ -cyclodextrin. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 255, p. 2155-2162, 2018.
- SURYA, S. G.; KHATOON, S.; AIT LAHCEN, A.; NGUYEN, A. T. H. *et al.* A chitosan gold nanoparticles molecularly imprinted polymer based ciprofloxacin sensor. **RSC Advances**, 10, n. 22, p. 12823-12832, 2020. 10.1039/D0RA01838D.
- TALEBIZADEHSARDARI, P.; ARAMESH-BOROUJENI, Z.; FOROUGH, M. M.; EYVAZIAN, A. *et al.* Synthesis of carnation-like  $\text{Ho}^{3+}/\text{Co}_3\text{O}_4$  nanoflowers as a

modifier for electrochemical determination of chloramphenicol in eye drop. **Microchemical Journal**, 159, p. 105535, 2020.

TAN, H.; CHEN, Y. Silver nanoparticle enhanced fluorescence of europium (III) for detection of tetracycline in milk. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 173, p. 262-267, 2012.

TASIĆ, Ž. Z.; PETROVIĆ MIHAJLOVIĆ, M. B.; SIMONOVIĆ, A. T.; RADOVANOVIĆ, M. B. *et al.* Review of applied surface modifications of pencil graphite electrodes for paracetamol sensing. **Results in Physics**, 22, p. 103911, 2021.

TICIANELLI, E. A.; GONZALEZ, E. R. **Eletroquímica: Princípios e Aplicações**. 2005.

TREETEPVIJIT, S.; PREECHAWORAPUN, A.; PRAPHAIRAKSIT, N.; CHUANUWATANAKUL, S. *et al.* Use of nickel implanted boron-doped diamond thin film electrode coupled to HPLC system for the determination of tetracyclines. **Talanta**, 68, n. 4, p. 1329-1335, 2006.

VARGAS MAMANI, M. C.; REYES REYES, F. G.; RATH, S. Multiresidue determination of tetracyclines, sulphonamides and chloramphenicol in bovine milk using HPLC-DAD. **Food Chemistry**, 117, n. 3, p. 545-552, 2009.

VASCONCELOS, S. C.; RODRIGUES, E. M.; DE ALMEIDA, L. G.; LEPRI, F. G. *et al.* An improved drop casting electrochemical strategy for furosemide quantification in natural waters exploiting chemically reduced graphene oxide on glassy carbon electrodes. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 412, n. 26, p. 7123-7130, 2020.

VERA-CANDIOTI, L.; OLIVIERI, A. C.; GOICOECHEA, H. C. Development of a novel strategy for preconcentration of antibiotic residues in milk and their quantitation by capillary electrophoresis. **Talanta**, 82, n. 1, p. 213-221, 2010.

VISWANATHAN, P.; RAMARAJ, R. Chapter 2 - Functionalized Graphene Nanocomposites for Electrochemical Sensors. *In*: PANDIKUMAR, A. e RAMESHKUMAR, P. (Ed.). **Graphene-Based Electrochemical Sensors for Biomolecules**: Elsevier, 2019. p. 43-65.

WANG, H.; ZHAO, H.; QUAN, X.; CHEN, S. Electrochemical Determination of Tetracycline Using Molecularly Imprinted Polymer Modified Carbon Nanotube-Gold Nanoparticles Electrode. **Electroanalysis**, 23, n. 8, p. 1863-1869, 2011.

WANG, J.; CHEN, L.; ANGNES, L.; TIAN, B. Computerized pipettes with programmable dispensation. **Analytica Chimica Acta**, 267, n. 1, p. 171-177, 1992.

WANG, J.; TAHA, Z. Batch injection analysis. **Analytical Chemistry**, 63, n. 10, p. 1053-1056, 1991.

WANG, Y.; HU, G.; CAO, Y.; PENG, Z. *et al.* One-pot synthesis of pre-reduced graphene oxide for efficient production of high-quality reduced graphene oxide and its lithium storage application. **Materials Chemistry and Physics**, 265, p. 124523, 2021.



WANG, Y.; XIONG, H.; ZHANG, X.; YE, Y. *et al.* Nitromethane biosensor based on four heme proteins modified glassy carbon electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 674, p. 17-22, 2012.

WANGFUENGGANAGUL, N.; SIANGPROH, W.; CHAILAPAKUL, O. A flow injection method for the analysis of tetracycline antibiotics in pharmaceutical formulations using electrochemical detection at anodized boron-doped diamond thin film electrode. **Talanta**, 64, n. 5, p. 1183-1188, 2004.

XIAO, F.; ZHAO, F.; LI, J.; YAN, R. *et al.* Sensitive voltammetric determination of chloramphenicol by using single-wall carbon nanotube–gold nanoparticle–ionic liquid composite film modified glassy carbon electrodes. **Analytica Chimica Acta**, 596, n. 1, p. 79-85, 2007.

YADAV, M.; GANESAN, V.; GUPTA, R.; YADAV, D. K. *et al.* Cobalt oxide nanocrystals anchored on graphene sheets for electrochemical determination of chloramphenicol. **Microchemical Journal**, 146, p. 881-887, 2019.

YALIKUN, N.; MAMAT, X.; LI, Y.; HU, X. *et al.* Synthesis of an iron-nitrogen co-doped ordered mesoporous carbon-silicon nanocomposite as an enhanced electrochemical sensor for sensitive and selective determination of chloramphenicol. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 172, p. 98-104, 2018.

YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; PEDRERO, M.; CAMPUZANO, S.; PINGARRÓN, J. M. Electrocatalytic (bio)platforms for the determination of tetracyclines. **Journal of Solid State Electrochemistry**, 25, n. 1, p. 3-13, 2021.

YANG, R.; ZHAO, J.; CHEN, M.; YANG, T. *et al.* Electrocatalytic determination of chloramphenicol based on molybdenum disulfide nanosheets and self-doped polyaniline. **Talanta**, 131, p. 619-623, 2015.

YANG, X.; ZHU, J.; QIU, L.; LI, D. Bioinspired Effective Prevention of Restacking in Multilayered Graphene Films: Towards the Next Generation of High-Performance Supercapacitors. **Advanced Materials**, 23, n. 25, p. 2833-2838, 2011.

YIĞİT, A.; YARDİM, Y.; ÇELEBI, M.; LEVENT, A. *et al.* Graphene/Nafion composite film modified glassy carbon electrode for simultaneous determination of paracetamol, aspirin and caffeine in pharmaceutical formulations. **Talanta**, 158, p. 21-29, 2016.

YUAN, Y.; ZHANG, F.; WANG, H.; GAO, L. *et al.* A Sensor Based on Au Nanoparticles/Carbon Nitride/Graphene Composites for the Detection of Chloramphenicol and Ciprofloxacin. **ECS Journal of Solid State Science and Technology**, 7, n. 12, p. M201-M208, 2018.

YUE, X.; LI, Z.; ZHAO, S. A new electrochemical sensor for simultaneous detection of sulfamethoxazole and trimethoprim antibiotics based on graphene and ZnO nanorods modified glassy carbon electrode. **Microchemical Journal**, 159, p. 105440, 2020.

ZAABA, N. I.; FOO, K. L.; HASHIM, U.; TAN, S. J. *et al.* Synthesis of Graphene Oxide using Modified Hummers Method: Solvent Influence. **Procedia Engineering**, 184, p. 469-477, 2017.

ZARBIN, A. J. G.; OLIVEIRA, M. M. Nanoestruturas de carbono (nanotubos, grafeno): Quo Vadis? **Química Nova**, 36, p. 1533-1539, 2013.

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**, 178, p. 722-727, 2018.

ZHANEL, G. G.; HOMENUIK, K.; NICHOL, K.; NOREDDIN, A. *et al.* The Glycylcyclines. **Drugs**, 64, n. 1, p. 63-88, 2004.

ZHUANG, Y.; CAI, L.; CAO, G. Determination of Chloramphenicol by Voltammetric Method. **Journal of The Electrochemical Society**, 161, n. 3, p. H129-H132, 2014.

## APÊNDICE A. DEMAIS TRABALHOS PUBLICADOS COM GCE/RGO

Diante dos resultados satisfatórios com os antibióticos, o discente estendeu a aplicabilidade do sensor para dipirona em formulações farmacêuticas, ácido ascórbico em bebidas lácteas e sulfanilamida em amostras biológicas e ambiental.

Faria, L.V.; Lisboa, T.P.; Azevedo, G.C.; Sousa, R.A.; Matos, M.A.C.; Muñoz, R.A.A.; Matos, R.C. Chemically-reduced Graphene Oxide Sensor for Dipyrone Quantification in Pharmaceutical Samples Using Amperometric Detection. **Electroanalysis**, v. 31, p. 646-651, 2019, doi: 10.1002/elan.201800784.

Faria, L.V.; Lisboa, T.P.; Farias, D.M.; Araujo, F.M.; Machado, M.M.; Sousa, R.A.; Matos, M.A.C.; Muñoz, 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. 319, p. 126509, 2020, doi:10.1016/j.foodchem.2020.126509.

Faria, L. V.; Lisboa, T. P.; Matias, T. A.; Sousa, R. A.; Matos, M. A. C.; Muñoz, R. A. A.; Matos, R. C. Use of reduced graphene oxide for sensitive determination of sulfanilamide in synthetic biological fluids and environmental samples by batch injection analysis. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 892, p.115298, 2021, doi: 10.1016/j.jelechem.2021.115298.

## APÊNDICE B. PUBLICAÇÕES DURANTE A PÓS-GRADUAÇÃO

Lisboa, T.P.; de Faria, L.V.; Alves, G.F.; Matos, M.A.C.; Matos, R.C. Development of paper devices with conductive ink for sulfanilamide electrochemical determination in milk, synthetic urine, environmental and pharmaceutical samples. **Journal of solid state electrochemistry**, doi: 10.1007/s10008-021-05002-z.

de 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 fluoroquinolone determination in urine, pharmaceutical formulations, and milk samples using a reduced graphene oxide–modified glassy carbon electrode. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, volume especial (Promising Early-Career (Bio)Analytical Researchers), 2021.

de Faria, L.V.; Lisboa, T.P.; Alves, G.F.; Campos, N.S.; Matos, M.A.C.; Munoz, R.A.A.; Matos, R.C.. Electrochemical methods for the determination of antibiotic residues in milk: a critical review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1173, p. 338569, 2021.

de Faria, L.V.; Lisboa, T.P.; Sousa, R.A.; Matos, M.A.C.; Munoz, R.A.A.; Matos, R.C.. Use of reduced graphene oxide for sensitive determination of sulfanilamide in biological fluids and environmental samples by batch injection analysis. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 892, p.115298, 2021.

Silva, L.P.; Campos, N.S.; Lisboa, T.P.; de Faria, L.V.; Matos, M.A.C.; Matos, R.C.; Sousa, R.A.. Simultaneous determination of cadmium, lead, and copper in chocolate samples by Square Wave Anodic Stripping Voltammetry. **Food Additives and Contaminants Part A-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment**, v. 38, p. 418-426, 2021.

Lisboa, T.P.; Lemos, L.C.S.; Calzavara, F.C.; Barbosa, B.S.; Baia, G.E.; Farias, D.M.; de Faria, L.V.; Matos, M.A.C.; Silva, J.C.J.; de Oliveira, M.A.L.. Ecofriendly and low-cost sample preparation methods for magnesium determination in beer by flame atomic absorption spectrometry. **Eclética Química Journal**, v. 46, p. 33-41, 2021.

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.

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**, v. 33, p. 543-549, 2020.

Farias, D.M.; de Faria, L.V.; Lisboa, T.P.; Matos, M.A.C.; Munoz, R.A.A.; Matos, R.C.. Determination of levofloxacin in pharmaceutical formulation and urine at reduced graphene oxide and carbon nanotube modified electrodes. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 24, p. 1165–1173, 2020.

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. 319, p. 126509, 2020.

Nogueira, F.S.; Araujo, F.M.; de Faria, L.V.; Lisboa, T.P.; Azevedo, G.C.; Dornellas, R.M.; Matos, M.A.C.; Matos, R.C.. Simultaneous determination of strobilurin fungicides residues in bean samples by HPLC-UV-AD using boron-doped diamond electrode. **Talanta**, v. 216, p. 120957, 2020.

Lisboa, T.P.; de Faria, L.V.; Matos, M.A.C.; Matos, R.C.; Sousa, R.A.. Simultaneous determination of cadmium, lead, and copper in the constituent parts of the illegal cigarettes by Square Wave Anodic Stripping Voltammetry. **Microchemical Journal**, v. 150, p. 104183, 2019.

de Faria, L.V.; Pereira, J.F.S.; Azevedo, G.C.; Matos, M.A.C.; Muñoz, R.A.A.; Matos, R.C.. 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, n. 9, 1947-1954, 2019.

de Faria, L.V.; Lisboa, T.P.; Azevedo, G.C.; Sousa, R.A.; Matos, M.A.C.; Munoz, R.A.A.; Matos, R.C.. Chemically-reduced Graphene Oxide Sensor for Dipyrone Quantification in Pharmaceutical Samples Using Amperometric Detection. **Electroanalysis**, v. 31, p. 646-651, 2019.

de Faria, L.V.; Lima, A.P.; Araujo, F.M.; Lisboa, T.P.; Matos, M.A.C.; Munoz, R.A.A.; Matos, R.C.. High-throughput amperometric determination of tetracycline residues in milk and quality control of pharmaceutical formulations: flow-injection versus batch-injection analysis. **Analytical Methods**, v. 11, p. 5328-5336, 2019.

de Faria, L.V.; Lisboa, T.P.; Carvalho, G.S.; Sousa, R.A.; Matos, M.A.C.; Matos, R.C.. Experimental design for metals extraction from facial cosmetic samples and determination by square wave voltammetry. **Analytical Methods**, v. 10, p. 5327-5334, 2018.

Mansur, A.A.P.; de Almeida, C.G.; de Carvalho, S.M.; de Faria, L.V.; de Almeida, M.V.; Mansur, H.S.. Cytocompatible Fluorescent Quantum Dot/PEG-Chitosan Bioconjugates for Nanomedicine Applications. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2015, p. 4555-4564, 2015.

## APÊNDICE C. PARTICIPAÇÕES EM CONGRESSOS CIENTÍFICOS

Faria, L.V.; Matos, R.C. Análise eletroquímica de metais em amostras de cosméticos faciais por voltametria de onda quadrada. 21º Simpósio Internacional de Eletroquímica e Eletroanalítica (SIBEE), 2017, Natal-RN.

Faria, L.V.; Matos, R.C.; Muñoz, R.A.A. Análise de ciprofloxacina em amostras de fármacos e leite utilizando eletrodo modificado com grafeno e voltametria de onda quadrada. 19º Encontro Nacional de Química Analítica e 7º Congresso Iberoamericano de Química Analítica, 2018, Caldas Novas-GO.

Faria, L.V.; Lisboa, T.P.; Sousa, R.A.; Matos, M.A.C.; Matos, R.C.; Munoz, R.A.A.. Quantification of dipyrone in drugs using amperometry with a graphene-modified electrode and flame atomic emission spectrometry. 19º Encontro Nacional de Química Analítica e 7º Congresso Iberoamericano de Química Analítica, 2018, Caldas Novas-GO.

Faria, L.V.; Muñoz, R. A. A.; Matos, R. C. Análise de tetraciclina em amostras de leite usando eletrodo modificado com óxido de grafeno reduzido e amperometria. 32º Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química de Minas Gerais, 2018, Juiz de Fora - MG.

Farias, D.M.; de Faria, L.V.; Lisboa, T.P.; Matos, R.C. Quantificação de zinco em suplementos proteicos usando eletrodo de carbono vitreo modificado com bismuto. XXXII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química de Minas Gerais, 2018, Juiz de Fora – MG.

## APÊNDICE D. TRABALHOS SUBMETIDOS

de Faria, L.V.; Lisboa, T.P.; Matos, M.A.C.; Muñoz, R.A.A.; Matos, R.C. A simple and sensitive electrochemical method using reduced graphene oxide modified glassy carbon electrode for monitoring chloramphenicol residues in milk samples. *Food Analytical Methods*.

de Faria, L.V.; Alves, G.F.; Lisboa, T.P.; Matos, M.A.C.; Muñoz, R.A.A.; Matos, R.C. Simple and fast batch injection analysis method for evaluation diuron herbicide residues in juice and tap water samples using reduced graphene oxide sensor. *Journal of Food Composition and Analysis*.