

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO DE SENSORES ELETROQUÍMICOS À
BASE DE COMPÓSITOS PARA A DETERMINAÇÃO
SIMULTÂNEA DE FÁRMACOS**

Anderson Martin dos Santos*

Tese apresentada como parte dos requisitos para a
obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS,
área de concentração: QUÍMICA ANALÍTICA.

Orientador: Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho

***Bolsista CNPq**

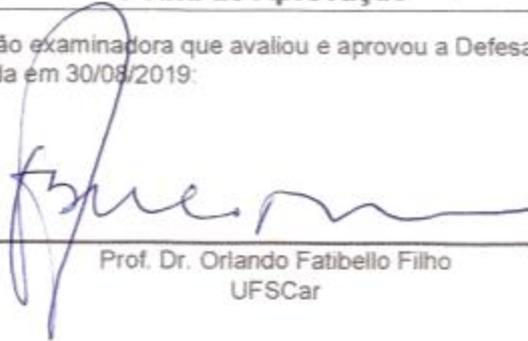
SÃO CARLOS

2019

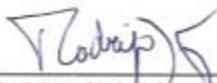


Folha de Aprovação

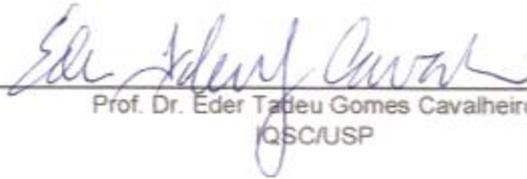
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Anderson Martin dos Santos, realizada em 30/08/2019:



Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho
UFSCar



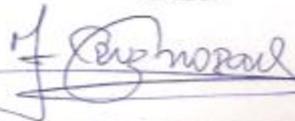
Prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Munoz
UFU



Prof. Dr. Eder Tadeu Gomes Cavalheiro
QSC/USP



Profa. Dra. Maria Del Pilar Taboada Sotomayor
UNESP



Prof. Dr. Fernando Cruz de Moraes
UFSCar

*A toda minha família que, com muito amor, carinho, dedicação, paciência e incentivo,
não mediram esforços para que eu conseguisse chegar até esta
etapa da minha caminhada.*

Amo vocês!

DEDICO

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”

Arthur Schopenhauer

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”

Albert Einstein

Agradecimentos

A Deus por me dar força e sabedoria nos momentos difíceis;

Aos meus pais, Natalino e Sueli, pela confiança em mim depositada e todo amor e carinho;

À Adriana, pelo carinho e paciência, além de todo apoio durante esse percurso;

Ao Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho pela orientação, incentivo, paciência e amizade que foram essenciais durante todo este período;

Ao Dr. Ademar Wong por se mostrar sempre pronto para discussão e sugestões que foram essenciais para aprimorarem este trabalho, e também pela paciência e amizade;

Aos amigos e colegas do LABBES e LABIE, pelos momentos de discussão científica e também de descontração;

Aos demais familiares e amigos, que mesmo distantes contribuíram para o meu sucesso;

Aos Professores do Departamento de Química da UFSCar pelos seus ensinamentos;

Ao Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química da UFSCar pela oportunidade;

A todos os funcionários do DQ, especialmente às secretárias Ariane, Luciane e Cristina pela atenção e colaboração;

Aos órgãos de fomento FAPESP e, principalmente, ao CNPq pela bolsa concedida (Proc. 160150/2015).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Lista de Abreviaturas e Símbolos

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BR	Tampão “Britton-Robinson”
CB	Negro de fumo (do inglês “ <i>Carbon Black</i> ”)
CPE	Eletrodo de pasta de carbono (do inglês “ <i>Carbon Paste Electrode</i> ”)
CIP	Ciprofloxacina
CTS	Quitosana (do inglês “ <i>Chitosan</i> ”)
CV	Voltametria cíclica (do inglês “ <i>Cyclic voltammetry</i> ”)
DPV	Voltametria de pulso diferencial (do inglês “ <i>Differential Pulse Voltammetry</i> ”)
EPH	Epicloridrina (do inglês “ <i>Epichlorohydrin</i> ”)
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva (do inglês “ <i>Energy Dispersive Spectroscopy</i> ”)
EIS	Espectroscopia de impedância eletroquímica (do inglês “ <i>Electrochemical Impedance Spectroscopy</i> ”)
FG	Grafeno funcionalizado (do inglês “ <i>Functionalized Graphene</i> ”)
FG _r	Grafite funcionalizado (do inglês “ <i>Functionalized Grafite</i> ”)
GCE	Eletrodo de carbono vítreo (do inglês “ <i>Glassy Carbon Electrode</i> ”)
GRA	Grafeno
Gr	Grafite
IL	Líquido iônico (do inglês “ <i>Ionic Liquid</i> ”)
LVD	Levodopa
LEV	Levofloxacina
LOD	Limite de detecção (do inglês “ <i>Limit of Detection</i> ”)
MCB	Metocarbamol
NF	Nafion

OFX	Ofloxacina
PAR	Paracetamol
PEDOT:PSS	Poli (3,4-etilenodioxítiofeno) -poli (estirenosulfonato)
pH	Potencial hidrogeniônico
PRX	Piroxicam
PRO	Propranolol
RSD	Desvio-padrão relativo (do inglês “ <i>Relative Standard Deviation</i> ”)
SAL	Salbutamol
SEM	Microscopia eletrônica de varredura (do inglês “ <i>Scanning Electron Microscopy</i> ”)
SWAdASV	Voltametria adsortiva de redissolução anódica por onda quadrada (do inglês “ <i>Square-Wave Adsorptive Anodic Stripping Voltammetry</i> ”)
SWV	Voltametria de onda quadrada (do inglês “ <i>Square-Wave Voltammetry</i> ”)
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão (do inglês “ <i>Transmission Electron Microscopy</i> ”)
XPS	Espectrometria de fotoelétrons excitados por raios-X (do inglês “ <i>X-ray excited photoelectron spectrometry</i> ”)
β CD	β -ciclodextrina
a	Amplitude
A	Área eletroativa
D	Coeficiente de difusão
α	Coeficiente de transferência de carga
C	Concentração
k^0	Constante heterogênea de transferência de elétrons
I	Corrente

I_p	Corrente de pico
f	Frequência de aplicação de pulsos de potencial
Hz	<i>Hertz</i>
ΔE_s	Incremento de potencial
n	Número de elétrons
E	Potencial
E_p	Potencial de pico
Ψ	Parâmetro cinético da equação de Nicholson
v	Velocidade de varredura de potencial
V	<i>Volt</i>
R_{ct}	Resistência de transferência de carga

Lista de Tabelas

TABELA 3.1 – Parâmetros experimentais da técnica de SWAdASV otimizados para a determinação simultânea de PAR e CIP	51
TABELA 3.2 – Comparação dos parâmetros analíticos obtidos para a determinação simultânea de PAR e CIP	54
TABELA 3.3 – Estudo da repetibilidade intra- e inter-dia da determinação voltamétrica simultânea de PAR e CIP em diferentes concentrações.....	55
TABELA 3.4 – Efeito de possíveis interferentes na determinação voltamétrica simultânea de PAR 0,80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e CIP 0,80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ na razão de 1:10 m/m (analito/possíveis interferentes).....	56
TABELA 3.5 – Determinação simultânea de PAR e CIP em amostras de fluidos biológicos utilizando SWAdASV e um NiONPs-FG-CTS:EPH/GCE.....	57
TABELA 4.1 – Coeficientes angulares dos gráficos de ΔI_p vs. $v^{1/2}$ obtidos do estudo de velocidade de varredura de potencial por CV e respectiva área eletroativa.	68
TABELA 4.2 – Parâmetros experimentais das técnicas SWV e DPV otimizados para a determinação simultânea de SAL e PRO	74
TABELA 4.3 – Comparação dos parâmetros analíticos na determinação de SAL e PRO utilizando diferentes sensores.....	79
TABELA 4.4 – Determinação simultânea de SAL e PRO em amostras de fluidos biológicos.....	81
TABELA 5.1 – Otimização dos parâmetros experimentais da técnica de SWV para a determinação simultânea de PAR e LEV	93
TABELA 5.2 – Comparação de parâmetros analíticos para determinação de PAR e LEV empregando-se vários eletrodos modificados	99
TABELA 5.3 – Efeito de possíveis interferentes na determinação voltamétrica simultânea de PAR e LEV na proporção de 1:1 (analito: interferente).....	100

TABELA 5.4 – Determinação simultânea de PAR e LEV em amostras de água de rio e urina utilizando SWV e o sensor AgNPs-CB-PEDOT:PSS/GCE.....	101
TABELA 6.1 – Parâmetros analíticos registrados para a determinação simultânea de LVD, PRX, OFX e MCB usando SWV e o sensor proposto.....	122
TABELA 6.2 – Efeito de possíveis interferentes na determinação voltamétrica de LVD, PRX, OFX e MCB em meio fosfato 0,10 mol L ⁻¹ (pH 4,0) usando o sensor βCD-FGr/CPE.....	123
TABELA 6.3 – Resultados obtidos para a determinação simultânea de LVD, PRX, OFX e MCB em amostras de água de rio e urina sintética utilizando o método voltamétrico proposto e o procedimento comparativo espectrofotométrico	125

Lista de Figuras

FIGURA 1.1 – Representação da estrutura química do (A) grafeno e do (B) grafeno funcionalizado.	6
FIGURA 1.2 – Representação esquemática das nanopartículas de CB e respectivas estruturas formadas. Adaptado de Silva <i>et al.</i> ³³	7
FIGURA 1.3 – Representação da estrutura química do tetrafluoroborato de 1- butil-3-metilimidazólio.	10
FIGURA 1.4 – Representação da estrutura química e espacial da α , β e γ -CD.11	
FIGURA 1.5 – Representação da estrutura química da (A) quitina e (B) quitosana.	12
FIGURA 1.6 – Representação da estrutura química do polímero Nafion®.	14
FIGURA 1.7 – Representação da estrutura química do polímero PEDOT:PSS.	15
FIGURA 1.8 – Representação das fórmulas estruturais da (A) ciprofloxacina e (B) (S)-levofloxacina.	17
FIGURA 1.9 – Representação da fórmula estrutural do paracetamol.	18
FIGURA 1.10 – Representação da fórmula estrutural do (R,S)-salbutamol (SAL).	19
FIGURA 1.11 – Representação da fórmula estrutural do (R,S)-propranolol (PRO).	20
FIGURA 1.12 – Representação das fórmulas estruturais da (A) (S)-levodopa, (B) piroxicam, (C) (R,S)-ofloxacina e (D) metocarbamol.	22
FIGURA 3.1 – Representação da célula eletroquímica contendo os três eletrodos.	29
FIGURA 3.2 – Representação esquemática do processo de funcionalização do GRA.	30
FIGURA 3.3 – (A) Preparação da dispersão e (B) método de <i>drop-casting</i>	31

FIGURA 3.4 – Dispersões de GRA e FG em água ultrapura após (A) 0, (B) 30 e (C) 60 min.	34
FIGURA 3.5 – Ângulo de contato da amostra: (A) GCE, (B) GRA-GCE e (C) FG-GCE.	35
FIGURA 3.6 – Espectro XPS de alta resolução C 1s do (A) GRA e (B) FG. Insete: espectro XPS.	36
FIGURA 3.7 – Imagem SEM do (A) GRA, (B) FG e (C-E) NiONPs-FG; (F) Histograma correspondente dos diâmetros das NiONPs. (G - I) Imagens de TEM obtidas para FG.....	38
FIGURA 3.8 – Voltamogramas cíclicos para uma solução de NaOH 0,1 mol L ⁻¹ empregando NiONPs-FG-CTS:EPH/GCE a uma velocidade de varredura de potencial (v) de 50 mV s ⁻¹	39
FIGURA 3.9 – Voltamogramas cíclicos para 1,0 mmol L ⁻¹ de [Fe(CN) ₆] ³⁻ em solução de KCl 0,10 mol L ⁻¹ empregando (A) GCE, (B) GRA-CTS:EPH/GCE, (C) FG-CTS:EPH/GCE e (D) NiONPs-FG-CTS:EPH/GCE para diferentes velocidades de varredura de potencial (v) (10, 20, 30, 40, 50, 75, 100; 150; 200; 250; 300; 350 e 400 mV s ⁻¹). (E) Gráficos de I_p vs. $v^{1/2}$ obtidos para os diferentes eletrodos.....	41
FIGURA 3.10 – Diagramas de Nyquist obtidos para (■) GCE, (●) GRA-CTS:EPH/GCE, (▲) FG-CTS:EPH/GCE e (▼) NiONPs-FG-CTS:EPH/GCE empregando como sonda redox o par [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} na concentração de 2,5 mmol L ⁻¹ em solução de KCl 0,10 mol L ⁻¹ . Intervalo de frequência de 100 KHz a 0,1 Hz.....	43
FIGURA 3.11 – Voltamogramas cíclicos para PAR 0,10 mmol L ⁻¹ (A), CIP 0,050 mmol L ⁻¹ (B) e PAR e CIP simultaneamente (C). Solução tampão fosfato 0,20 mol L ⁻¹ (pH 6,0) a uma $v = 50$ mV s ⁻¹	45
FIGURA 3.12 – Voltamogramas de SW registrados para 0,10 mmol L ⁻¹ de PAR e CIP em tampão fosfato 0,20 mol L ⁻¹ com pH variando de 2,0 a 8,0 empregando	

- o sensor NiONPs-FG-CTS:EPH/GCE. Parâmetros: $f = 70$ Hz, $a = 50$ mV $\Delta E_s = 4$ mV s^{-1} . Inserido: gráfico de E_p vs. pH.47
- FIGURA 3.13** – Voltamogramas cíclicos obtidos para diferentes velocidades de varredura (10 - 400 mV s^{-1}) usando o sensor NiONPs-FG-CTS:EPH/GCE, para (A) 0,10 mmol L^{-1} PAR e (B) 0,050 mmol L^{-1} CIP em tampão fosfato 0,20 mol L^{-1} (pH 6,0). Gráficos de (i) $\log I_p$ vs. $\log v$; (ii) I_p vs. v e (iii) I_p vs. $v^{1/2}$49
- FIGURA 3.14** – Voltamogramas SWAdAS obtidos utilizando um sensor NiONPs-FG-CTS:EPH/GCE para várias concentrações de: (A) PAR (a – h: 0; 0,10; 0,30; 0,50; 0,79; 9,9; 2,0 e 2,9 $\mu\text{mol } L^{-1}$) a uma concentração fixa de CIP (0,60 $\mu\text{mol } L^{-1}$); (B) CIP (i – p: 0; 0,040; 0,079; 0,20; 0,39; 0,58; 0,78 e 0,97 $\mu\text{mol } L^{-1}$) a uma concentração fixa de PAR (0,90 $\mu\text{mol } L^{-1}$). Eletrólito suporte: solução tampão fosfato 0,20 mol L^{-1} (pH: 6,0). Condições de SWAdASV: $E_{pc} = 0$, $t_{pc} = 45$ s, $a = 30$ mV, $f = 80$ Hz, e $\Delta E_s = 4$ mV. Inseridos: curvas analíticas correspondentes.52
- FIGURA 3.15** – (A) Voltamogramas de SWAdAS obtidos utilizando um sensor NiONPs-FG-CTS:EPH/GCE para várias concentrações de PAR (a – h: 0; 0,10; 0,30; 0,50; 0,79; 9,9; 2,0 e 2,9 $\mu\text{mol } L^{-1}$) e CIP (i – p: 0; 0,040; 0,079; 0,20; 0,39; 0,58; 0,78 e 0,97 $\mu\text{mol } L^{-1}$). Eletrólito suporte: solução de tampão fosfato 0,20 mol L^{-1} (pH: 6,0). Condições de SWAdASV: $E_{pc} = 0$, $t_{pc} = 45$ s, $a = 30$ mV, $f = 80$ Hz, e $\Delta E_s = 4$ mV. (B) e (C) curvas analíticas correspondentes.....53
- FIGURA 4.1** – Representação esquemática da síntese das AgNPs.61
- FIGURA 4.2** – Representação esquemática do procedimento de preparação do GCE modificado.62
- FIGURA 4.3** – SEM (A) FG, (B) FG-IL e (C) AgNPs-IL-FG e (D) Histograma correspondente ao diâmetro das AgNPs.....64
- FIGURA 4.4** – Imagem da superfície (187 $\mu\text{m} \times 249\mu\text{m}$) do GCE modificada com AgNPs-IL-FG-NF. (A) imagem planar (2D) e (B) imagem topográfica (3D). ..65

FIGURA 4.5 – Voltamogramas cíclicos obtidos para $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução de $\text{KCl } 0,10 \text{ mol L}^{-1}$ empregando (--) GCE, (- -) FG-NF/GCE, (---) IL-FG-NF/GCE, (---) AgNPs-FG-NF/GCE e (---) AgNPs-IL-FG-NF/GCE. $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ 66

FIGURA 4.6 – Voltamogramas cíclicos obtidos para $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução de $\text{KCl } 0,10 \text{ mol L}^{-1}$ empregando (A) GCE, (B) FG-NF/GCE, (C) IL-FG-NF/GCE, (D) AgNPs-FG-NF/GCE e (E) AgNPs-IL-FG-NF/GCE para diferentes velocidades de varredura de potencial (10, 20, 30, 40, 50, 75, 100; 150; 200; 250; 300; 350 e 400 mV s^{-1}). (F) Gráficos de ΔI_{pa} vs. $\nu^{1/2}$ e ΔI_{pc} vs. $\nu^{1/2}$ 67

FIGURA 4.7 – Diagramas de EIS obtidos para uma solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ em $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ KCl . Intervalo de frequência de 100 KHz a 0,1 Hz. Inserido: Circuito equivalente de Randles..... 70

FIGURA 4.8 – Voltamogramas cíclicos obtidos para SAL e PRO $0,20 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução de tampão fosfato $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) a uma $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ 71

FIGURA 4.9 – SWV registrados para SAL e PRO (ambos na concentração de $3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) em solução de tampão fosfato $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ com uma variação de pH de 5,0 a 9,0 empregando o sensor AgNPs-IL-FG-NF/GCE. Parâmetros: $f = 30 \text{ Hz}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 4 \text{ mV s}^{-1}$. Inserido: gráficos de E_p vs. pH..... 72

FIGURA 4.10 – Voltamogramas cíclicos obtidos para diferentes velocidades de varredura de potencial ($10 - 400 \text{ mV s}^{-1}$) usando o sensor AgNPs-IL-FG-NF/GCE, para (A) $0,20 \text{ mmol L}^{-1}$ de SAL e (B) $0,20 \text{ mmol L}^{-1}$ de PRO, ambos em solução tampão fosfato $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). Gráficos: (i) I_p vs. $\nu^{1/2}$ e (ii) $\log I_p$ vs. $\log \nu$ 75

FIGURA 4.11 – Voltamogramas de SW obtidos utilizando o sensor AgNPs-IL-FG-NF/GCE para diferentes concentrações de: (A) SAL: 0,079; 0,30; 0,59; 0,97; 1,9 e $2,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ a uma concentração fixa de PRO ($1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$); (B) PRO: 0,10; 0,30; 0,59; 0,97; 1,9 e $2,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ a uma concentração fixa de SAL ($2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) em solução tampão fosfato $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ (pH: 7,0). Inseridos: curva

- analítica correspondente. Parâmetros da SWV: $f = 30$ Hz, $a = 50$ mV e $\Delta E_s = 9$ mV.77
- FIGURA 4.12** – Voltamogramas de SW obtidos utilizando o sensor AgNPs-IL-FG-NF/GCE para diferentes concentrações de SAL (a – f: 0,079; 0,30; 0,59; 0,97; 1,9 e 2,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e PRO (g – l: 0,10; 0,30; 0,59; 0,97; 1,9 e 2,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em solução tampão fosfato 0,20 mol L^{-1} (pH: 7,0). Curvas analíticas obtidas para (i) SAL e (ii) PRO. Parâmetros da SWV: $f = 30$ Hz, $a = 50$ mV e $\Delta E_s = 9$ mV.78
- FIGURA 5.1** – Representação esquemática do procedimento de preparação do GCE modificado.84
- FIGURA 5.2** – Imagens de SEM do CB em diferentes ampliações (A-C), imagem SEM do CB e AgNPs (D), espectro EDS (D, inserido), imagem de TEM das AgNPs (E) e histograma (F).88
- FIGURA 5.3** – Diagramas EIS para $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 1,9 mmol L^{-1} em KCl 0,10 mol L^{-1} . Intervalo de frequência de 100 KHz a 0,1 Hz. Circuito equivalente adaptado de Randles (inserido), nos quais o R_s é a resistência do eletrólito suporte, R_{ct} é a resistência de transferência de carga, CPE é o elemento de fase constante e W é a impedância de Warburg.89
- FIGURA 5.4** – Voltamogramas cíclicos obtidos para PAR 0,12 mmol L^{-1} e LEV 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em diferentes eletrodos (GCE, PEDOT:PSS/GCE, CB-PEDOT:PSS/GCE e AgNPs-CB-PEDOT:PSS/GCE). Condições de análise: $\nu = 50$ mVs^{-1} e tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 6,0).90
- FIGURA 5.5** – (A) Voltamogramas de SW obtidos empregando-se o sensor AgNPs-CB-PEDOT:PSS/GCE para PAR 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e LEV 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em soluções de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} com pH variando de 3,0 a 9,0 (inserido: Gráficos de E_p vs. pH). Condições da SWV: $f = 15$ Hz, $a = 75$ mV e $\Delta E_s = 7$ mV. (B) Gráficos de barras I_p vs. pH obtidos para PAR e LEV.92
- FIGURA 5.6** – Voltamogramas cíclicos obtidos para o sensor AgNPs-CB-PEDOT:PSS/GCE em solução de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 6,0) em diferentes velocidades de varredura de potencial (10 – 200 mV s^{-1}) na presença

- de (A) PAR $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e (B) LEV $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Gráficos de (i) ΔI_p vs. v ; (ii) ΔI_p vs. $v^{1/2}$ e (iii) $\log \Delta I_p$ vs. $\log v$95
- FIGURA 5.7** – Voltamogramas de SW obtidos utilizando AgNPs-CB-PEDOT:PSS/GCE em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0) contendo: (A) LEV $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e diferentes concentrações de PAR (a) 0,62; (b) 1,2; (c) 2,5; (d) 3,6; (e) 5,0 e (f) $6,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, (B) PAR $3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e diferentes concentrações de LEV: (g) 0,67; (h) 1,3; (i) 2,5; (j) 5,0; (k) 7,2 e (l) $9,9 \mu\text{mol L}^{-1}$. Curvas analíticas (inseridas).97
- FIGURA 5.8** – Voltamogramas de SW obtidos utilizando-se AgNPs-CB-PEDOT:PSS/GCE em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0) contendo diferentes concentrações de PAR (a) 0,62; (b) 1,2; (c) 2,5; (d) 3,6; (e) 5,0; (f) 6,0 e (g) $7,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ e de LEV: (h) 0,67; (i) 1,3; (j) 2,5; (k) 5,0; (l) 7,2; (m) 9,9 e (n) $12 \mu\text{mol L}^{-1}$. Curvas analíticas (inseridas).98
- FIGURA 6.1** – Representação esquemática do processo de funcionalização do Gr. 105
- FIGURA 6.2** – Esquema do eletrodo utilizado. (1) Corte lateral do eletrodo com as respectivas camadas, (2) tubo cilíndrico de Teflon®, haste de metal e o poço para preenchimento com a pasta de carbono modificada, (3) $\beta\text{CD-FGr/CPE}$ pronto para uso. 106
- FIGURA 6.3** – Imagem de SEM obtida para (A) Gr; (B) FGr sintetizado; ângulo de contato com água para: (C) Gr, (D) FGr e (E) espectros de EDS correspondentes ao (i) Gr e (ii) FGr. 109
- FIGURA 6.4** – Dispersões de FGr e Gr em água ultrapura após (A) 0, (B) 30 e (C) 60 min. 109
- FIGURA 6.5** – Voltamogramas cíclicos obtidos para $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução de KCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ com (A) Gr/CPE, (B) FGr/CPE e (C) $\beta\text{CD-FGr/CPE}$ em diferentes velocidades de varredura de potenciais (10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350 e 400 mV s^{-1}). (D) Gráficos de I_p vs. $v^{1/2}$ 111

- FIGURA 6.6** – Voltamogramas obtidos usando Gr/CPE(–), FGr/CPE(–) e β CD-FGr/CPE(–) em solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 7,0). (A) CV contendo $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ (LVD, OFX e MCB) e $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (PRX). $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$. (B) SWV contendo $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ de LVD e OFX e $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ PRX e MCB. Parâmetros da SWV: $f = 20 \text{ Hz}$, $a = 75 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$ 113
- FIGURA 6.7** – Voltamogramas cíclicos obtidos em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes pHs (3,0 – 8,0) contendo $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ de LVD, PRX, OFX e $0,30 \text{ mmol L}^{-1}$ de MCB usando o β CD-FGr/GCE. Inserido: gráficos de E_p vs. pH. 115
- FIGURA 6.8** – (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos em diferentes eletrólitos suporte $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,0 (BR, acetato e fosfato) contendo $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ de LVD, PRX, OFX e $0,30 \text{ mmol L}^{-1}$ de MCB. Parâmetros da SWV: $f = 70 \text{ Hz}$, $A = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$. (B) Gráfico de I_p vs. Analito para as diferentes soluções de eletrólito suporte. 117
- FIGURA 6.9** – Voltamogramas de SW obtidos utilizando o β CD-FGr/CPE para várias concentrações de: (A) LVD ($1,0$ a $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) a uma concentração fixa de PRX ($7,0 \mu\text{mol L}^{-1}$), OFX ($10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) e MCB ($25,0 \mu\text{mol L}^{-1}$); (B) PRX ($1,0$ a $15,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) a uma concentração fixa de LVD ($10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$), OFX ($10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) e MCB ($25,0 \mu\text{mol L}^{-1}$); (C) OFX ($1,0$ a $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) a uma concentração fixa de LVD ($10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$), PRX ($7,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) e MCB ($25,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) e (D) MCB ($1,0$ a $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) a uma concentração fixa de LVD ($10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$), PRX ($7,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) e OFX ($10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$). Eletrólito suporte: meio fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0). Parâmetros da SWV: $f = 20 \text{ Hz}$, $a = 70 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$. Curvas analíticas (inseridas). 120
- FIGURA 6.10** – Voltamogramas de SW registrados em solução de meio fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 4,0) contendo diferentes níveis de concentração de (A) LVD (1-7: 0; 1,0; 5,0, 8,0; 10; 15 e $20 \mu\text{mol L}^{-1}$), PRX (8-14: 0; 1,0; 3,0; 5,0; 7,0; 10 e $15 \mu\text{mol L}^{-1}$), OFX (15-21: 0; 1,0; 5,0; 8,0; 10; 15 e $20 \mu\text{mol L}^{-1}$), MCB (22-28: 0; 1,0; 5,0; 10; 25; 40 e $50 \mu\text{mol L}^{-1}$) utilizando o β CD-FGr/CPE. Curva analítica

obtida para **(B)** LVD, **(C)** PRX, **(D)** OFX e **(E)** MCB. Condições da técnica de SWV: $f = 20$ Hz, $a = 70$ mV e $\Delta E_s = 5$ mV..... 121

Resumo

DESENVOLVIMENTO DE SENSORES ELETROQUÍMICOS À BASE DE COMPÓSITOS PARA A DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE FÁRMACOS

Nesta tese de doutorado foram explorados diferentes materiais de carbono para o desenvolvimento de novas plataformas de sensores eletroquímicos. Assim, inicialmente foi proposto um eletrodo de carbono vítreo modificado com grafeno funcionalizado e nanopartículas de óxido de níquel em um filme de quitosana. Este sensor foi utilizado para a determinação simultânea de paracetamol e ciprofloxacina em amostras de fluídos biológico empregando a voltametria adsortiva de redissolução anódica por onda quadrada. As curvas analíticas apresentaram faixa de concentração linear de 0,10 a 2,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o paracetamol e de 0,040 a 0,97 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para a ciprofloxacina, com limites de detecção de 6,7 e 6,0 nmol L^{-1} , respectivamente. Em seguida, realizou-se a determinação de salbutamol e propranolol simultaneamente em amostras de urina sintética e soro. Para isso, o eletrodo de carbono vítreo foi modificado com grafeno funcionalizado, líquido iônico e nanopartículas de prata imobilizados em um filme de Nafion[®]. A determinação eletroquímica forneceu faixas de concentração linear de 0,079 a 2,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o salbutamol e de 0,10 a 2,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o propranolol com limites de detecção de 13 e 17 nmol L^{-1} , respectivamente. Posteriormente, foi desenvolvido um sensor baseado na modificação do eletrodo de carbono vítreo com um filme de *carbon black*, nanopartículas de prata e poli(3,4-etilenodioxitiofeno): poli(estireno sulfonato). A viabilidade e eficiência deste sensor foi verificada a partir da determinação simultânea de paracetamol e levofloxacina em amostras ambiental e biológica, no qual apresentou uma resposta linear de 0,62 a 7,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o paracetamol e de 0,67 a 1,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para a levofloxacina com limites de detecção de 12 e 14 nmol L^{-1} , respectivamente. Finalmente, na última parte deste trabalho, um eletrodo de pasta de carbono foi modificado com grafite funcionalizada e β -

ciclodextrina. A potencialidade eletroanalítica da nova arquitetura sensorial foi investigada frente à aplicabilidade da determinação simultânea de levodopa, piroxicam, ofloxacina e metocarbamol em amostras de urina sintética e água de rio, sendo os limites de detecção obtidos iguais a 65, 105, 89 e 400 nmol L⁻¹, respectivamente. Ademais, todas as modificações realizadas foram caracterizadas morfológicamente utilizando microscopia eletrônica de varredura, microscopia eletrônica de transmissão, espectroscopia de energia dispersiva e/ou ângulo de contato e, também eletroquimicamente empregando a voltametria cíclica e/ou espectroscopia de impedância eletroquímica. Além disso, a seletividade, precisão e exatidão dos métodos propostos foram avaliadas por meio de estudos de possíveis interferentes, repetibilidade intra- e inter-dias e comparação com espectroscopia UV-Vis, respectivamente.

Palavras-chave: grafeno, grafite, negro de fumo, sensores eletroquímicos, fármacos, determinação simultânea.

Abstract

DEVELOPMENT OF ELECTROCHEMICAL SENSORS BASED ON COMPOSITES FOR THE SIMULTANEOUS DETERMINATION OF DRUGS

In this doctoral thesis different carbon materials were explored for the development of novel electrochemical sensor platforms. Thus, a glassy carbon electrode modified with a functionalized graphene film, chitosan and nickel oxide nanoparticles was initially proposed. This sensor was used for the simultaneous determination of paracetamol and ciprofloxacin in biological fluid samples using square wave adsorptive anodic stripping voltammetry. Analytical curves were a linear in the concentration range of 0.10 to 2.9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for acetaminophen and of 0.040 to 0.97 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for ciprofloxacin, with limits of detection of 6.7 and 6.0 nmol L^{-1} , respectively. Next, salbutamol and propranolol were determined simultaneously in synthetic urine and serum samples. For this, a glassy carbon electrode was modified with functionalized graphene, ionic liquid and silver nanoparticles all immobilized in a Nafion[®] film. The electrochemical determination provided linear concentration ranges of 0.079 to 2.9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for salbutamol and of 0.10 to 2.9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for propranolol with limits of detection of 13 and 17 nmol L^{-1} , respectively. Subsequently, a sensor based on the modification of a glassy carbon electrode with a carbon black film, silver nanoparticles and poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-poly(styrenesulfonate) was developed. The viability and efficiency of this sensor was verified by the simultaneous determination of paracetamol and levofloxacin in environmental and biological samples, with a linear response of 0.62 to 7.1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for paracetamol and of 0.67 to 1.2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for levofloxacin with limits of detection of 12 and 14 nmol L^{-1} , respectively. Finally, in the last part of this work, a carbon paste electrode was modified with functionalized graphite and β -cyclodextrin. The electroanalytical potentiality of this new sensory architecture was investigated against the applicability of simultaneous determination of levodopa,

piroxicam, ofloxacin and methocarbamol in synthetic urine and river water samples, with limits of detection of 65, 105, 89 and 400 nmol L⁻¹, respectively. In addition, all modifications were morphologically characterized using scanning electron microscopy, transmission electron microscopy, dispersive energy spectroscopy and/or contact angle, and also electrochemically by cyclic voltammetry and/or electrochemical impedance spectroscopy. In addition, the selectivity, precision and accuracy of the proposed methods were evaluated by possible interferences studies, intra- and inter-day repeatability measurements and comparison with UV-Vis spectroscopy, respectively.

Keywords: graphene, graphite, carbon black, electrochemical sensors, drugs, simultaneous determination.

Sumário

CAPÍTULO 1 – Introdução	1
1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Materiais de carbono	3
1.1.1 Grafeno	3
1.1.2 Negro de fumo.....	6
1.2 Líquidos iônicos.....	8
1.3 Ciclodextrina	10
1.4 Quitosana.....	12
1.5 Nafion®.....	13
1.6 Poli(3,4-etilenodioxitiofeno) e poli(estirenosulfonato de sódio).....	15
1.7 Analitos de interesse.....	16
1.7.1 Ciprofloxacina, levofloxacina e paracetamol.....	16
1.7.2 Salbutamol e propranolol	18
1.7.3 Levodopa, piroxicam, ofloxacina e metocarbamol.....	21
CAPÍTULO 2 – Objetivo.....	23
2.1 Objetivo geral.....	24
CAPÍTULO 3 – Determinação simultânea de paracetamol e ciprofloxacina em amostras de fluidos biológicos utilizando um eletrodo de carbono vítreo modificado com grafeno funcionalizado e nanopartículas de óxido de níquel	25
3.1 Objetivos específicos	26
3.2 Experimental	26
3.2.1 Reagentes e soluções.....	26
3.2.1.1 Preparo das amostras biológicas.....	27
3.2.2 Instrumentação	27
3.2.3 Funcionalização do Grafeno	29
3.2.4 Modificação da superfície do eletrodo de carbono vítreo	30

3.2.5	Preparação das nanopartículas de óxido de níquel e formação do sensor NiONPs-FG-CTS:EPH/GCE	31
3.2.6	Procedimento analítico	31
3.3	Resultados e Discussão	32
3.3.1	Caracterização dos materiais carbonáceos	34
3.3.2	Caracterização eletroquímica das NiONPs no FG-CTS:EPH/GCE	38
3.3.3	Determinação da área eletroativa	39
3.3.4	Caracterização por EIS	42
3.3.5	Estudo do comportamento eletroquímico do PAR e da CIP	44
3.3.6	Efeito do pH e do tipo de eletrólito	46
3.3.7	Efeito da velocidade de varredura de potencial	48
3.3.8	Otimização dos parâmetros da SWAdASV	50
3.3.9	Determinação simultânea de PAR e CIP por SWAdASV	51
3.3.10	Estudos de repetibilidade e seletividade	54
3.3.11	Determinação simultânea de PAR e CIP em amostras biológicas	56
3.4	Conclusões	57
CAPÍTULO 4 – Determinação simultânea de salbutamol e propranolol em amostras de fluidos biológicos utilizando um sensor eletroquímico à base de grafeno funcionalizado, líquido iônico e nanopartículas de prata.....		
4.1	Objetivos específicos	60
4.2	Experimental	60
4.2.1	Reagentes e soluções	60
4.2.2	Instrumentação e funcionalização do grafeno	61
4.2.3	Síntese das nanopartículas de prata	61
4.2.4	Preparação do sensor AgNPs-IL-FG-NF/GCE	61
4.2.5	Procedimento analítico	62
4.3	Resultados e Discussão	63
4.3.1	Otimização do filme	63
4.3.2	Caracterização morfológica dos materiais	64

4.3.3 Caracterização eletroquímica	65
4.3.4 Estudo do comportamento eletroquímico do SAL e PRO	70
4.3.5 Efeito do pH e otimização dos parâmetros analíticos	72
4.3.6 Efeito da velocidade de varredura de potencial	74
4.3.7 Determinação simultânea de SAL e PRO por SWV.....	76
4.3.8 Estudo de repetibilidade	79
4.3.9 Determinação simultânea de SAL e PRO em amostras biológicas	80
4.4 Conclusões	81
CAPÍTULO 5 – Eletrodo de carbono vítreo modificado com carbon black, PEDOT:PSS e nanopartículas de prata para a determinação simultânea de paracetamol e levofloxacina	82
5.1 Objetivos específicos	83
5.2 Experimental	83
5.2.1 Reagentes e soluções.....	83
5.2.2 Instrumentação e síntese das nanopartículas de prata	83
5.2.3 Preparação do sensor AgNPs-CB-PEDOT:PSS/GCE.....	84
5.2.4 Procedimento analítico	84
5.2.5 Preparo das amostras.....	85
5.3 Resultados e Discussão	86
5.3.1 Caracterização morfológica e eletroquímica dos nanomateriais	87
5.3.2 Estudo do comportamento eletroquímico do PAR e LEV	90
5.3.3 Efeito do pH e otimização dos parâmetros analíticos	91
5.3.4 Efeito da velocidade de varredura de potencial	93
5.3.5 Determinação eletroquímica de PAR e LEV.....	96
5.3.7 Estabilidade de resposta e seletividade	99
5.3.7 Aplicação do sensor AgNPs-CB-PEDOT:PSS/GCE em amostras ambientais e biológicas	100
5.4 Conclusões	102

CAPÍTULO 6 – Sensoriamento voltamétrico simultâneo de levodopa, piroxicam, ofloxacina e metocarbamol utilizando um eletrodo de pasta de carbono modificado com grafite funcionalizado e β-ciclodextrina.....	103
6.1 Objetivos específicos	104
6.2 Experimental.....	104
6.2.1 Material e reagentes	104
6.2.2 Instrumentação	104
6.2.3 Funcionalização do Grafite.....	105
6.2.4 Preparação do eletrodo modificado.....	105
6.2.5 Preparo das amostras.....	106
6.2.6 Etapas analíticas	106
6.3 Resultados e Discussão.....	107
6.3.1 Caracterização morfológica e química do Gr e FGr	108
6.3.2 Caracterização eletroquímica do β CD-FGr/CPE.....	110
6.3.3 Comportamento eletroquímico de LVD, PRX, OFX e MCB	113
6.3.4 Otimização do método	114
6.3.5 Determinação simultânea de LVD, PRX, OFX e MCB.....	118
6.3.6 Estudos de repetibilidade, seletividade e estabilidade.....	122
6.3.7 Determinação simultânea de LVD, PRX, OFX e MCB em amostras de água de rio e urina sintética.....	124
6.4 Conclusões	126
CAPÍTULO 7 – Conclusões gerais.....	127
7.1 Conclusões Gerais	128
Referências.....	129

CAPÍTULO 1

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Com o aumento da população mundial e o avanço das indústrias química e farmacêutica, diversos compostos são diariamente consumidos e descartados no meio ambiente. Estima-se que aproximadamente 11 milhões de substâncias químicas sejam conhecidas em todo o mundo, sendo que mais de 3 mil são produzidas em larga escala¹. Dentre estas substâncias destacam-se os fármacos, cujos avanços trouxeram à população a possibilidade de tratar várias doenças infecciosas ou até mesmo fatais. Entretanto, o desenvolvimento de novos medicamentos, em conjunto com a excessiva crença de cura, despertou nas pessoas o “impulso” pelo consumo, muitas vezes desnecessário, de produtos farmacêuticos. Somado a isso, outro problema grave é o da automedicação, pois um número expressivo de fármacos existentes na atualidade são comercializados livremente, sem a necessidade de prescrição médica, o que pode causar diversos problemas a saúde em decorrência do uso desnecessário, incorreto ou até mesmo de reações adversas entre remédios de diferentes classes^{2,3}.

Tendo em vista, que a maioria dos medicamentos permanecem na corrente sanguínea por um determinado tempo e, posteriormente, grande parte é eliminado pela urina, a detecção em fluidos biológicos (soro e urina) visa o diagnóstico de rotina, ocasionado principalmente pelo consumo indevido ou descontrolado desses compostos. Por outro lado, os sistemas convencionais de tratamento de águas residuais geralmente não são capazes de remover ou degradar totalmente grande parte dos fármacos, tornando a detecção neste caso, muito relevante para o monitoramento ambiental.

Diante desta problemática, a busca por dispositivos capazes de realizar determinações cada vez mais complexas com diferentes fármacos de forma individual ou simultânea em fluídos biológicos ou águas naturais é de extrema importância para a saúde humana e controle ambiental. Desta forma, os procedimentos eletroanalíticos configuram-se como métodos alternativos potenciais para estes fins, com a realização de análises rápidas, sensíveis e com

baixo consumo de reagentes. Uma tendência ainda corrente em eletroanalítica é o *design* de eletrodos modificados como sensores eletroquímicos sensíveis e robustos. O desenvolvimento e aplicação de sensores modificados se destaca, pois está diretamente ligado à capacidade de reconhecimento e/ou aumento da magnitude do sinal analítico, ao mesmo tempo em que pode tornar as análises mais seletivas e sensíveis comparativamente àquelas realizadas com os eletrodos convencionais, como eletrodo de carbono vítreo (GCE, do inglês “*Glass Carbon Electrode*”)^{4,5}. Assim, os sensores eletroquímicos podem ser facilmente adaptados ou modificados para aplicações específicas. Por isso, o desenvolvimento de técnicas eletroanalíticas continua ganhando grande destaque, o que viabiliza a construção de novos arranjos de eletrodos para determinações variadas⁶.

1.1 Materiais de carbono

Os materiais de carbono ou carbonáceos como grafite, grafeno, nanotubos de carbono, *carbon black* entre outros, formam uma das classes de materiais mais importante na construção de sensores/biossensores eletroquímicos para fins analíticos^{4,5,7}. Isso se deve, principalmente, às propriedades encontradas na maioria deles, como estabilidade química, resistência mecânica, ampla janela de potenciais de trabalho, elevada taxa de transferência de elétrons para uma vasta classe de compostos orgânicos e inorgânicos, alta área superficial e compatibilidade com outros compostos⁸. Todas estas características viabilizam a sua utilização direta na modificação de eletrodos de trabalho base ou combinada com outros (nano)materiais, como nanopartículas metálicas e polímeros^{4,5}, tornando-se ainda mais atraentes no contexto do desenvolvimento de novas plataformas sensoras.

1.1.1 Grafeno

O grafeno (GRA) é um nanomaterial bidimensional (2D) composto por uma única camada de átomos de carbono unidos por ligações extremamente

fortes (ligações π conjugadas) para formar uma rede hexagonal plana (FIGURA 1.1A)⁹⁻¹¹. Porém, vale ressaltar que esta é a forma idealizada para o material, haja vista que a sua estrutura tende a ser um pouco mais complexa, pois é quase impossível produzir GRA com apenas uma única camada em larga escala. Assim, tem sido considerado como GRA qualquer material que apresente até 12 camadas (folhas), pois acima deste valor o mesmo tende a se comportar como uma fina camada de grafite¹⁰. Desta forma, o GRA vem sendo subdividido conforme o seu número de camadas, a saber: camada única, dupla camada, com poucas camadas (3 a 9 camadas) e multicamadas (≥ 10 folhas). Neste contexto, é possível observar a grande variedade de materiais possíveis, sendo que isso irá influenciar diretamente nas suas propriedades¹⁰.

GRA pode ser obtido através de diferentes processos físicos e químicos. O método físico mais utilizado é a exfoliação do grafite, em que se destacam os métodos micromecânicos¹², micro-ondas¹³, ultrassom¹⁴ e exfoliação térmica¹⁵. A síntese química inclui o crescimento epitaxial em diferentes substratos metálicos usando deposição por vapor químico e redução química de óxido de grafite (método de Hummers modificado)^{16,17}. Sendo assim, cada método apresenta suas vantagens e desvantagens, no qual a escolha do método a ser empregado irá depender do tipo de aplicação e características desejadas, como grau de pureza do material e número de camadas.

As propriedades do GRA são relativamente bem estabelecidas, com destaque para algumas características como alta resistência mecânica, estabilidade química, condutividade elétrica (até 2×10^4 S/cm), mobilidade eletrônica ($2,0 \times 10^5$ cm² V⁻¹ s⁻¹, que é aproximadamente 100 vezes maior que a do silício) e compatibilidade com outros materiais¹⁸. Desta maneira, uma vasta gama de aplicações na área de eletroquímica é possível, incluindo o desenvolvimento de células a (bio)combustível¹⁹, supercapacitores²⁰ e sensores/biossensores^{21,22}.

O grupo de pesquisa liderado pelo Professor Dr. Martin Pumera publicou alguns artigos de revisão sobre a eletroquímica fundamental e aplicada do GRA²³⁻²⁵. Assim, sabe-se que parte dos conhecimentos acumulados sobre a eletroquímica de eletrodos baseados em grafite também são aplicáveis ao GRA. Por exemplo, com base nas investigações de Goh e Pumera²⁶ e Brownson *et al.*²⁷, constatou-se que a transferência de elétrons em eletrodos à base de GRA é dominada pelas bordas do material, sendo bem menor no plano basal. Além disso, dependendo do grau de funcionalização das folhas do GRA, a resposta eletroquímica de diferentes espécies redox inorgânicas e orgânicas pode ser afetada. Por meio de um processo controlado de funcionalização, no qual geralmente se utiliza soluções ácidas (por exemplo, mistura de H₂SO₄ conc. e HNO₃ conc.), algumas ligações sp² no material são convertidas em ligações sp³ através da formação de grupos epóxi, hidroxila, carbonila e carboxila nos planos de superfície e de borda, e alguns defeitos também são gerados na rede cristalina do material (FIGURA 1.1B). Fazendo-se isso, embora ocorra uma leve diminuição da condutividade elétrica do material, os grupos oxigenados resultantes e os defeitos estruturais ocasionados podem ser benéficos nos processos eletroquímicos, pois estes serão os responsáveis pela reatividade do material, podendo desta forma promover um aumento na transferência heterogênea de elétrons^{10,28,29}. Assim, ao realizar de forma controlada a funcionalização do GRA, além de se obter um aumento no número de sítios ativos para uma melhor transferência de elétrons, ainda se tem um material com boa condutividade elétrica.

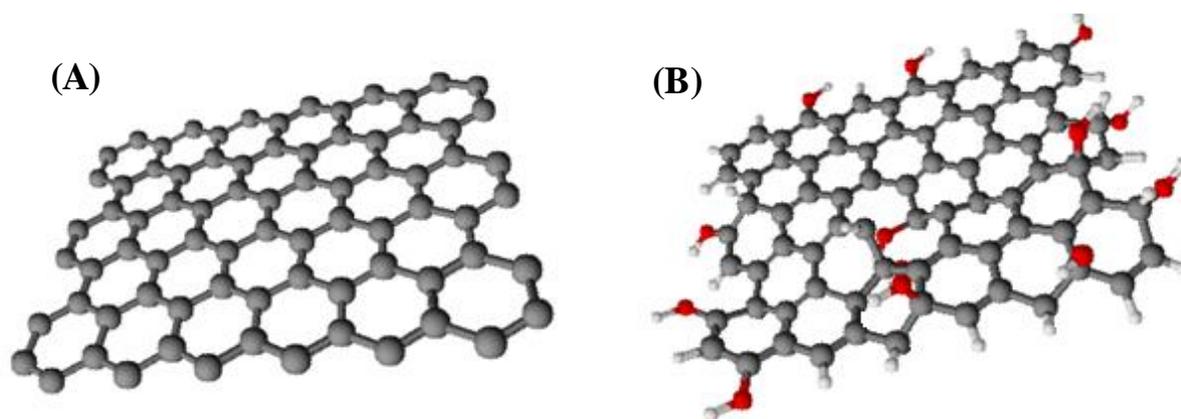


FIGURA 1.1 – Representação da estrutura química do (A) grafeno e do (B) grafeno funcionalizado.

1.1.2 Negro de fumo

Negro de fumo (CB, do inglês “*Carbon black*”) é um nanomaterial carbonáceo constituído por mais de 95% em carbono puro, obtido por processos controlados, como o térmico (*thermal*), de forno (*furnace*) e o de canal (*channel*), tendo como principal matéria prima hidrocarbonetos, como óleo e gás natural. Dentre estes, o processo mais utilizado hoje em dia é o *furnace*, representando mais de 90% de toda produção mundial^{30,31}. A estrutura morfológica do CB é amorfa e quase grafítica, composta por nanopartículas de forma esférica (diâmetro médio de 3,0 a 100 nm) que se unem formando agregados nanoestruturados (tamanho médio de 30 a 1000 nm), que por fim se agrupam dando origem aos aglomerados com dimensões superiores, podendo chegar até 1000 μm ^{4,31,32}. Na FIGURA 1.2 é apresentada uma representação esquemática da estrutura do CB e os seus respectivos arranjos agregados e aglomerados.

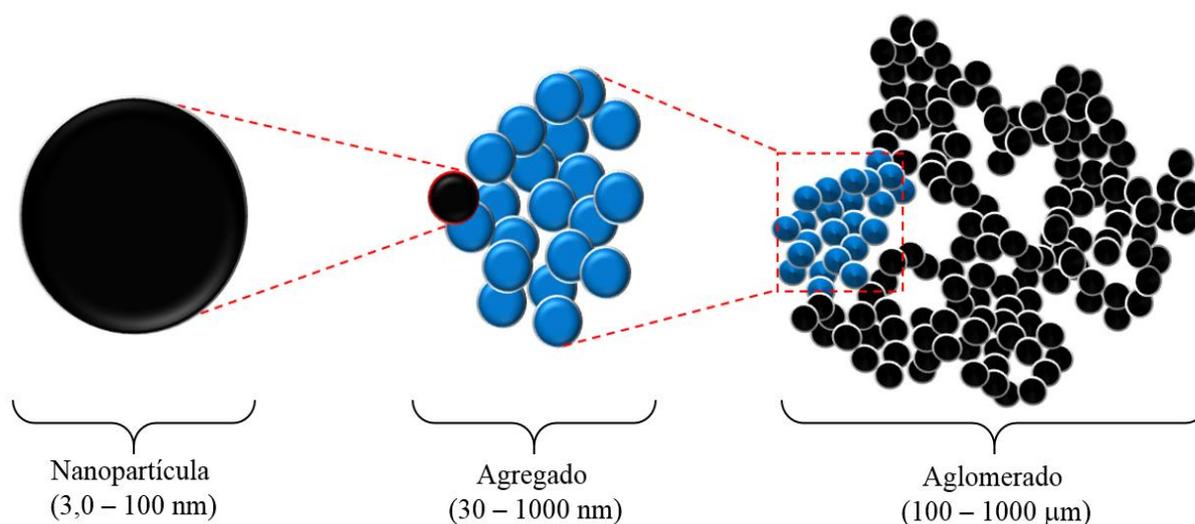


FIGURA 1.2 – Representação esquemática das nanopartículas de CB e respectivas estruturas formadas. Adaptado de Silva *et al.*³³.

Assim, devido ao baixo custo do CB (aproximadamente R\$ 4,00 por kg) e algumas características únicas deste material, o mesmo vem sendo amplamente utilizado em diferentes áreas, como na fabricação de pneus, tintas de impressão, revestimentos, reforços para borracha e plásticos condutores³¹.

Na área da química analítica, mais especificamente na eletroanalítica, a busca por nanomateriais é impulsionada por suas propriedades excepcionais, que vão além da alta resistência mecânica e estabilidade química. Como exemplo tem-se elevada área superficial, alta condutividade elétrica, atividade eletrocatalítica, ampla janela de potenciais e biocompatibilidade, o que torna o CB relativamente atraente para a construção de sensores/biosensores⁴. Assim, os eletrodos modificados com CB geralmente apresentam elevada sensibilidade, baixos limites de detecção e cinética de transferência de elétrons mais rápida, oferecendo desta forma amplas perspectivas no desenvolvimento de novos sensores eletroquímicos, como pode ser observado em alguns trabalhos reportados na literatura^{4,34-36}.

Neste sentido, o grupo de pesquisa LABBES coordenado pelo Professor Dr. Orlando Fatibello-Filho tem publicado diversos artigos utilizando o

CB. Por exemplo, Santos *et al.*³⁶ propuseram um sensor eletroquímico preparado pela modificação da superfície do GCE com CB e *quantum dots* de CdTe imobilizados em um filme de quitosana para a determinação de norfloxacin na presença de dopamina, cafeína e ácido úrico, sendo a curva analítica linear no intervalo de concentrações de 0,20 a 7,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com um limite de detecção (LOD, do inglês “*Limit of Detection*”) de 6,6 nmol L^{-1} . Em outro trabalho, Baccarin *et al.*³⁷ utilizaram o CB juntamente com óxido de grafeno reduzido e quitosana para formar um filme modificador na superfície do GCE para a determinação simultânea de dopamina e paracetamol, obtendo LOD de 0,20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 53 nmol L^{-1} , respectivamente. Desta forma, foi possível nestes trabalhos observar a compatibilidade do CB com outros materiais, aumentando a sensibilidade do método eletroanalítico, o que pode estar relacionado à elevada área superficial e alta condutividade elétrica deste material carbonáceo.

1.2 Líquidos iônicos

Líquidos iônicos (ILs, do inglês “*Ionic Liquids*”) são constituídos basicamente de cátions orgânicos volumosos e ânions (inorgânicos ou orgânicos), que apresentam ponto de fusão abaixo de 100 °C, sendo assim, em geral, líquidos a temperatura ambiente, no qual podem continuar neste estado a baixa temperaturas (−96 °C) e, em alguns casos à temperaturas superiores a 400 °C³⁸. Estes materiais apresentam um conjunto de características únicas, que incluem: solubilidade em diversos solventes, afinidade com diferentes materiais, baixas volatilidade e inflamabilidade, viscosidade moderada, alta condutividade iônica e grande estabilidade térmica e química³⁸⁻⁴⁰.

Assim, os ILs podem ser divididos em três diferentes grupos: zwitteriônicos (caracterizados por ter o cátion e o ânion interligados de forma intramolecular), próticos (conhecidos também como sais de Brønsted) e os mais comuns apróticos. Estes últimos, são baseados em cátions orgânicos com baixo

ponto de fusão devido à dificuldade de agrupar grandes moléculas catiônicas irregulares com pequenos ânions^{39,40}.

Os ILs apróticos mais comuns possuem os seguintes cátions: imidazol, 1-butil-3-metilimidazol, piridínio, piperidínio, pirrolidínio, tetraalquilamônio, tetraalquilsulfônico e trialquilsulfônico, e os ânions: Br^- , Cl^- , I^- , NO_3^- , $[\text{SCN}]^-$, BF_4^- , BF_6^- , CF_3SO_3^- e CF_3COO^- ³⁹. Como pode ser observado, diferentes ILs podem ser formados pela combinação dos mais variados tipos de cátions e ânions. Estes possíveis arranjos estão diretamente ligados às propriedades dos ILs que podem ser facilmente alteradas, como ponto de fusão, densidade, solubilidade e viscosidade^{39,40}. Conseqüentemente, o uso destes compostos tem atraído à atenção de muitos pesquisadores, sendo desta forma amplamente utilizados em diferentes aplicações, como catálise, reações enzimáticas, síntese orgânica e inorgânica, baterias, células a combustível e sensores eletroquímicos^{40,41}.

O tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio (FIGURA 1.3) é um exemplo de IL que vem sendo amplamente empregado na confecção de sensores eletroquímicos. Neste contexto, Miraki *et al.*⁴² relataram a construção de um eletrodo de pasta de carbono (CPE, do inglês “*Carbon Paste Electrode*”) modificado com IL e nanopartículas de NiO para a quantificação de benzerazida. Este sensor apresentou uma curva analítica no intervalo de concentração de benzerazida de 0,020 a 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e um LOD de 8,0 nmol L^{-1} . Em outro estudo, Wong *et al.*⁴³ reportaram o desenvolvimento de um CPE modificado com IL e óxido de grafeno para a determinação de ofloxacina, no qual foram obtidos uma faixa linear de 7,0 a 700 nmol L^{-1} e um LOD de 0,28 nmol L^{-1} . Estes resultados evidenciam o relevante potencial do uso de ILs em eletrodos modificados.

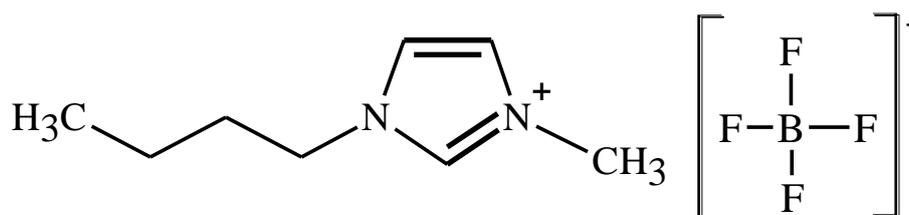


FIGURA 1.3 – Representação da fórmula estrutural do tetrafluoroborato de 1- butil-3-metilimidazólio.

1.3 Ciclodextrina

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos, compostos por unidades de *D*-glicose unidas por ligações α -1,4-glicosídicas quimicamente e fisicamente estáveis, produzidas pela degradação enzimática do amido^{44,45}. As CDs naturais mais comuns são a α , β e γ -CD, com seis, sete e oito unidades de glicopiranoose, respectivamente⁴⁴, sendo, a β -CD a mais utilizada atualmente, pois está disponível em grandes quantidades a um custo relativamente baixo⁴⁵.

As CDs apresentam estruturas na forma de um tronco-cônico com grupos hidroxila na parte externa (carbono 2, 3 e 6) conferindo características hidrofílicas às CDs tornando-as solúveis em água. Entretanto, o interior da cavidade apresenta um alinhamento de átomos de hidrogênio (carbono 3 e 5) e um anel de átomos de oxigênio glicosídicos conferindo características hidrofóbicas ao seu interior⁴⁶⁻⁴⁸. Na Figura 1.4 estão representadas as respectivas fórmulas estrutural e espacial da α , β e γ -CD.

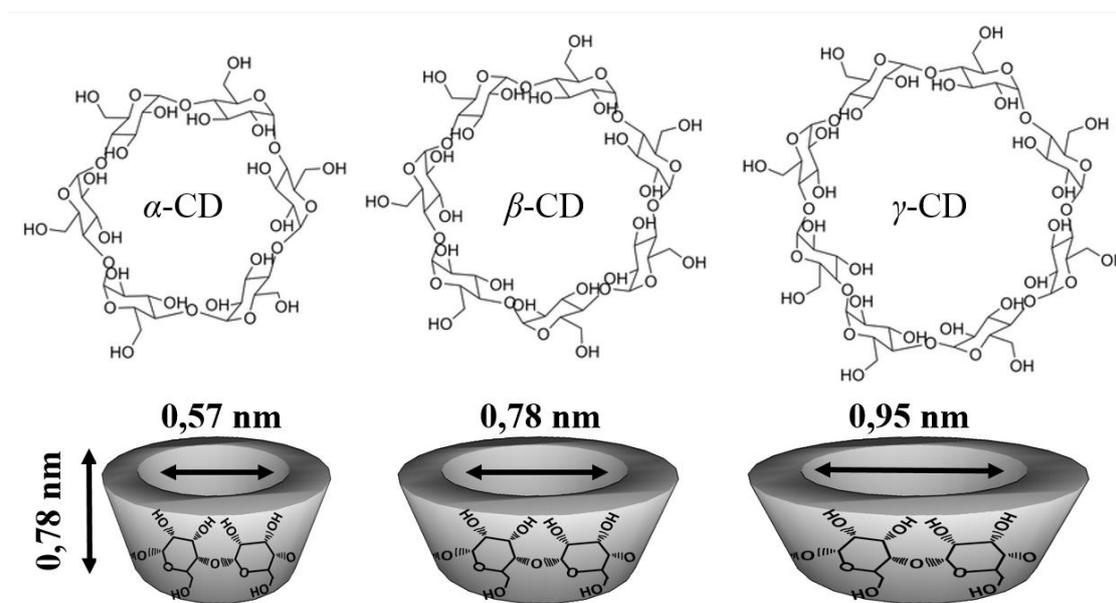


FIGURA 1.4 – Representação da fórmula estrutural e espacial da α , β e γ -CD.

Com a possibilidade da variação do tamanho das cavidades das CDs, ocasionado pelos diferentes arranjos possíveis, esse material vem sendo amplamente empregado como agente complexante ou de captura de inúmeros compostos com diferentes dimensões, por exemplo cátions metálicos, fármacos, pesticidas, entre outros^{47,48}. Sendo assim, as CDs tem sido utilizada em diferentes aplicações, como na indústria farmacêutica (transporte de analito), em catálise, reconhecimento molecular e na confecção de sensores eletroquímicos⁴⁷⁻⁴⁹.

Tendo por base a confecção de sensores eletroquímicos, Kor *et al.*⁵⁰ relataram o desenvolvimento de um eletrodo de pasta de carbono modificado com β -CD e nanotubos de carbono de paredes múltiplas para a determinação de nifedipina, sendo obtido uma curva analítica no intervalo de concentração do analito de 0,070 a 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e um LOD de 25 nmol L^{-1} . Em outro caso, Zhan *et al.*⁵¹ propuseram um nanocompósito constituído de β -CD e óxido de grafeno reduzido para obter um GCE modificado. Este sensor foi empregado para a quantificação de íons chumbo (Pb^{2+}) em água residual industrial, sendo a faixa linear da curva analítica no intervalo de concentrações de Pb^{2+} de 1,0 a 100 nmol L^{-1} , com um LOD de 0,5 nmol L^{-1} . Em ambos os estudos, foi possível

observar a alta compatibilidade da β -CD com outros materiais em que, devido a capacidade de adsorção da β -CD e a alta condutividade elétrica dos materiais carbonáceos, obteve-se um efeito sinérgico, o que foi comprovado pela melhora na resposta eletroquímica obtida.

1.4 Quitosana

A quitosana (CTS, do inglês “*chitosan*”) é um polissacarídeo natural obtido pela desacetilação alcalina da quitina, um bio-polímero encontrado no exoesqueleto de insetos e crustáceos, que por sua vez, é extraído por processos de desmineralização seguido de desproteínização^{52,53}. Na Figura 1.5 (A) e (B) estão representadas as respectivas fórmulas estrutural dos polímeros CTS e quitina.

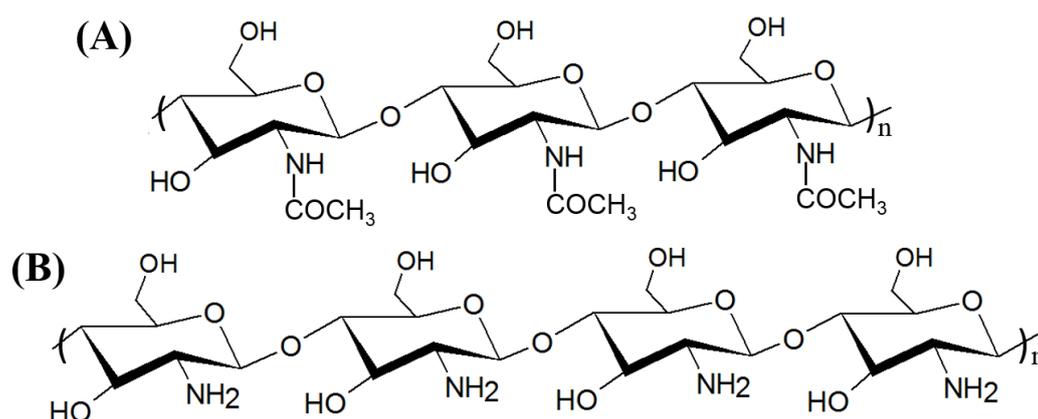


FIGURA 1.5 – Representação idealizada da fórmula estrutural da (A) quitina e (B) quitosana.

O filme de CTS tem-se destacado como um material biofuncional de alto potencial, tanto em pesquisas quanto em aplicações comerciais⁵⁴. Isso se deve principalmente às suas propriedades, como não-toxicidade, biodegradabilidade, compatibilidade, estabilidade química e resistência mecânica^{52,53}. Algumas das várias possibilidades de aplicações da CTS incluem a administração de agentes terapêuticos, engenharia de tecidos e ossos, curativos, cosméticos, tratamento de

águas residuais, proteção contra corrosão e no desenvolvimento de sensores/biossensores eletroquímicos^{52,53}.

No contexto da preparação de sensores eletroquímicos, uma aplicação especial da CTS é na adsorção de diferentes cátions metálicos via complexação destes íons garantida pelos grupos funcionais da CTS, especialmente os grupos amino^{55,56}. Em outra abordagem, o uso da CTS na elaboração de sensores eletroquímicos é realizada pela formação de filmes em decorrência de sua capacidade de incorporar diferentes materiais e com alta aderência em superfícies eletródicas tradicionais, como no GCE⁵⁷. Isso se deve, aos grupos amino da CTS, altamente reativos, que podem reagir com os grupos –COOH dos materiais nanoestruturados, como GRA, FG e nanotubos de carbono^{56,57}. Desta forma, a alta reatividade da CTS torna-a facilmente suscetível a modificações estruturais. Assim, devido ao seu $pK_a \sim 6,3$, em meio ácido ($pH < pK_a$ da CTS) os grupos $-NH_2$ podem ser protonados ($-NH_3^+$) tornando a CTS solúvel em meio aquoso, em que o grau de solubilidade está relacionado à quantidade de grupos amino protonados na cadeia polimérica⁵⁸. A solubilidade da CTS pode variar também conforme a sua massa molar, origem e grau de desacetilação⁵⁸.

Para a obtenção de filmes homogêneos e com alta estabilidade química e física, a imobilização da CTS é realizada utilizando-se agentes de reticulação (formam ligações cruzadas), tais como: glutaraldeído, glioxal ou epícloridrina, que se ligam aos grupos $-NH_2$ ou $-OH$ das moléculas de CTS, formando uma rede polimérica estável. O uso de agentes de reticulação é necessário para obtenção de filmes com alta aderência e estabilidade para a modificação de sensores eletroquímicos^{56,57}.

1.5 Nafion®

O Nafion® (NF) é um polímero perfluorosulfonado que, apresenta alta hidrofobicidade, sendo por este motivo, comercializado na forma de filme ou

em solução hidroalcoólica^{59,60}. Na FIGURA 1.6 está representada a fórmula estrutural do polímero Nafion[®]. O Nafion[®] é um material muito interessante para uma vasta gama de aplicações, podendo-se mencionar o seu uso como membrana polimérica em células a combustível⁶¹ e no desenvolvimento de sensores ópticos⁶⁰ e eletroquímicos^{59,62,63}.

O NF encontra aplicabilidade no desenvolvimento de sensores eletroquímicos, pois auxilia na dispersão de diferentes materiais em meio aquoso, como nanomateriais de carbono, líquidos iônicos e nanopartículas metálicas, e ainda promove uma melhor aderência desses materiais sobre superfícies eletródicas, ajudando assim, a melhorar a estabilidade química e física dos eletrodos modificados^{59,64,65}.

Lai *et al.*⁶⁴ reportaram o uso do NF como agente imobilizador para a formação de um filme estável na superfície do GCE com nanopartículas de ouro e nanotubos de carbono de parede múltiplas para a determinação eletroquímica de feniletanolamina A. Este sensor apresentou boa estabilidade e uma ampla faixa linear de resposta (0,01 a 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) com um LOD de 5,0 nmol L^{-1} . Em outro trabalho, Zare *et al.*⁶⁶ desenvolveram um sensor eletroquímico sensível baseado em um GCE modificado com um filme compósito de NF, óxido de grafeno reduzido e nanopartículas de ouro, para a determinação de diuron. A curva analítica apresentou uma resposta linear no intervalo de concentrações de diuron de 1,0 a 100 nmol L^{-1} e um LOD de 0,3 nmol L^{-1} .

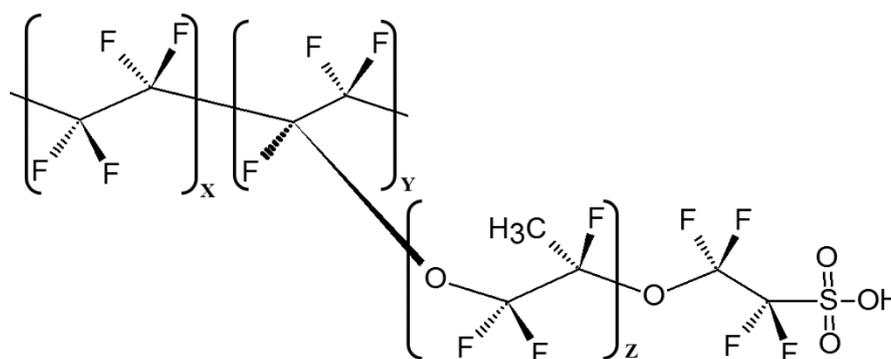


FIGURA 1.6 – Representação da fórmula estrutural do polímero Nafion[®].

1.6 Poli(3,4-etilenodioxitiofeno) e poli(estirenosulfonato de sódio)

O poli(3,4-etilenodioxitiofeno) (PEDOT) é um polímero semicondutor da classe dos politiofenos muito utilizado em diversas aplicações, como revestimentos anti-estáticos, cátodos em capacitores, energia fotovoltaica e confecções eletrocromicas. Contudo, o PEDOT sozinho, produz uma rede polimérica de baixa solubilidade em meio aquoso^{67,68}. Por este motivo, é muito comum a sua utilização juntamente com o poli (estirenosulfonato de sódio) (PSS), que por sua vez, é um polímero altamente hidrofílico^{69,70}. Assim, a combinação destes dois polímeros, a saber: PEDOT:PSS (FIGURA 1.7) é produzida comercialmente como uma dispersão coloidal aquosa⁷⁰.

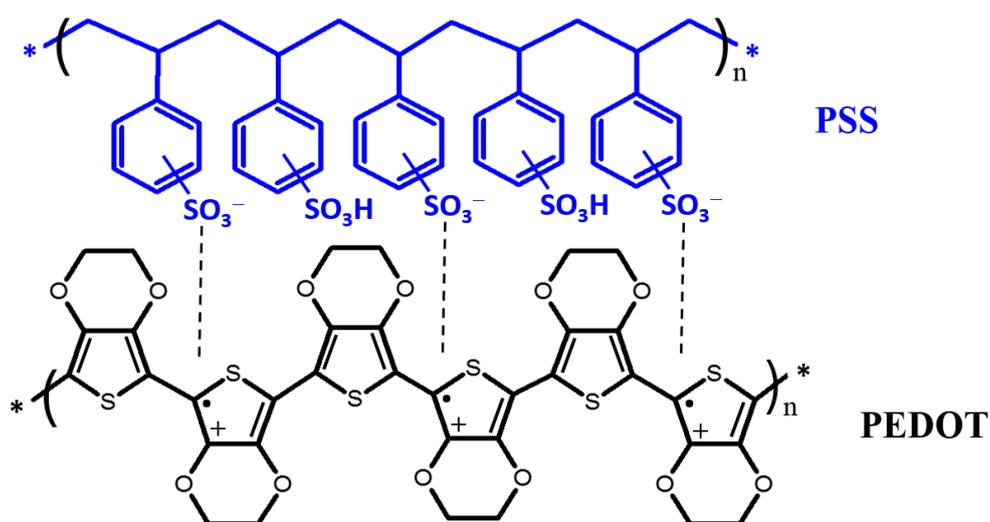


FIGURA 1.7 – Representação da fórmula estrutural do polímero PEDOT:PSS.

O PEDOT:PSS apresenta boa compatibilidade com muitos materiais, como nanopartículas metálicas, polímeros, materiais carbonáceos e outros⁷⁰⁻⁷³. Sendo assim, já foi empregado no desenvolvimento de sistemas de coleta de energia⁷⁴, na confecção de sensor de temperatura impresso por jato de tinta⁷⁵ e em um sensor para gás amônia⁷⁶. Além disso, por apresentar uma rede polimérica altamente solúvel em água, vem sendo amplamente empregado no desenvolvimento de sensores eletroquímicos, para a imobilização efetiva de

diferentes materiais na superfície do eletrodo^{70,71}, proporcionando assim boa estabilidade, homogeneidade e alta condutividade elétrica^{70,77}.

Huang *et al.*⁷⁸ relataram o desenvolvimento de um sensor eletroquímico contendo óxido de grafeno, nanotubos de carbono e PEDOT, com o objetivo de melhorar a atividade eletroquímica do GCE para a determinação de paracetamol. Em outro caso, Wong *et al.*⁷⁹ propuseram um sensor modificado com CB, óxido de grafeno e nanopartículas de cobre imobilizados em um filme de PEDOT:PSS como material de eletrodo para a determinação simultânea de isoproterenol, paracetamol, ácido fólico, propranolol e cafeína. Em ambos os casos, com a utilização do PEDOT foi observada uma maior atividade eletroquímica, ao qual pode ser atribuída à alta condutividade elétrica deste material polimérico. Além disso, o uso combinado do PEDOT com outros materiais (carbonáceos e metálicos) promoveu a formação de um filme com alta aderência na superfície do GCE, oferecendo assim melhor estabilidade e repetibilidade ao sensor modificado.

1.7 Analitos de interesse

1.7.1 Ciprofloxacina, levofloxacina e paracetamol

Ciprofloxacina (CIP) e levofloxacina (LEV, (isômero S)) são antibióticos sintéticos pertencentes à família das fluoroquinolonas⁸⁰⁻⁸³ (FIGURA 1.8). Estes fármacos apresentam um amplo espectro de atividade antimicrobiana, sendo largamente utilizadas no tratamento de infecções causadas por diferentes tipos de bactérias no sistema digestivo, respiratório, urinário ou sexual⁸⁰⁻⁸³. Após ingestão, estes fármacos são rapidamente absorvidos e apresentam um tempo de meia vida de aproximadamente 8 h no qual, posteriormente, cerca de 85% são excretados pela urina sob forma inalterada em até 48 h^{80,82}. Os efeitos colaterais mais comuns das fluoroquinolonas incluem transtornos gastrointestinais, erupções cutâneas, dor de cabeça e tontura^{80,81,84}.

Porém em casos raros, geralmente ocasionados por uso inadequado, podem causar efeitos adversos, que incluem neuropatia periférica transitória ou permanente, problemas cardíacos e síndrome de Stevens-Johnson (reações cutâneas graves)⁸⁴⁻⁸⁷.

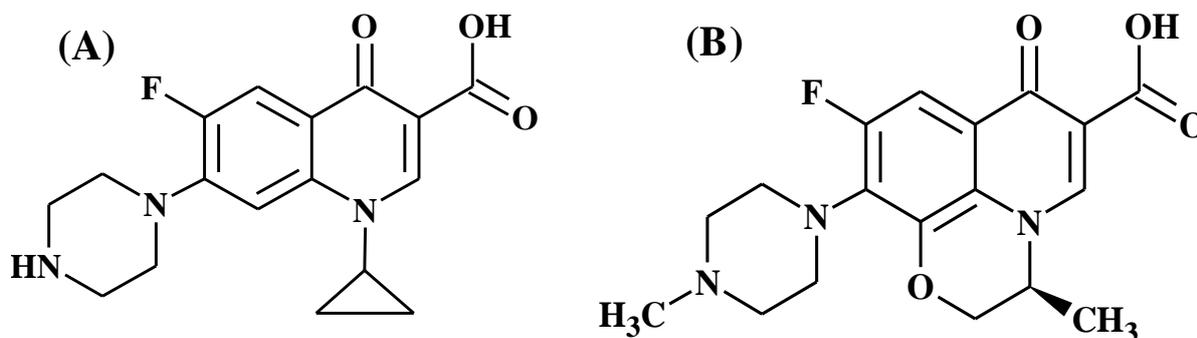


FIGURA 1.8 – Representação das fórmulas estruturais da (A) ciprofloxacina e (B) (S)-levofloxacina.

Na literatura, há relatos de que infecções bacterianas geralmente resultam em febre e/ou inflamação⁸⁸. Assim, a administração e combinação de antibióticos com outros medicamentos de diferentes classes é necessária para tratar esses sintomas⁸⁹.

O Paracetamol (PAR, ou acetaminofeno, FIGURA 1.9) foi descoberto na Alemanha em 1877 e, vem sendo comercializado como medicamento desde 1878. Atualmente é um dos remédios mais consumidos no mundo devido, principalmente, às suas propriedades analgésicas e antipiréticas^{90,91}. O PAR, é amplamente empregado para o tratamento de dores leves a moderadas e para reduzir a febre^{90,91}. Após administração, o PAR é quase que completamente absorvido pelo trato gastrointestinal e, em seguida, é parcialmente convertido em metabólitos ativos no fígado^{91,92}. Sua ação tem início entre 15 e 30 min após a administração e permanece por até 6 horas. Em seguida, a maior parte do fármaco é eliminada pela urina na forma metabolizada e aproximadamente 4% de forma inalterada⁹². Embora o seu uso seja considerado seguro em doses terapêuticas, quando administrado além da dose recomendada

(superdosagem), pode ocasionar sérios danos aos rins e fígado, podendo chegar a níveis fatais destes órgãos^{90,91,93,94}.

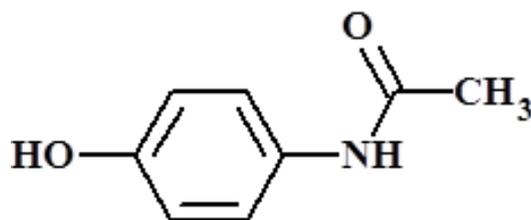


FIGURA 1.9 – Representação da fórmula estrutural do paracetamol.

Deste modo, embora PAR e CIP/LEV não sejam comumente encontrados juntos em formulações farmacêuticas, estas drogas são constantemente coadministradas em tratamentos terapêuticos^{88,95,96}.

Figueira-Coelho *et al.*⁹⁶ relataram a administração de PAR e LEV para o tratamento de pacientes com pneumonia. Em outro estudo, Endimiano *et al.*⁹⁵ investigaram seu uso para o tratamento da doença pulmonar crônica.

A partir disso, é necessária a determinação simultânea de PAR e CIP/LEV em fluidos biológicos para diagnóstico clínico^{97,98}. Além disso, estes fármacos são considerados contaminantes ambientais emergentes e são, frequentemente, encontrados em efluentes, representando um sério risco para humanos e animais⁹⁹⁻¹⁰¹.

1.7.2 Salbutamol e propranolol

Salbutamol (SAL, ou albuterol, FIGURA 1.10) é um agonista dos receptores beta-2-adrenérgicos muito utilizado no alívio do broncoespasmo, sendo amplamente empregado para o tratamento da asma, doenças pulmonares crônicas e no controle do nível de potássio no sangue¹⁰²⁻¹⁰⁵. O SAL ao ser ingerido é rapidamente absorvido pelo organismo e tem uma duração de ação de aproximadamente 5 h. Em seguida, grande parte do composto é eliminado

principalmente pela urina na forma inalterada ou conjugada (sulfato fenólico) em até 72 h^{104,106}. Assim, embora seja raro, o uso deste medicamento pode ocasionar efeitos colaterais como dor de cabeça, tontura, tremores, arritmia cardíaca^{102,105,107} e, se administrado em excesso ou incorretamente, pode ocasionar sérios problemas de saúde, incluindo batimentos cardíacos irregulares e baixa concentração de potássio no sangue^{104,108,109}.

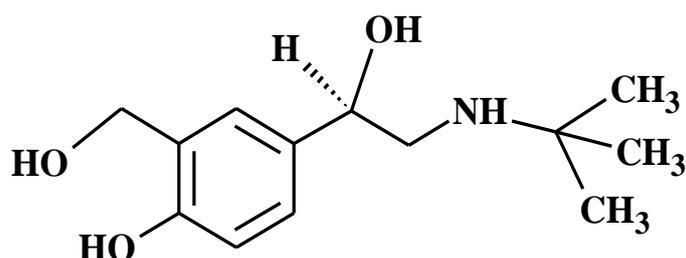


FIGURA 1.10 – Representação da fórmula estrutural do (R,S)-salbutamol (SAL).

Propranolol (PRO, FIGURA 1.11) é um antagonista não seletivo dos receptores beta-adrenérgicos frequentemente usado no tratamento e prevenção da hipertensão arterial, angina de peito crônica, arritmias cardíacas, infarto do miocárdio e tratamento de tremores^{110,111}. Após o consumo deste fármaco, o mesmo é absorvido quase que completamente pelo sistema gastrointestinal e, em seguida, sofre transformação no fígado gerando grande parte dos metabólitos ativos com um pico de ação de 60 a 90 min, sendo então, posteriormente eliminado quase que completamente pela urina na forma de metabólitos e cerca de 1% na forma inalterada^{110,112}. Além disso, vale ressaltar que o uso de PRO pode gerar algumas reações adversas, como insuficiência cardíaca, agravamento de distúrbios da condução atrioventricular, broncoespasmo, bradicardia grave e hipotensão^{110,111}.

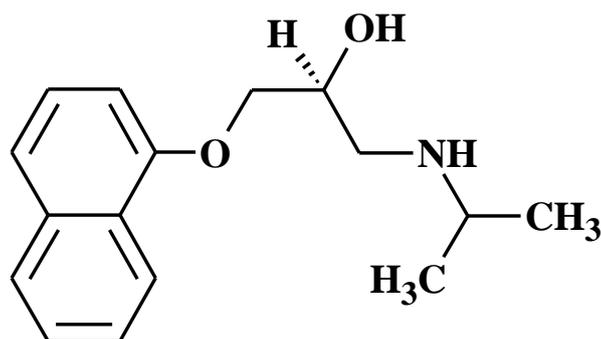


FIGURA 1.11 – Representação da fórmula estrutural do (R,S)-propranolol (PRO).

Embora o uso simultâneo de SAL e PRO não ser indicado, devido o PRO ser um agente β -bloqueador não cardioseletivo e o risco do seu uso associado ao SAL poder superar os benefícios para pacientes com asma, na literatura foram relatados casos em que pacientes com excesso de SAL no organismo foram tratados com PRO como um antídoto e não como um medicamento anti-asmático¹¹³⁻¹¹⁵.

Ramoska *et al.*¹¹³ relataram o uso de PRO no tratamento de intoxicação por SAL em dois pacientes asmáticos, em cujo caso o PRO foi usado para minimizar o efeito causado pelo SAL.

Kupeli¹¹⁶ relatou o uso de PRO para o tratamento de hemangiomas infantis, nos quais 11 dos 14 pacientes com menos de 1 ano, apresentaram redução de mais de 50% no tamanho dos hemangiomas. No entanto, os outros três pacientes apresentaram broncoespasmo e foram tratados com SAL.

Sendo assim, apesar do SAL e PRO não serem encontrados juntos em formulações farmacêuticas, eles podem ser coadministrados em tratamentos clínicos^{113,114,116}. Portanto, a determinação individual ou simultânea de SAL e PRO em fluidos biológicos é de fundamental importância para a farmacocinética fisiológica e diagnóstico clínico.

1.7.3 Levodopa, piroxicam, ofloxacina e metocarbamol

Levodopa (LVD, ou L-dopa, FIGURA 1.12A) é um fármaco da classe das catecolaminas, precursor metabólico da dopamina. A LVD é usada no tratamento da doença de Parkinson, pois é capaz de penetrar na barreira hematoencefálica e converter-se em dopamina, reabastecendo a insuficiência da dopamina no cérebro^{117,118}. Ao ser ingerido, este composto é amplamente metabolizado e menos que 10% é eliminado sem alteração pelos rins. Em geral, este medicamento em doses terapêuticas é bem tolerado, porém pode ocorrer efeitos indesejados, tais como episódios psicóticos, movimentos involuntários, angina pectoris (dor no peito devido à redução de fluxo sanguíneo para o coração), perda de peso e falta de ar^{117,119}.

Piroxicam (PRX, FIGURA 1.12B) é um fármaco anti-inflamatório não-esteróide amplamente utilizado para avaliar os sintomas da artrite, dor pós-operatória e dores lombares. Após administração, o PRX é metabolizado e, cerca de 5% da dose diária é excretada de forma inalterada na urina. Os principais efeitos colaterais incluem dor de cabeça, erupções cutâneas, palpitações e tonturas¹²⁰⁻¹²².

Ofloxacina (OFX, FIGURA 1.12C) é um antibiótico da família das FLQ, amplamente utilizado no tratamento de infecções microbianas, causadas por diferentes tipos de bactérias no sistema respiratório, urinário, gastrointestinal e cutâneo¹²³⁻¹²⁵. Após ingestão, este fármaco é rapidamente absorvido pelo organismo e, cerca de 85% é excretado pelos rins de forma inalterada. Seus principais efeitos colaterais são danos aos tendões e ligamentos além da neuropatia periférica^{123,125}.

Metocarbamol (MCB, FIGURA 1.12D) é um fármaco utilizado como relaxante muscular de ação central para o tratamento de espasmos musculares esqueléticos e para aliviar dores e desconfortos causados por entorses e outras lesões musculares^{126,127}. Após o consumo, o MCB é metabolizado no

fígado, e apenas pequenas quantidades são excretadas pela urina de forma não modificada^{127,128}.

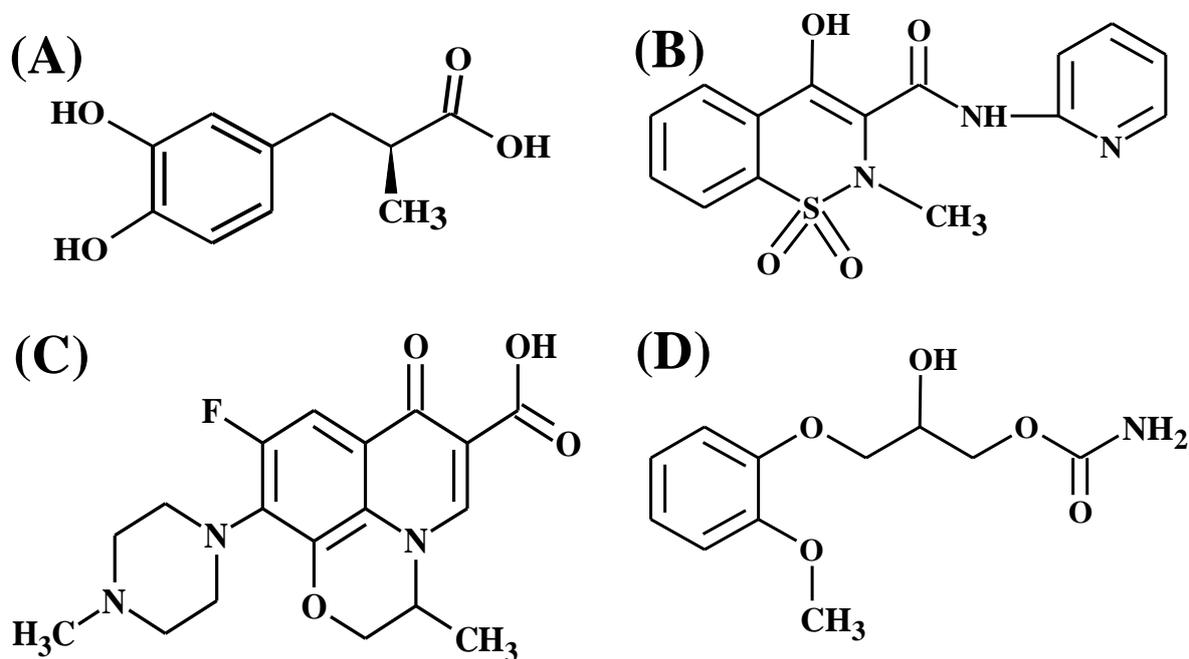


FIGURA 1.12 – Representação das fórmulas estruturais da (A) (S)-levodopa, (B) piroxicam, (C) (R,S)-ofloxacina e (D) metocarbamol.

Portanto, a detecção e quantificação destes analitos são muito importantes para a saúde humana e monitoramento ambiental, pois parte destes produtos farmacêuticos são eliminados na forma metabolizada e não metabolizada. Para a saúde humana a sua detecção visa o diagnóstico de rotina, de forma individualmente ou em combinações, ocasionado pelo consumo indevido ou descontrolado desses medicamentos. No monitoramento ambiental, é devido aos sistemas de tratamento de esgoto não serem capazes de removê-los ou degradá-los totalmente, tornando a detecção simultânea, neste caso, de relevância para o monitoramento das águas naturais¹²⁸⁻¹³¹.

CAPÍTULO 2

Objetivo

2.1 Objetivo geral

Neste trabalho de doutoramento objetivou-se a preparação e caracterização de novos sensores eletroquímicos à base de materiais de carbono e/ou metálicos e avaliar a sua aplicabilidade no desenvolvimento de procedimentos eletroanalíticos para a determinação simultânea e sensível de fármacos em amostras biológicas e/ou ambientais.

CAPÍTULO 3

Determinação simultânea de paracetamol e ciprofloxacina em amostras de fluidos biológicos utilizando um eletrodo de carbono vítreo modificado com grafeno funcionalizado e nanopartículas de óxido de níquel

3.1 Objetivos específicos

Neste trabalho, objetivou-se desenvolver e caracterizar uma nova arquitetura de sensor utilizando um eletrodo de carbono vítreo modificado com grafeno funcionalizado imobilizado em um filme de quitosana reticulada com epicloridrina e nanopartículas de óxido de níquel eletrodepositadas. Desenvolveu-se assim, um método voltamétrico para a determinação simultânea de paracetamol e ciprofloxacina em amostras de fluidos biológicos.

Os resultados reportados e discutidos neste capítulo encontram-se publicados no artigo seguinte: Santos, A. M.; Wong, A.; Almeida, A. A.; Fatibello-Filho, O. “Simultaneous determination of paracetamol and ciprofloxacin in biological fluid samples using a glassy carbon electrode modified with graphene oxide and nickel oxide nanoparticles”, *Talanta* 174 (2017) 610-618. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2017.06.040>. Reproduzido com permissão da *Elsevier*.

3.2 Experimental

3.2.1 Reagentes e soluções

O PAR, CIP, CTS e EPH foram obtidos da Sigma-Aldrich e o GRA foi adquirido comercialmente da *Graphene Supermarket* (Flocos < 12 nm). Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico, com pureza $\geq 97\%$. As soluções estoque de PAR e CIP nas concentrações de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, e todas as outras soluções foram preparadas utilizando água ultrapura obtida em um sistema Milli-Q (Millipore®, Bedfore, MA) com resistividade superior a $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$. As soluções de tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, foram preparadas pela adição de massas adequadas de H_3PO_4 e KH_2PO_4 para os pHs 2,0 - 3,0; KH_2PO_4 para o pH 4,0; KH_2PO_4 e Na_2HPO_4 para os pHs 5,0 - 8,0; Na_2HPO_4 para o pH 9,0 e de Na_2HPO_4 e Na_3PO_4 para o pH 10,0.

3.2.1.1 Preparo das amostras biológicas

Para poder avaliar a potencialidade e seletividade do método desenvolvido, foram utilizadas amostras de soro fetal bovino (adquirido da Sigma-Aldrich) e de urina sintética, que foi preparada contendo a maioria das substâncias presentes neste tipo de amostra. Sendo assim, a amostra de urina sintética foi preparada de acordo como proposto por Laube *et al.*¹³², utilizando um balão volumétrico de 250 mL a partir da adição dos seguintes reagentes: 0,73 g de NaCl, 0,35 g de KH_2PO_4 , 0,56 g de Na_2SO_4 , 0,40 g de KCl, 0,28 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g de NH_4Cl e 6,3 g de ureia. Em seguida, o volume do frasco foi completado com água ultrapura. Posteriormente, a urina sintética e o soro bovino foram divididas em frascos de 5,0 mL e diferentes alíquotas de $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ das soluções padrão dos analitos foram cuidadosamente adicionadas em cada frasco, obtendo-se assim diferentes concentrações. Finalmente, 300 μL da solução foram adicionados à célula eletroquímica e completado com o eletrólito suporte (volume final de 10,0 mL).

3.2.2 Instrumentação

As pesagens analíticas foram realizadas empregando uma balança Mettler (modelo H10) com precisão de $\pm 0,1 \text{ mg}$ ou uma balança Shimadzu, modelo AUW220D (precisão $\pm 0,01 \text{ mg}$). As medidas do pH das soluções foram realizadas utilizando um pHmetro Orion (modelo EA 940), conectado à um eletrodo de vidro Digimed e um eletrodo de referência externo de Ag/AgCl ($\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$) combinados em um único corpo. Para a preparação das dispersões e limpeza do GCE foi utilizado um banho ultrassom Unique modelo USC-1400A (Indaiatuba, Brasil), com frequência ultrassônica de 40 kHz. O polimento do GCE foi realizado empregando uma Politriz/Lixadeira metalográfica Aropol VV-PU, utilizando um pano autoadesivo para polimento metalógrafo da AROTEC (modelo FVL), com diâmetro de 200 mm.

As características físicas, químicas e morfológicas do GRA e FG, assim como da superfície do GCE modificada foram avaliadas utilizando diferentes técnicas. As análises do grau de molhabilidade por medidas do ângulo de contato foram realizadas utilizando um equipamento TECHNIQUIP modelo 21AC controlado pelo software DROPimage. As análises de espectroscopia de fotoelétrons de raios-X (XPS, do inglês “*X-Ray Photoelectron Spectroscopy*”) foram realizadas em um sistema de análise de superfície UNH-SPECS UHV utilizando radiação de Mg K α ($h\nu = 1253,6$ eV) e uma energia de passagem de 10 eV para espectros de alta resolução, já o software CasaXPS, foi usado para a determinação da composição da superfície dos materiais (GRA e FG) e para a deconvolução dos espectros do C 1s usando os perfis de linha de base de Shirley e Voigt. Para as análises de microscopia eletrônica de varredura (SEM, do inglês “*Scanning Electron Microscopy*”) foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura com emissão de campo Magellan 400L e para as análises de microscopia eletrônica de transmissão (TEM, do inglês “*Transmission Electron Microscopy*”) foi empregado um microscópio de transmissão FEI Tecnai G2 F20.

Para o método comparativo foi utilizado um espectrofotômetro Shimadzu UV-Vis (modelo 2550) equipado com uma cubeta de quartzo de 1 cm, onde foi medida a absorvância de cada fármaco.

As medidas eletroquímicas, a saber, voltametria cíclica (CV, do inglês “*Cyclic Voltammetry*”), espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS, do inglês “*Electrochemical Impedance Spectroscopy*”), voltametria de onda quadrada (SWV, do inglês “*Square-Wave Voltammetry*”) e voltametria de pulso diferencial (DPV, do inglês, “*Differential Pulse Voltammetry*”) foram realizadas utilizando um potenciostato/galvanostato AUTOLAB PGSTAT - 12 (Eco Chemie) interfaciado a um microcomputador gerenciado pelo software GPES 4.9. As medidas obtidas por SWV tiveram sua linha base corrigida pelo método da média móvel (largura do pico: 0,03) disponível no software GPES 4.9.

Todos os experimentos eletroquímicos foram realizados com o auxílio de uma célula de vidro Pyrex® de compartimento único e capacidade de 10 mL equipada com uma tampa de Teflon®, contendo três orifícios nos quais foram acoplados os eletrodos de trabalho, referência e contra eletrodo. O eletrodo de trabalho utilizado foi o GCE ($\varnothing = 3$ mm) com e sem modificação, eletrodo de referência (Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹)) e um contra eletrodo composto por uma placa de platina de 0,5 cm² (Figura 3.1).

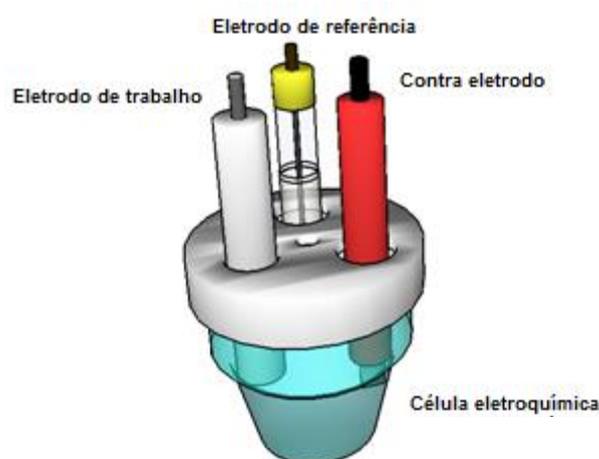


FIGURA 3.1 – Representação da célula eletroquímica contendo os três eletrodos.

3.2.3 Funcionalização do Grafeno

O GRA (obtido comercialmente) foi funcionalizado empregando-se uma mistura de dois ácidos fortes, HNO₃/H₂SO₄ (1:1 v/v). Assim, 1,0 g de GRA e 100 mL dos ácidos foram misturados em um béquer de 250 mL e a mistura foi mantida sob agitação com o auxílio de um agitador magnético durante aproximadamente 12 h à temperatura ambiente. Em seguida, o material obtido por centrifugação foi lavado com água ultrapura até a solução atingir pH próximo a 7,0 e, posteriormente, secado em estufa a 100 °C durante aproximadamente 12 h (FIGURA 3.2)⁵⁷.



FIGURA 3.2 – Representação esquemática do processo de funcionalização do GRA.

3.2.4 Modificação da superfície do eletrodo de carbono vítreo

Para a realização da modificação do GCE, primeiramente, a superfície do GCE foi cuidadosamente polida em politriz com micropartículas de alumina 0,05 μm em um pano de polimento e, em seguida, limpo com álcool isopropílico e água ultrapura por 3 min com o auxílio de um banho ultrassom. A dispersão de FG-CTS:EPH foi preparada usando 1,0 mg de FG em 250 μL de solução de CTS 0,1% (m/v), 250 μL de solução de EPH 0,1% (v/v) dissolvida em NaOH 0,1 mol L⁻¹ e 500 μL de água ultrapura. A mistura foi submetida a agitação em banho ultrassônico durante 40 minutos para se obter uma dispersão homogênea (Figura 3.3 A).

Por fim, pelo método de *drop-casting* 8,0 μL da dispersão foram depositados sobre a superfície do eletrodo, o qual permaneceu em repouso no interior de um dessecador por aproximadamente 3 h até secagem da dispersão e formação do filme (Figura 3.3 B).

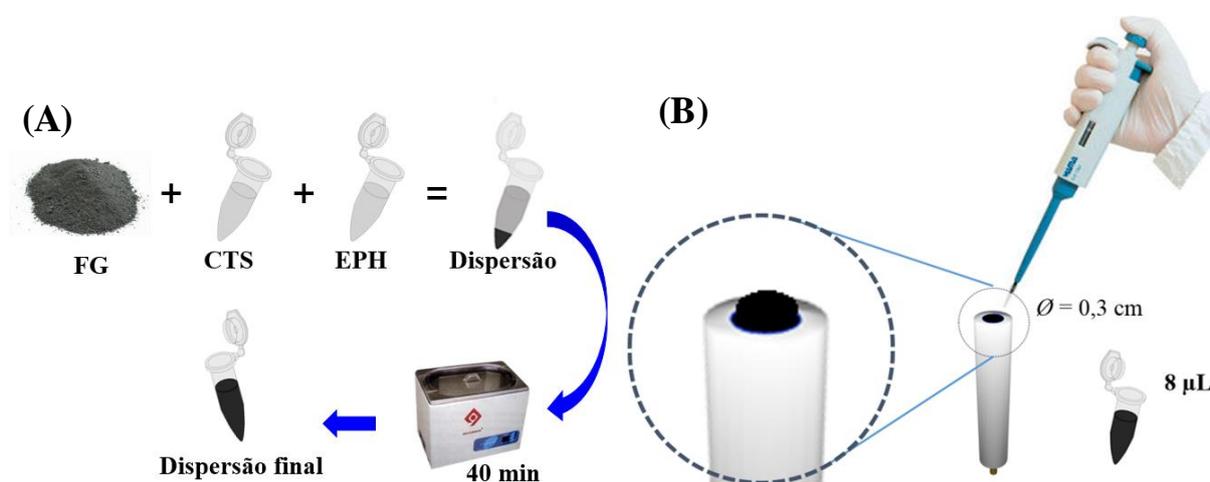


FIGURA 3.3 – (A) Preparação da dispersão e (B) método de *drop-casting*.

3.2.5 Preparação das nanopartículas de óxido de níquel e formação do sensor NiONPs-FG-CTS:EPH/GCE

A obtenção das nanopartículas de NiO(OH) (NiONPs) sobre a superfície do sensor FG-CTS:EPH/GCE foi realizada em duas etapas. Na primeira etapa, realizou-se a eletrodeposição das nanopartículas de Ni, sendo que, para isso utilizou-se a CV (40 ciclos) no intervalo de potenciais de 0 a $-0,8$ V em uma velocidade de varredura de potenciais de 100 mV s^{-1} e solução de tampão acetato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0) contendo $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ ¹³³. Por fim, empregou-se a CV entre 0 e $+0,6$ V (40 ciclos) a uma velocidade de varredura de potenciais de 100 mV s^{-1} em solução de NaOH $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, para que ocorresse a eletrodissolução e passivação (formação das NiONPs) na superfície do FG-CTS:EPH/GCE¹³³.

3.2.6 Procedimento analítico

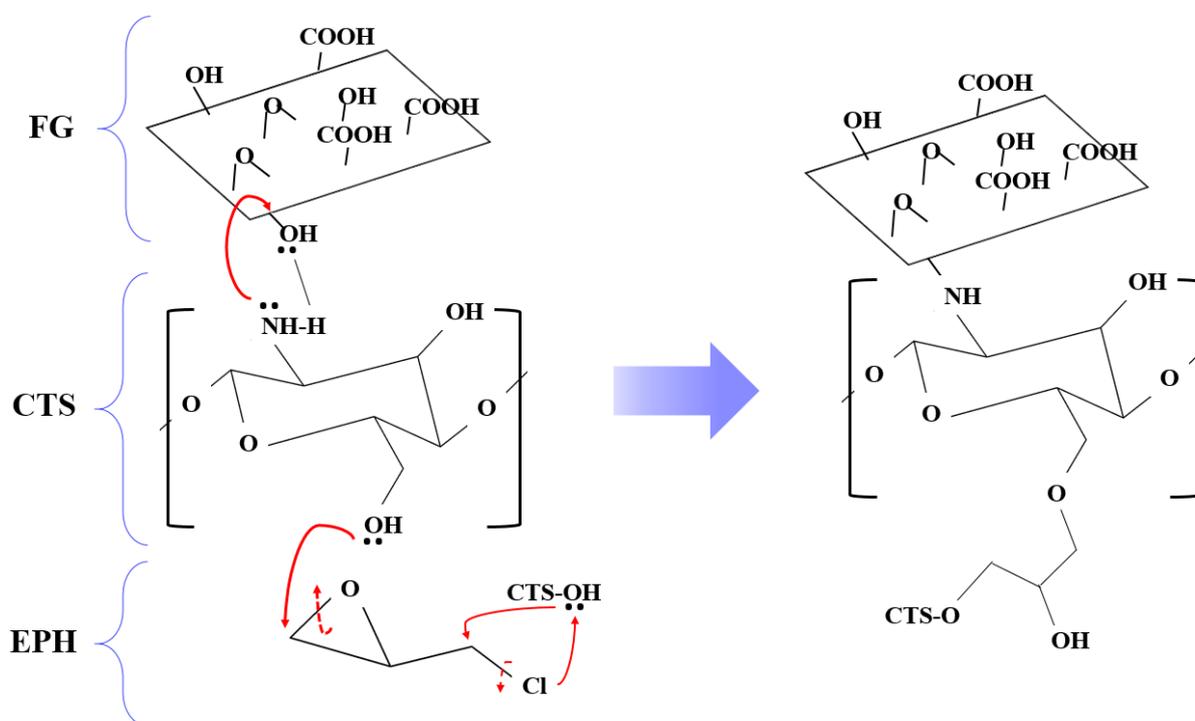
Primeiramente, para a obtenção do filme (NiONPs-FG-CTS:EPH) sobre a superfície do GCE foi investigada a influência da concentração de FG (mg mL^{-1}), seguido pela eletrodeposição das NiONPs. Após essa etapa, realizou-se a caracterização eletroquímica do GCE e suas respectivas modificações utilizando solução de hexacianoferrato (III) de potássio ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) e

hexacianoferrato (II) de potássio ($K_4Fe(CN)_6$) em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte, empregando CV e EIS. Em seguida, o comportamento eletroquímico dos analitos PAR e CIP foram avaliados por CV, seguido da otimização das condições experimentais, como eletrólito suporte (composição e pH), e os parâmetros para SWV (amplitude (a), frequência (f) e incremento de potencial (ΔE_s)). Sob as condições ótimas, as curvas analíticas foram construídas usando adições sucessivas de soluções padrão de PAR e CIP. Os voltammogramas de SW tiveram as linhas bases corrigidas pelo método da média móvel disponível no software GPES 4.9. O LOD foi calculado como sendo três vezes o desvio-padrão de dez medidas do branco ($n = 10$) dividido pelo coeficiente angular da curva analítica (sensibilidade analítica)¹³⁴. A precisão do método proposto foi verificada a partir de estudos de repetibilidade intra-dia ($n = 5$) e inter-dias ($n = 3$). Por fim, o procedimento voltamétrico proposto para a determinação simultânea de PAR e CIP foi empregado na análise de amostras de fluidos biológicos (urina e soro).

3.3 Resultados e Discussão

Inicialmente para o preparo da dispersão utilizou-se $250 \mu\text{L}$ de CTS $0,1\%$ (m/v), $250 \mu\text{L}$ de EPH $0,1\%$ (v/v) e $500 \mu\text{L}$ de água ultrapura. Estas proporções foram aquelas que mostraram gerar uma composição ótima para obtenção de um filme homogêneo e estável contendo os materiais carbonáceos, com aderência adequada e baixa corrente capacitiva. Por outro lado, decidiu-se investigar em mais detalhes o efeito da quantidade de FG utilizada para a obtenção do filme. Neste estudo, empregando a SWV foram estudadas diferentes concentrações de FG nas dispersões, a saber: $0,50$, $1,0$, $1,5$ e $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$. Os sinais de corrente de pico de maior magnitude para ambos os analitos (PAR e CIP) foram obtidos para o eletrodo modificado preparado a partir da dispersão contendo FG na concentração de $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$ sendo, portanto, esta dispersão utilizada para o preparo dos eletrodos modificados.

Assim, o sensor proposto foi desenvolvido empregando-se um filme de CTS reticulada como matriz polimérica para a incorporação do FG e posterior eletrodeposição das NiONPs. Este polímero (CTS) apresentou boa homogeneidade e aderência sobre a superfície do GCE utilizando EPH como agente de reticulação. Neste contexto, a EPH é um composto organoclorado e epóxido, que forma ligações covalentes com os grupos hidroxila da CTS. O Esquema 3.1 ilustra o possível mecanismo para a ligação entre a EPH e os grupos hidroxila da CTS, resultando na ruptura do anel epóxido e na remoção de um átomo de cloro do monômero da EPH^{135,136}. Nessa ilustração, é possível observar que a EPH está conectada a duas moléculas de CTS. Além disso, há uma possível reação de reticulação entre o grupo amino da CTS e os grupos hidroxila presentes na estrutura do FG^{135,137}. Este fenômeno pode explicar a estabilidade de resposta, aderência e resistência a longo prazo verificados para o eletrodo modificado proposto.



Esquema 3.1 – Ilustração do possível mecanismo da reação de reticulação para CTS usando EPH na presença de FG.

3.3.1 Caracterização dos materiais carbonáceos

Com o processo de funcionalização do GRA, vários átomos de carbono sp^2 são oxidados a sp^3 com a adição de grupos funcionais oxigenados como: hidroxila, carbonila e carboxila. Estes grupos funcionais são inseridos tanto no plano de superfície quanto no plano de borda das folhas de grafeno, o que pode vir a provocar a formação de alguns defeitos estruturais nas folhas do material. Assim, com o processo de funcionalização controlado, as folhas de GRA podem vir a apresentar um aumento na sua reatividade e hidrofilicidade. Desta forma, para avaliar o efeito da funcionalização do GRA, preparou-se uma dispersão contendo cada um destes materiais (GRA e FG) utilizando apenas água ultrapura. Como pode ser observado na FIGURA 3.4, o procedimento de funcionalização do GRA permitiu a formação de uma dispersão estável por maior tempo devido ao caráter hidrofílico obtido pela inserção de grupos funcionais oxigenados no material.

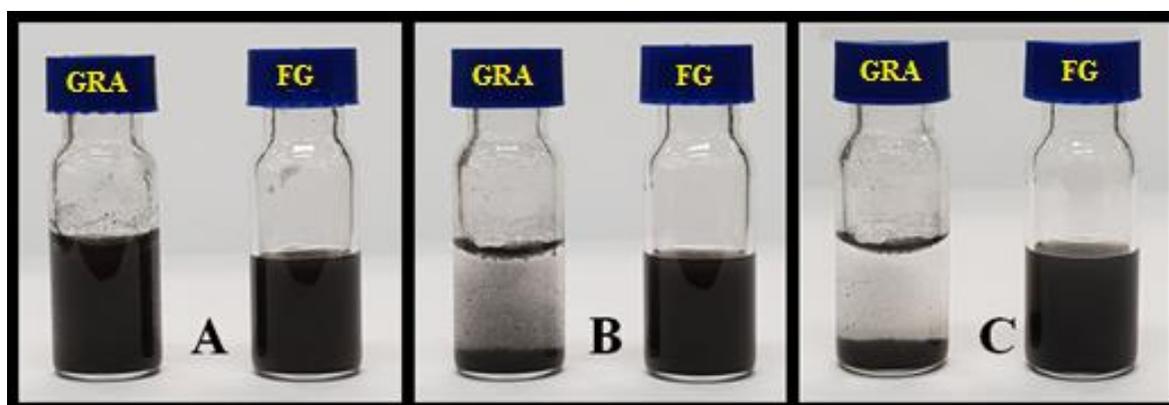


FIGURA 3.4 – Dispersões de GRA e FG em água ultrapura após (A) 0, (B) 30 e (C) 60 min.

Outro teste realizado foi o da molhabilidade dos diferentes materiais de carbono utilizados (GCE, GRA-GCE e FG-GCE). Este estudo foi realizado a partir de medidas de ângulos de contato empregando uma gota de água ultrapura. Na FIGURA 3.5 encontram-se as imagens obtidas para os diferentes materiais carbonáceos utilizados como eletrodo e os respectivos valores dos ângulos de

contato (média entre os dois ângulos internos). A imagem da FIGURA 3.5A corresponde ao GCE sem modificação, para o qual foi obtido um ângulo de contato de 72° , indicando assim um material de baixa hidrofiliicidade. Porém, como pode ser observado na FIGURA 3.5B, referente ao GRA não funcionalizado (GRA-GCE) um menor ângulo de contato (36°) foi obtido. Outrossim, esse ângulo de contato foi maior do que o obtido para o GRA funcionalizado (FG-GCE), que apresentou um ângulo de contato de 17° , como mostrado na FIGURA 3.5C. Essa redução do ângulo de contato (maior molhabilidade) do FG pode ser atribuída à incorporação dos grupos oxigenados que foram inseridos no FG durante o processo de funcionalização, aumentando assim a sua hidrofiliicidade. Portanto, o caráter hidrofílico desses materiais apresentou a seguinte ordem: GCE < GRA-GCE < FG-GCE.

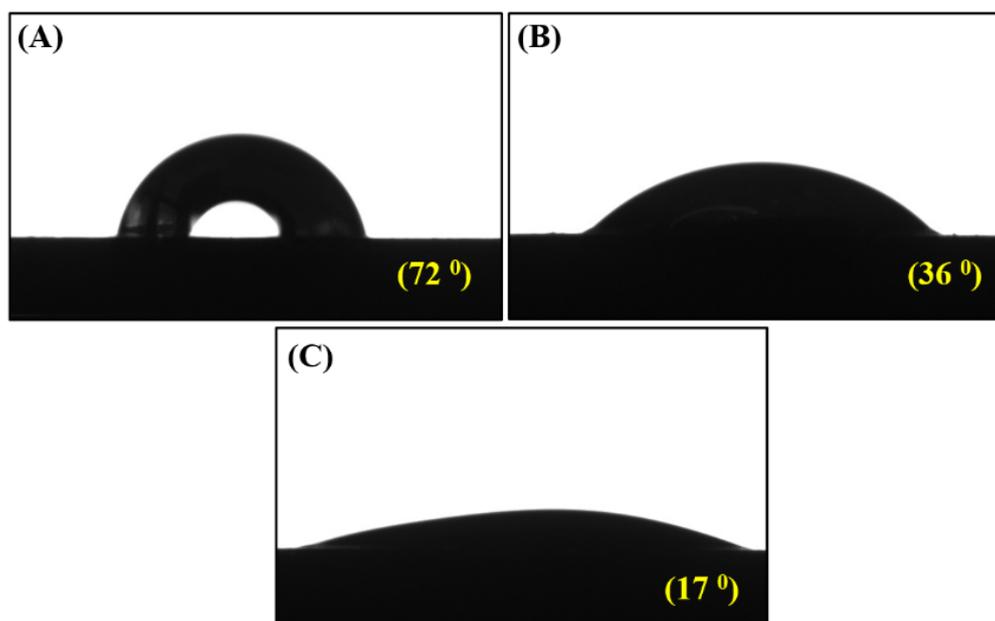


FIGURA 3.5 – Ângulo de contato da amostra: (A) GCE, (B) GRA-GCE e (C) FG-GCE.

Em seguida, para investigar a composição química dos diferentes materiais carbonáceos realizou-se a análise de XPS e, como pode ser observado no espectro de linha inserido na FIGURA 3.6A-B, ambos os nanomateriais

apresentaram dois picos em energia de ligação bem definidos, sendo eles um pico em aproximadamente 285,4 eV, referente ao C 1s (GRA = 96,8% e FG = 87,3%) e outro em 530,9 eV, correspondente ao O 1s (GRA = 3,2% e FG = 12,7%). Assim, para uma maior compreensão da composição química do GRA antes e depois do processo de funcionalização (FG), realizou-se a deconvolução dos espectros XPS do C 1s (FIGURA 3.6A-B). Ou seja, o espectro de alta resolução do sinal do C 1s mostra o grau de oxidação e o tipo de grupos funcionais ligados aos átomos de carbono, sendo os picos em energia de ligação atribuídas às ligações C-C aromático (carbono sp^2 , 284,5 eV); C-H (285,6 eV); C-O (éter/álcool, 286,5 eV), C=O (éster/álcool, 286,5 eV), C=O (carbonila, 287,6 eV), O-C=O (carboxila, 289,5 eV) e pico satélite $p-p^*$ (*shake up*, 290,9 eV).

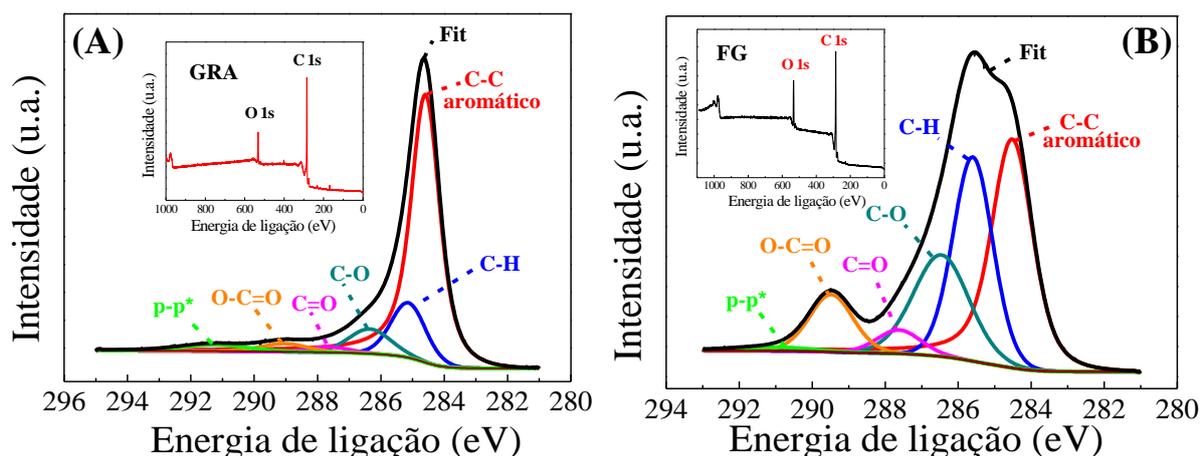


FIGURA 3.6 – Espectro XPS de alta resolução C 1s do (A) GRA e (B) FG. Insete: espectro XPS.

Desta forma, ao comparar-se os espectros da FIGURA 3.6A referente ao GRA com aqueles da FIGURA 3.6B referente ao FG é possível observar uma grande diferença na intensidade dos picos, atribuídos para cada tipo de ligação. No caso do GRA, o pico referente a ligação aromática (C-C sp^2) apresentou uma elevada intensidade de sinal, mascarando assim os demais picos, indicando desta forma um alto grau de ordem da estrutura de carbono hexagonal, o que é bem característico para este tipo de material¹³⁸⁻¹⁴⁰. Por outro lado, a deconvolução do

espectro do C 1s para o FG exibiu um aumento na magnitude dos picos referentes as ligações de carbono com grupos oxigenados (C-O, C=O e O-C=O) e C-H com uma conseqüente diminuição do pico referente a ligação C-C aromático (carbono sp^2), o que também está de acordo com o esperado, pois devido ao processo de funcionalização grupos oxigenados foram inseridos nos planos de carbono hexagonal. Comparando-se os resultados obtidos para o GRA e FG com outros trabalhos relatados na literatura, o FG apresentou intensidades de pico entre os valores típicos verificados para GRA e óxido de grafeno, no qual, os espectros típicos para óxido de grafeno apresentam uma intensidade de pico referente, principalmente, às ligações C-O maior que a das ligações C-C sp^2 , demonstrando assim que o FG obtido é um material intermediário, ou seja, diferente portanto do óxido de grafeno^{6,138-141}.

Por fim, a caracterização morfológica dos diferentes materiais, a saber: GRA, FG e NiONPs-FG foram realizadas por SEM e/ou TEM. Na FIGURA 3.7 são apresentadas as imagens obtidas por SEM do (A) GRA, (B) FG e (C-E) NiONPs-FG em diferentes ampliações. Ao analisar as imagens, é possível observar que o GRA exibiu uma estrutura de folhas aglomeradas em blocos e, por outro lado o FG mostrou folhas enrugadas dispostas de diferentes tamanhos, ou seja, uma estrutura típica para este tipo de material⁵⁷. Na FIGURA 3.7E, é possível observar que as nanofolhas de FG se encontram decoradas com NiONPs e que praticamente toda superfície do nanomaterial foi recoberta com nanopartículas, indicando assim uma combinação perfeita entre as NiONPs e as nanofolhas de FG. Estes dados demonstram claramente a distribuição densa e homogênea das NiONPs na superfície das folhas de FG com um diâmetro médio de 24 nm, conforme mostrado no histograma da FIGURA 3.7F, de tamanho semelhante aos relatados na literatura¹⁴². Nas FIGURAS 3.7 (G-I) obtidas por TEM em diferentes ampliações, é possível observar a complexidade da estrutura das finas folhas de FG, nos quais as camadas individuais não são completamente planas, ou seja, as folhas flexíveis do material tendem a dobrar e enrugar. Neste contexto,

Neto *et al.*¹⁴³ reportaram que essa flexibilidade das folhas de GRA estão relacionadas aos fônons fora do plano, ou seja, vibrações de flexão, que ocorrem nas finas camadas, o que significa que o grafeno livre tende a amassar.

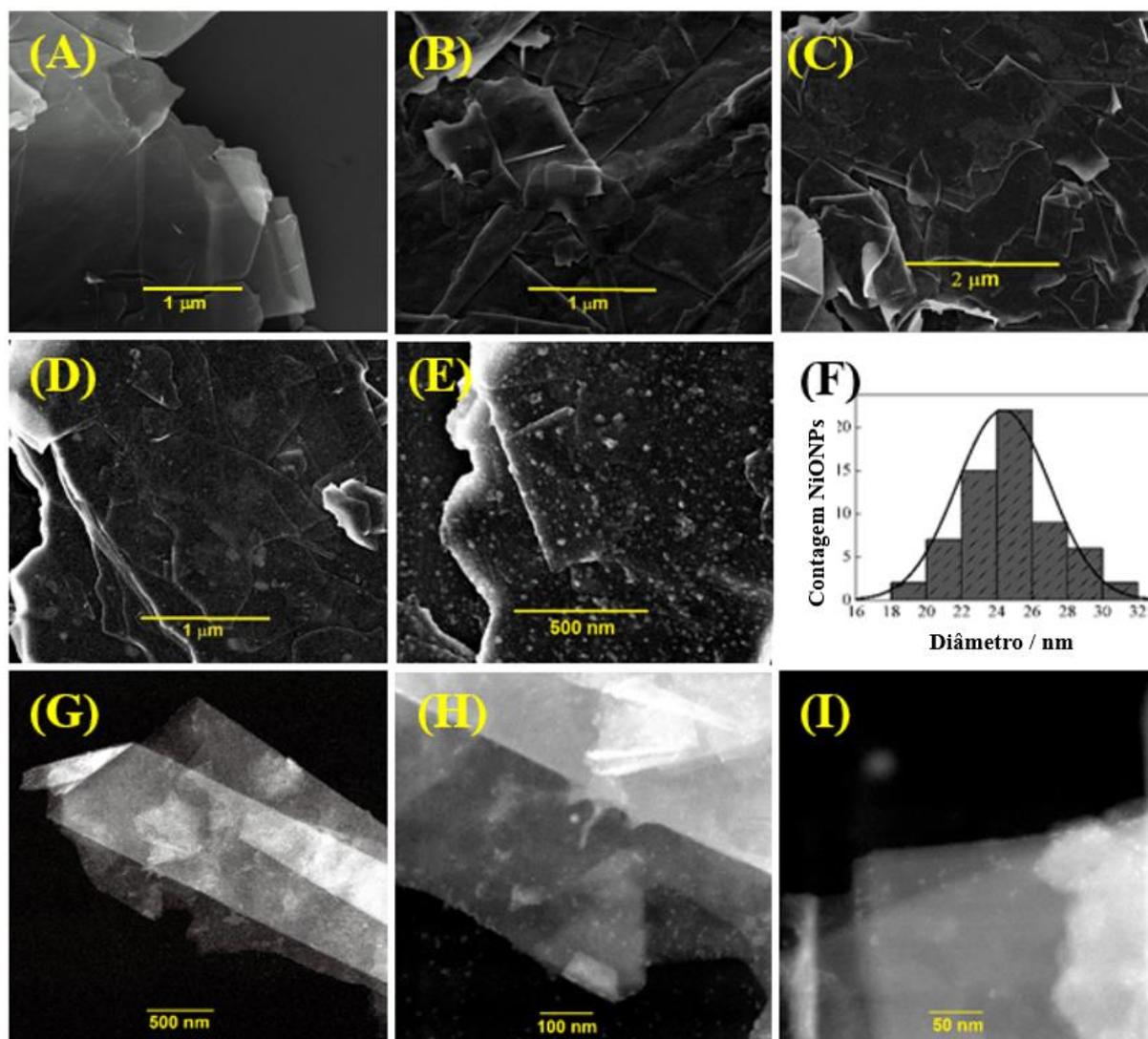


FIGURA 3.7 – Imagem SEM do (A) GRA, (B) FG e (C-E) NiONPs-FG; (F) Histograma correspondente dos diâmetros das NiONPs. (G - I) Imagens de TEM obtidas para FG.

3.3.2 Caracterização eletroquímica das NiONPs no FG-CTS:EPH/GCE

A eletrodeposição das NiONPs na superfície do FG-CTS:EPH/GCE foi realizada adaptando-se o procedimento proposto por ROUSHANI *et al.*¹³³ e descrito na seção 3.2.5. A formação das NiONPs na superfície do eletrodo

(NiONPs-FG-CTS:EPH/GCE) foi confirmada pelo comportamento eletroquímico demonstrado por CV para uma solução de NaOH 0,10 mol L⁻¹ em uma velocidade de varredura de potencial (v) de 50 mV s⁻¹, como pode ser observado na FIGURA 3.8.

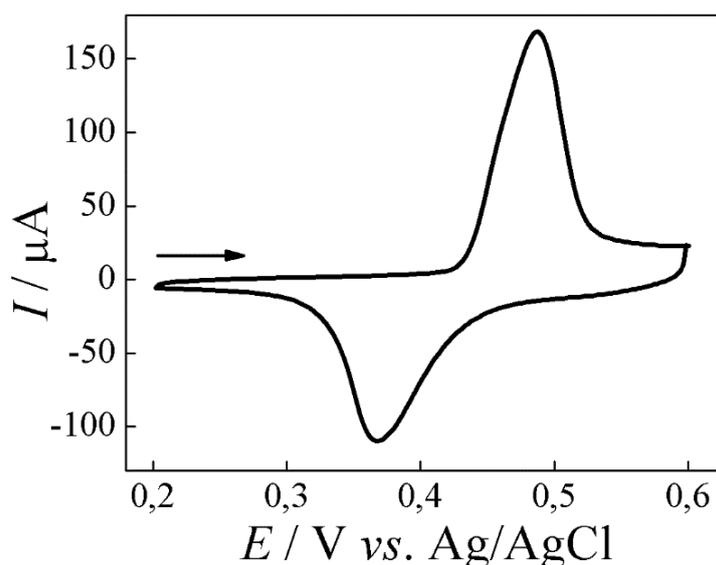
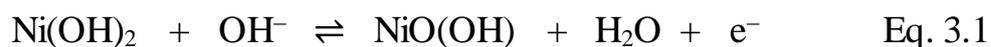


FIGURA 3.8 – Voltamogramas cíclicos para uma solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ empregando NiONPs-FG-CTS:EPH/GCE a uma velocidade de varredura de potencial (v) de 50 mV s⁻¹.

Assim, durante o processo de eletrodissolução e passivação das NiONPs é gerado o Ni(OH)₂ que, subsequentemente, em meio alcalino é oxidado (pico anódico) para NiO(OH) e, em seguida, após a inversão do sentido de varredura de potencial (pico catódico) são reduzidas a Ni(OH)₂, como mostrado na semi-reação redox mostrada a seguir (Eq. 3.1)¹³³:



3.3.3 Determinação da área eletroativa

A determinação da área eletroativa para os eletrodos: GCE, GRA-CTS:EPH/GCE, FG-CTS:EPH/GCE e NiONPs-FG-CTS:EPH/GCE, foi realizada

utilizando-se a CV em diversas velocidades de varredura de potenciais (10 a 400 mV s⁻¹), utilizando como sonda redox [Fe(CN)₆]³⁻ 1,0 mmol L⁻¹ em KCl 0,10 mol L⁻¹ como eletrólito suporte (FIGURAS 3.9A-D). Para cada modificação construiu-se um gráfico de corrente de pico (I_p) vs. raiz quadrada da velocidade de varredura de potenciais ($v^{1/2}$), os quais podem ser visualizados na FIGURA 3.9E.

Desta forma, na relação da I_{pa} vs. $v^{1/2}$ e I_{pc} vs. $v^{1/2}$ os gráficos foram lineares em todos os casos com um coeficiente de correlação maior ou igual a 0,993, como esperado para um processo controlado por difusão. Desta forma, as áreas eletroativas dos eletrodos desenvolvidos foram estimadas utilizando a equação de Randles-Sevcik (Eq. 3.2)¹⁴⁴.

$$I_p = \pm (2,69 \times 10^5) n^{3/2} AD^{1/2} C v^{1/2} \quad \text{Eq. 3.2}$$

sendo I_p a corrente de pico (A), A a área eletroativa (cm²), C a concentração de [Fe(CN)₆]³⁻ em solução (mol cm⁻³), D o coeficiente de difusão da espécie em solução ($7,6 \times 10^{-6}$ cm² s⁻¹), n é o número de elétrons envolvidos na reação redox e v a velocidade de varredura de potencial (V s⁻¹).

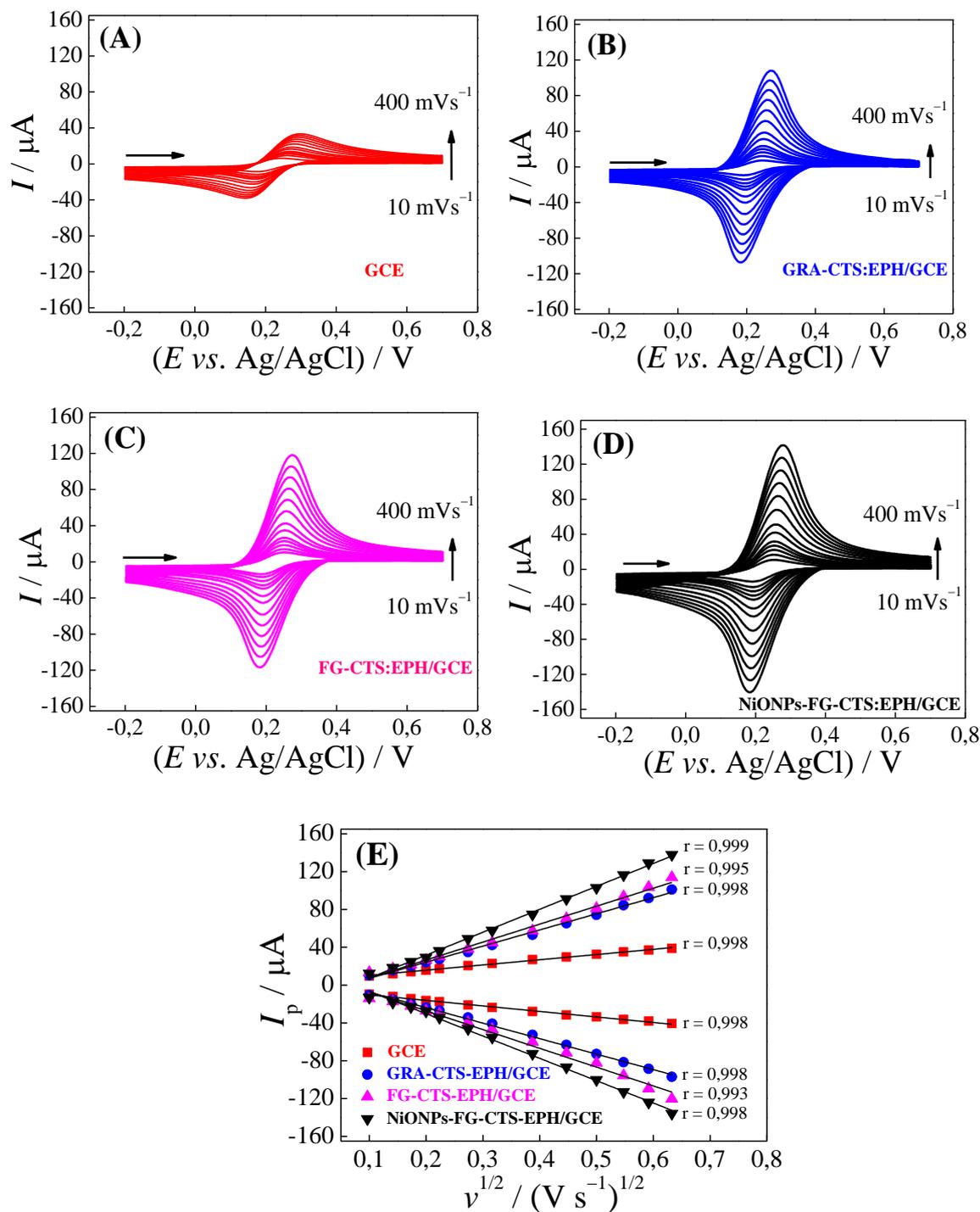


FIGURA 3.9 – Voltamogramas cíclicos para $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ em solução de $\text{KCl } 0,10 \text{ mol L}^{-1}$ empregando (A) GCE, (B) GRA-CTS:EPH/GCE, (C) FG-CTS:EPH/GCE e (D) NiONPs-FG-CTS:EPH/GCE para diferentes velocidades de varredura de potencial (v) (10, 20, 30, 40, 50, 75, 100; 150; 200; 250; 300; 350 e 400 mV s^{-1}). (E) Gráficos de I_p vs. $v^{1/2}$ obtidos para os diferentes eletrodos.

Os coeficientes angulares obtidos para as curvas de I_p vs. $v^{1/2}$ para o processo de oxidação do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ foram de $5,51 \times 10^{-5} \text{ A V}^{-1/2} \text{ s}^{1/2}$ para o GCE, $1,71 \times 10^{-4} \text{ A V}^{-1/2} \text{ s}^{1/2}$ para o GRA-CTS:EPH/GCE, $1,90 \times 10^{-4} \text{ A V}^{-1/2} \text{ s}^{1/2}$ para o FG-CTS:EPH/GCE e $2,42 \times 10^{-4} \text{ A V}^{-1/2} \text{ s}^{1/2}$ para o NiONPs-FG-CTS:EPH/GCE. As áreas eletroativas obtidas foram de 0,074, 0,21, 0,26 e 0,33 cm^2 para o GCE, GRA-CTS:EPH/GCE, FG-CTS:EPH/GCE e NiONPs-FG-CTS:EPH/GCE, respectivamente. A partir desses resultados, foi possível concluir que a resposta eletroquímica utilizando a sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ é significativamente afetada pela modificação da superfície do GCE. De fato, a combinação do NiONPs-FG-CTS:EPH/GCE ocasionou em um aumento da área eletroativa em 4,5 vezes em relação ao GCE sem modificação.

3.3.4 Caracterização por EIS

Como forma de explorar ainda mais o comportamento eletroquímico das diferentes modificações, realizou-se experimentos eletroquímicos empregando a EIS. Estas análises foram realizadas na faixa de frequência de 100 KHz a 0,1 Hz e amplitude de 10 mV utilizando como sonda redox o par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 2,5 mmol L^{-1} em KCl 0,1 mol L^{-1} , no qual o potencial aplicado foi selecionado empregando a CV (potencial de meia-onda, $E_{1/2}$). Esta técnica vem sendo muito utilizada para a caracterização das propriedades de transferência heterogênea de elétrons na interface eletrodo/solução. Na FIGURA 3.10 estão representados os diagramas de Nyquist para os diferentes eletrodos, e como pode ser observado, estes diagramas apresentam duas partes bem distintas, uma parte semicircular em altas frequências e uma parte linear em frequências inferiores. O intervalo linear é atribuído ao controle difusional das espécies eletroativas e, o semicírculo representa a combinação paralela entre a resistência de transferência de carga (R_{ct}) e a capacitância da dupla camada elétrica. Este semicírculo corresponde à transferência limitada de elétrons, e o seu diâmetro é igual a R_{ct} . Portanto, quanto maior o semicírculo, maior será a R_{ct} .

Os espectros de impedância foram ajustados empregando um circuito equivalente de Randles (adaptado), como pode ser visto na FIGURA 3.10 (inserido). Este circuito inclui a resistência da solução (R_s) em série com a combinação paralela da R_{ct} e uma impedância de Warburg (W) com um elemento de fase constante (CPE). Desta forma, as R_{ct} obtidas foram de 1020, 170, 61 e 16 Ω , para o GCE; GRA-CTS-EPH/GCE; FG-CTS-EPH/GCE e NiONPs-FG-CTS-EPH/GCE, respectivamente. Assim, para o GCE obteve-se um grande semicírculo implicando em uma elevada R_{ct} . Já para os eletrodos modificados houve uma diminuição do semicírculo, indicando um aumento da condutividade do eletrodo, com uma conseqüente diminuição do valor da R_{ct} .

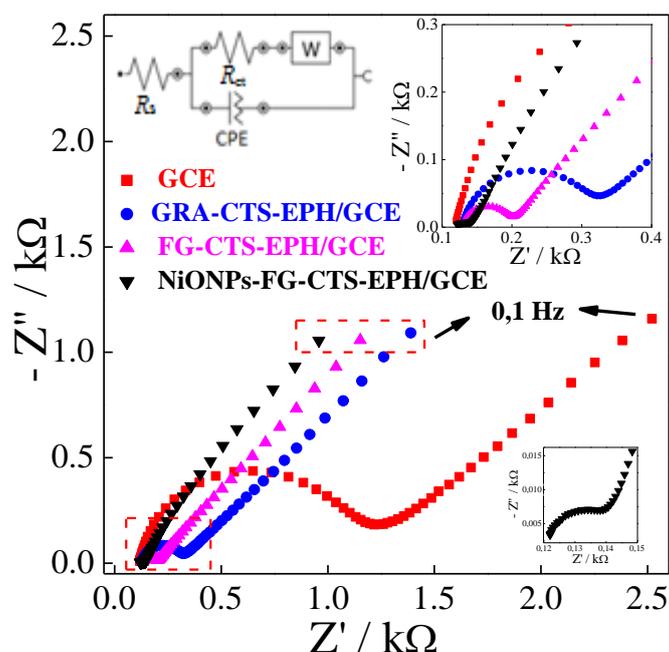


FIGURA 3.10 – Diagramas de Nyquist obtidos para (■) GCE, (●) GRA-CTS:EPH/GCE, (▲) FG-CTS:EPH/GCE e (▼) NiONPs-FG-CTS:EPH/GCE empregando como sonda redox o par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ na concentração de $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução de $\text{KCl } 0,10 \text{ mol L}^{-1}$. Intervalo de frequência de 100 KHz a 0,1 Hz.

Os valores obtidos de R_{ct} foram, em seguida, usados para o cálculo das respectivas constantes heterogêneas de transferência de elétrons (k^0) para os eletrodos de acordo com a Eq. 3.3:

$$k^0 = \frac{RT}{F^2 R_{ct}AC} \quad \text{Eq. 3.3}$$

sendo k^0 a constante heterogênea de transferência de elétrons (cm s^{-1}), R a constante universal dos gases ($8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T a temperatura termodinâmica ($298,15 \text{ K}$), F a constante de Faraday (96485 C mol^{-1}), R_{ct} a resistência de transferência de carga (Ω), A a área superficial do eletrodo (cm^2) e C a concentração da solução $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ ($2,5 \text{ mmol cm}^{-3}$).

Os valores obtidos de k^0 para o GCE, GRA-CTS:EPH/GCE, FG-CTS:EPH/GCE e NiONPs-FG-CTS:EPH/GCE foram de $1,96 \times 10^{-3}$, $1,18 \times 10^{-2}$, $3,28 \times 10^{-2}$ e $1,25 \times 10^{-1} \text{ cm s}^{-1}$, respectivamente. Sendo assim, um sistema com um valor baixo de k^0 alcançará o equilíbrio em uma escala de tempo maior do que um sistema com um valor mais alto de k^0 , que neste caso alcançará o equilíbrio em uma escala de tempo menor. Assim, com o NiONPs-FG-CTS:EPH/GCE, o valor k^0 é maior do que com o GCE, GRA-CTS:EPH/GCE e FG-CTS:EPH/GCE, indicando neste caso, uma transferência mais rápida de elétrons.

3.3.5 Estudo do comportamento eletroquímico do PAR e da CIP

Inicialmente, avaliou-se o comportamento eletroquímico do PAR e da CIP de forma individual e simultânea empregando a CV com os diferentes eletrodos. Na FIGURA 3.11(A-C) estão representados os voltamogramas cíclicos obtidos para as soluções de PAR ($0,10 \text{ mmol L}^{-1}$) e/ou CIP ($0,050 \text{ mmol L}^{-1}$) preparadas em tampão fosfato $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0).

Como pode ser observado na FIGURA 3.11, ambos os fármacos, de forma individual (FIGURA 3.11A e B) ou simultânea (FIGURA 3.11C),

apresentaram picos de oxidação bem definidos em potenciais de +0,45 e +1,0 V, para PAR e CIP, respectivamente.

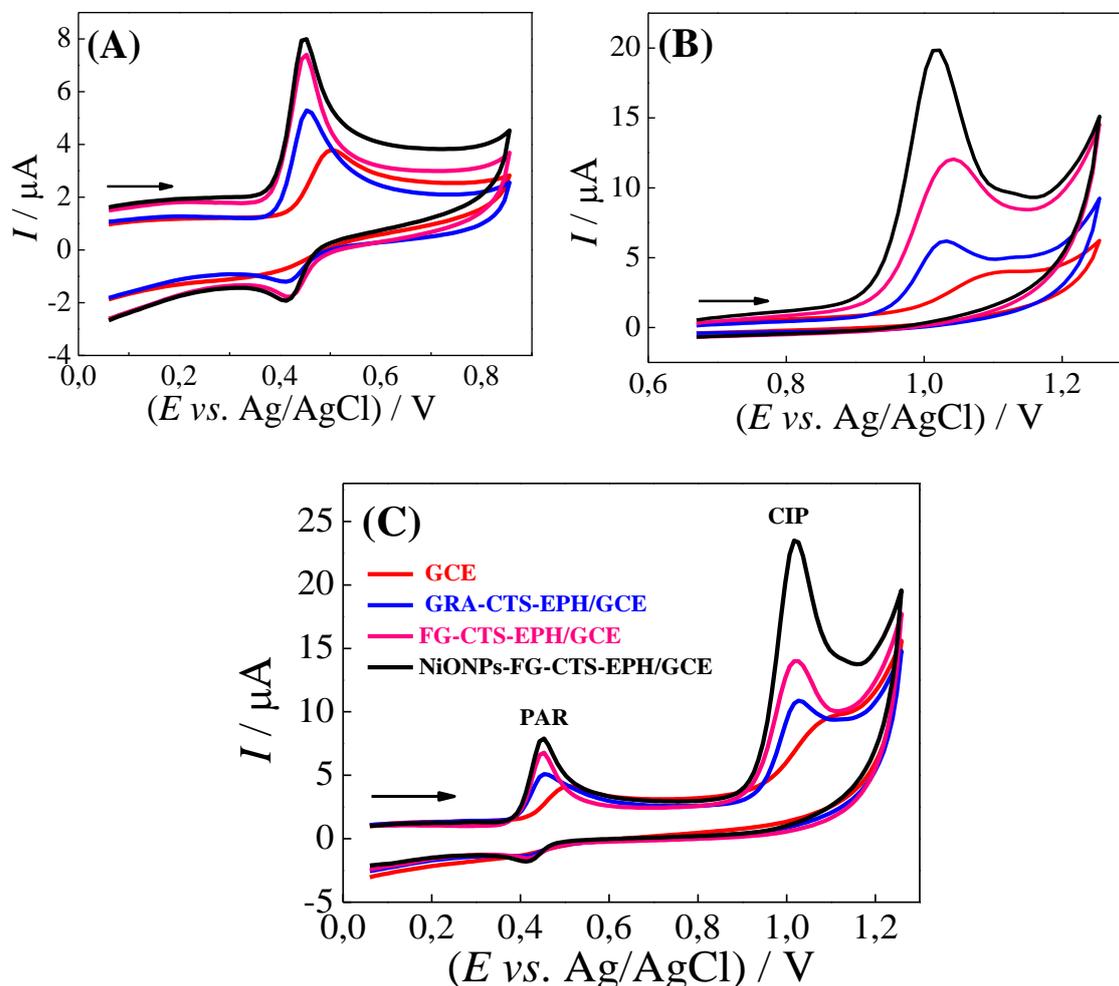


FIGURA 3.11 – Voltamogramas cíclicos para PAR 0,10 mmol L⁻¹ (A), CIP 0,050 mmol L⁻¹ (B) e PAR e CIP simultaneamente (C). Solução tampão fosfato 0,20 mol L⁻¹ (pH 6,0) a uma $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Além disso, o PAR apresentou um pequeno pico de redução, com razão entre as correntes de pico anódica (I_{pa}) e catódica (I_{pc}) maior que a unidade ($I_{pa} / I_{pc} = 3,5$), o que caracteriza um processo redox *quase-reversível*. Por outro lado, a ausência de picos de redução durante a varredura de potencial catódico para a CIP indica que o processo de oxidação observado para esta molécula foi irreversível. Além disso, o sensor NiONPs-FG-CTS:EPH/GCE apresentou maior

magnitude de corrente de pico anódica (I_{pa}) para ambos os compostos, e ao comparar com os resultados obtidos para o GCE as I_{pa} foram aumentadas por um fator de 2,4 e 3,2 para o PAR e CIP, respectivamente. Além disso, houve um deslocamento do potencial de pico de oxidação para potenciais menos positivos, causado principalmente pela modificação da superfície do GCE.

3.3.6 Efeito do pH e do tipo de eletrólito

Os estudos do efeito do pH do eletrólito suporte sobre a oxidação do PAR e CIP utilizando o NiONPs-FG-CTS:EPH/GCE foram realizados em soluções de tampão fosfato $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ com pH variando de 2,0 a 8,0, respectivamente. Como pode ser observado pelos voltamogramas de SW mostrados na FIGURA 3.12, as reações de oxidação do PAR e CIP foram dependentes da concentração hidrogeniônica do eletrólito suporte. A solução de tampão fosfato com pH 6,0 foi selecionada para o restante dos estudos devido ao fato de os sinais analíticos obtidos para ambos os analitos PAR e CIP terem apresentado alta magnitude de corrente de pico e boa estabilidade sob esta condição de pH.

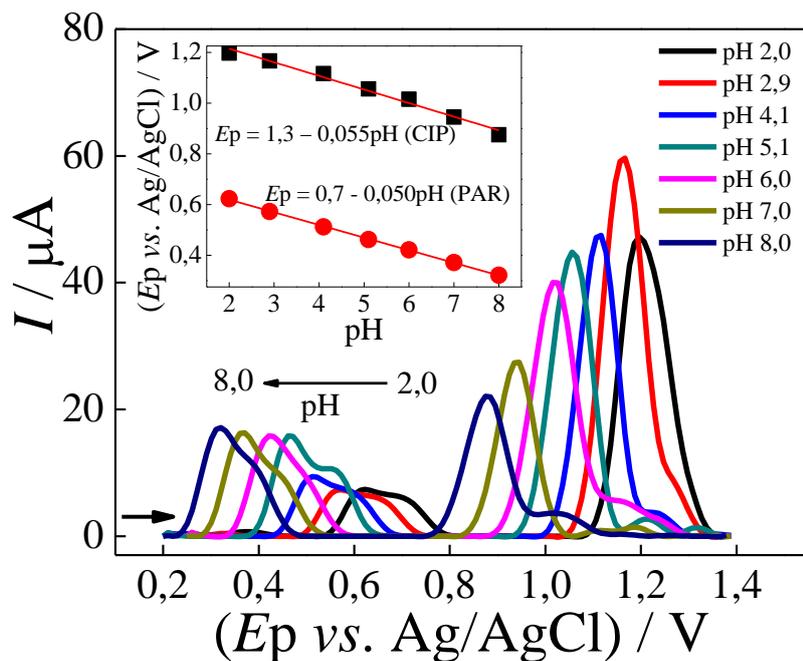


FIGURA 3.12 – Voltamogramas de SW registrados para $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ de PAR e CIP em tampão fosfato $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ com pH variando de 2,0 a 8,0 empregando o sensor NiONPs-FG-CTS:EPH/GCE. Parâmetros: $f = 70 \text{ Hz}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 4 \text{ mV s}^{-1}$. Inserido: gráfico de E_p vs. pH.

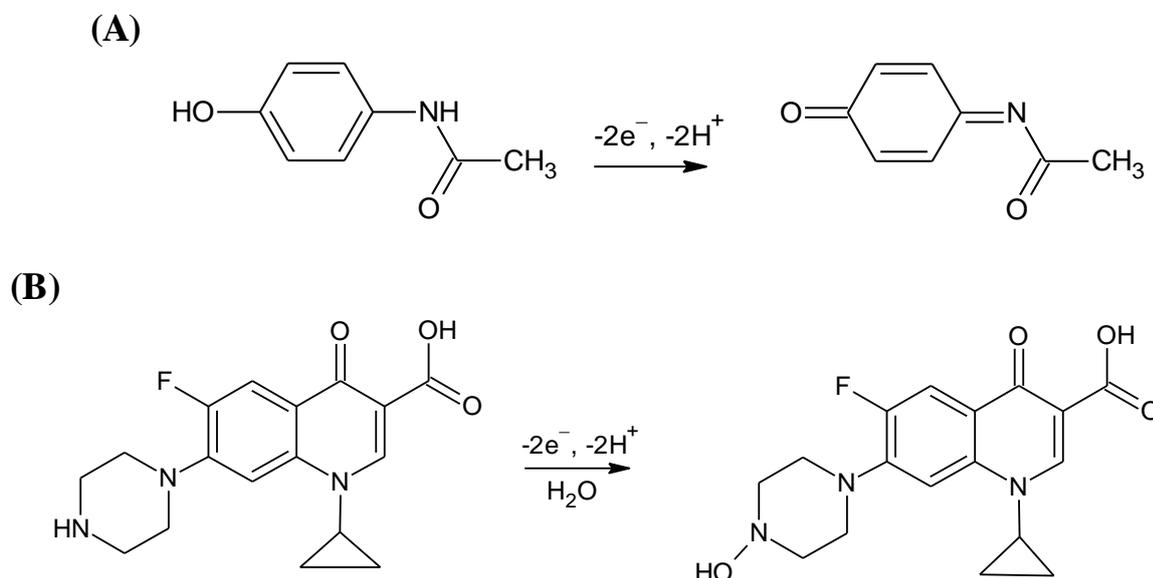
O gráfico inserido na FIGURA 3.12 representa a relação entre o potencial de pico (E_p) e o pH (gráficos de E_p vs. pH) para o PAR e CIP, respectivamente. Pode-se notar que, para ambos os analitos, uma relação linear entre E_p e pH foi obtida, de acordo com as seguintes equações de regressão linear, Eq. 3.4 e 3.5:

$$\text{PAR: } E_p = 0,72 - 0,055 \text{ pH}, r = 0,999 \quad \text{Eq. 3.4}$$

$$\text{CIP: } E_p = 1,3 - 0,050 \text{ pH}, r = 0,994 \quad \text{Eq. 3.5}$$

Assim, o aumento do pH conduziu a um deslocamento de E_p para valores menos positivos, indicando o envolvimento de prótons na eletrooxidação do PAR e da CIP. O coeficiente angular verificado para a curva de E_p vs. pH foi igual a $-0,055 \text{ V pH}^{-1}$ para PAR e $-0,050 \text{ V pH}^{-1}$ para CIP, ou seja, próximo ao coeficiente angular Nernstiano teórico ($-0,0592 \text{ V pH}^{-1}$) típico para um processo

redox envolvendo igual número de prótons e elétrons¹⁴⁵. As possíveis reações de eletrooxidação para as moléculas estão representados no Esquema 3.2, conforme descrito na literatura¹⁴⁶⁻¹⁴⁹.



ESQUEMA 3.2 - Possíveis reações de eletrooxidação para as moléculas de PAR (A) e CIP (B).

Em seguida, o efeito de outro eletrólito suporte (pH 6,0), tampão Britton Robinson (BR), também foi testado. Sendo assim, a solução que proporcionou a maior magnitude de corrente de pico foi utilizando o tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$. Portanto, esse tampão foi selecionado para os demais estudos.

3.3.7 Efeito da velocidade de varredura de potenciais

O efeito da velocidade de varredura de potenciais sobre a resposta voltamétrica de PAR e CIP foi estudado empregando-se CV variando a velocidade de varredura de potencial de 10 a 400 mV s^{-1} . Os voltamogramas obtidos estão apresentados na FIGURA 3.13A e B. Em todos os casos, com o aumento da velocidade de varredura de potencial foi verificado um aumento linear na magnitude de corrente de pico para o PAR e CIP.

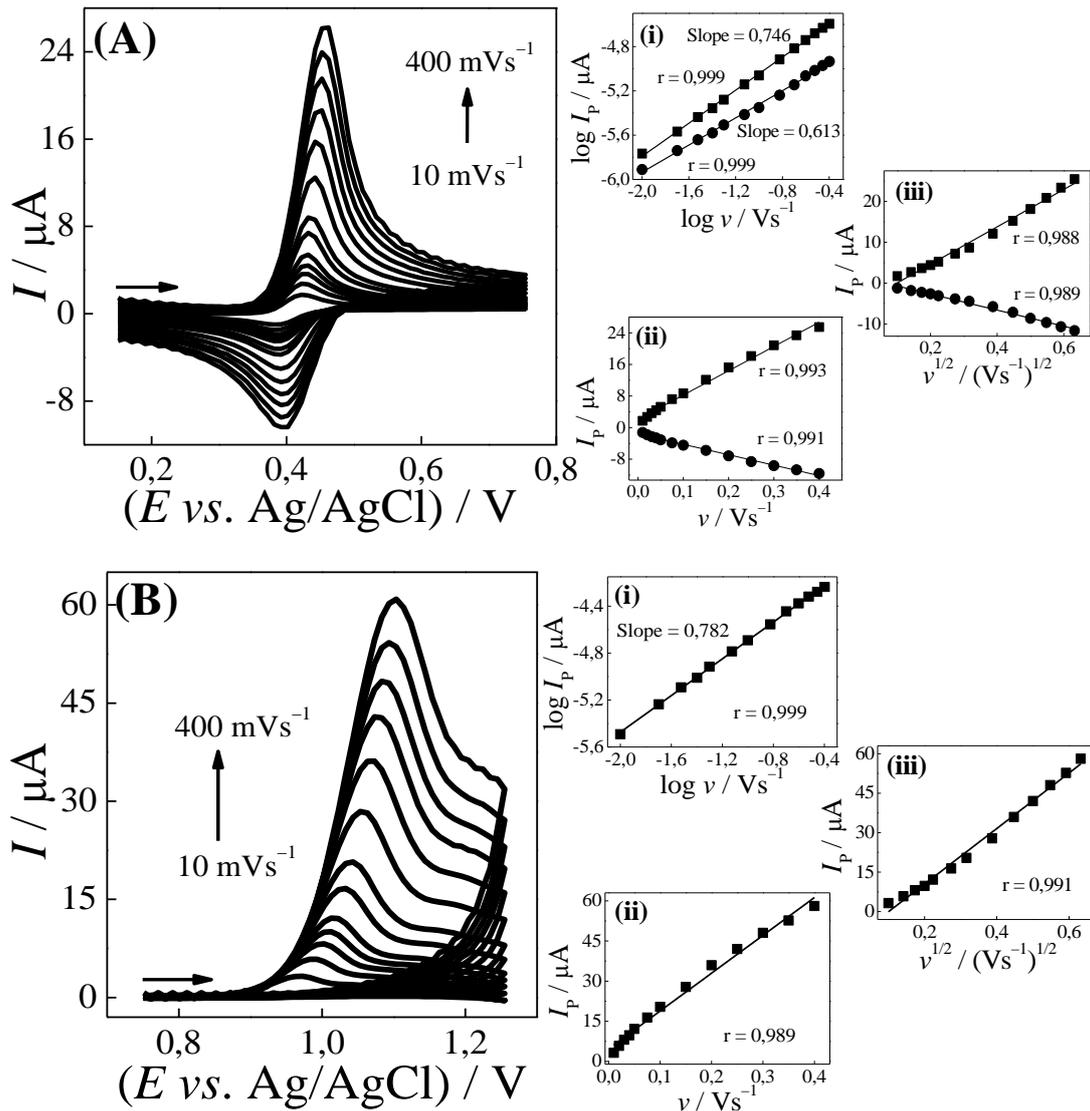


FIGURA 3.13 – Voltamogramas cíclicos obtidos para diferentes velocidades de varredura (10 - 400 mV s^{-1}) usando o sensor NiONPs-FG-CTS:EPH/GCE, para (A) 0,10 mmol L^{-1} PAR e (B) 0,050 mmol L^{-1} CIP em tampão fosfato 0,20 mol L^{-1} (pH 6,0). Gráficos de (i) $\log I_p$ vs. $\log v$; (ii) I_p vs. v e (iii) I_p vs. $v^{1/2}$.

A partir disso, os gráficos do logaritmo decimal da corrente de pico ($\log I_p$) vs. o logaritmo decimal da velocidade de varredura de potencial ($\log v$) foram construídos. Relações lineares entre $\log I_p$ e $\log v$ foram verificadas em todos os casos, como pode ser observado pelos gráficos (i) das FIGURAS 3.13A e B, apresentando os seguintes valores de coeficiente angular: 0,75 e 0,61 para o PAR e 0,78 para a CIP. Estes valores encontram-se entre os valores teóricos de

0,5, típico para processos redox controlado apenas por transporte difusional de massa, e 1,0, tipicamente relatado para processos redox governado por adsorção. Assim, para determinar qual desses processos dominou a transferência de elétrons dos respectivos analitos em estudo, construiu-se os gráficos de corrente de pico *versus* a velocidade de varredura de potencial (I_p vs. v) e o de corrente de pico *versus* a raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial (I_p vs. $v^{1/2}$), como podem ser vistos nos gráficos (ii) e (iii) das FIGURAS 3.13A e B. Desta forma, os gráficos I_p vs. v e I_p vs. $v^{1/2}$ para PAR e CIP apresentaram coeficientes de correlação próximos de 1,0, indicando assim que em ambos os casos, o processo redox foi regido tanto por difusão quanto por adsorção.

3.3.8 Otimização dos parâmetros da SWAdASV

A técnica de SWV foi selecionada, pois apresentou as melhores definições de pico e magnitude do sinal analítico quando comparada a CV e DPV. Ademais, o emprego desta técnica eletroanalítica proporcionou maior detectabilidade dos analitos estudados. Os parâmetros experimentais que afetam a resposta eletroquímica da SWV foram avaliados para PAR e CIP 0,10 mmol L⁻¹ em solução tampão fosfato 0,20 mol L⁻¹ (pH 6,0). Os valores ótimos obtidos para esses parâmetros (frequência (f), amplitude (a) e incremento de varredura (ΔE_s)) encontram-se na TABELA 3.1. No entanto, tendo em vista o estudo anterior, e o fato de que em ambos os casos os processos foram regidos tanto pelo transporte difusional de massa quanto por adsorção, realizou-se o estudo da dependência da corrente de pico para a técnica de voltametria de redissolução anódica adsortiva por onda quadrada (SWAdASV, do inglês “*Square-Wave Adsorptive Anodic Stripping Voltammetry*”) avaliando-se o potencial de pré-concentração de 0 a 1,0 V e o efeito do tempo de pré-concentração do analito sobre a superfície do eletrodo de trabalho no intervalo de tempo de 10 a 80 s (ver TABELA 3.1). Assim, ao aplicar o potencial de pré-concentração houve um aumento na magnitude da corrente de pico anódica para o PAR em potencial de 0,3 a 0 V e, para a CIP,

houve um aumento na magnitude de sinal aplicando o potencial de 0 a 0,9 V. Sendo assim, o potencial de pré-concentração (E_{pc}) selecionado foi de 0 V. Em seguida, com o estudo do tempo de pré-concentração (t_{pc}) do analito, observou-se um aumento constante na magnitude de corrente de pico em um intervalo de tempo de 10 a 45 s e, manteve-se praticamente constante (pouca variação) em tempos maiores. Sendo assim, o tempo de acumulação selecionado de 45 s.

TABELA 3.1 – Parâmetros experimentais da técnica de SWAdASV otimizados para a determinação simultânea de PAR e CIP

Parâmetros	Faixa estudada	Valor selecionado
Frequência, f (Hz)	10 – 100	30
Amplitude, a (mV)	10 – 100	80
Incremento de varredura, ΔE_s (mV)	1 – 10	4
Tempo de pré-concentração, t_{pc} (s)	10 – 80	45
Potencial de pré-concentração, E_{pc} (V)	0 – 1,0	0

3.3.9 Determinação simultânea de PAR e CIP por SWAdASV

Para investigar a possibilidade da determinação simultânea do PAR e da CIP, estudou-se inicialmente o comportamento eletroquímico dos dois fármacos, um na presença do outro. Assim, inicialmente foi fixada a concentração de um dos analitos e variou-se a concentração do outro, para verificar se havia possíveis interferências na determinação de um analito sobre o outro e vice-versa. Desta forma, primeiramente a concentração da CIP foi mantida constante em $0,60 \mu\text{mol L}^{-1}$ e a concentração do PAR foi variada de $0,10$ a $2,9 \mu\text{mol L}^{-1}$. Como pode ser observado a partir dos voltamogramas de SWAdAS obtidos (FIGURA 3.14A), o valor da I_{pa} para PAR aumentou regularmente com a sua concentração, enquanto o valor da I_{pa} para CIP permaneceu relativamente constante com um desvio padrão relativo (RSD) igual a 5,9%. Similarmente, quando a concentração de PAR foi fixada em $9,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e a concentração da

CIP foi variada na faixa de 0,040 a 0,97 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (FIGURA 3.14B), o valor da I_{pa} para CIP aumentou regularmente com a sua concentração, enquanto o valor da I_{pa} para o PAR permaneceu praticamente constante (RSD = 1,7%). A partir desses resultados, pode-se concluir que o PAR e a CIP podem ser determinados simultaneamente por SWAdASV sem interferência mútua nas análises de um na presença do outro.

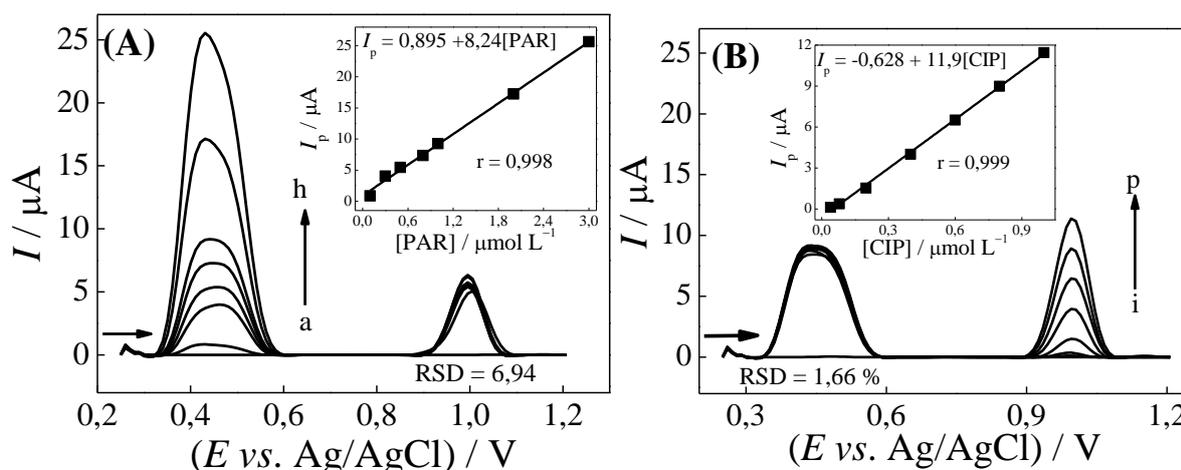


FIGURA 3.14 – Voltamogramas SWAdAS obtidos utilizando um sensor NiONPs-FG-CTS:EPH/GCE para várias concentrações de: **(A)** PAR (a – h: 0; 0,10; 0,30; 0,50; 0,79; 9,9; 2,0 e 2,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$) a uma concentração fixa de CIP (0,60 $\mu\text{mol L}^{-1}$); **(B)** CIP (i – p: 0; 0,040; 0,079; 0,20; 0,39; 0,58; 0,78 e 0,97 $\mu\text{mol L}^{-1}$) a uma concentração fixa de PAR (0,90 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Eletrólito suporte: solução tampão fosfato 0,20 mol L^{-1} (pH: 6,0). Condições de SWAdASV: $E_{pc} = 0$, $t_{pc} = 45$ s, $a = 30$ mV, $f = 80$ Hz, e $\Delta E_s = 4$ mV. Inseridos: curvas analíticas correspondentes.

Sendo assim, foi realizada a determinação simultânea de PAR e CIP utilizando o sensor NiONPs-FG-CTS:EPH/GCE por SWAdASV. Na FIGURA 3.15A estão representados os voltamogramas obtidos para as diferentes concentrações de PAR e CIP. Assim, as curvas analíticas (FIGURA 3.15B-C) obtidas foram lineares para as concentrações de 0,10 a 2,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o PAR

e de 0,040 a 0,97 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para CIP, de acordo com as seguintes equações de regressão linear, Equações 3.6-3.7:

$$\text{PAR: } I_p (\mu\text{A}) = 0,0237 + 8,88[\text{PAR}] (\mu\text{mol L}^{-1}), r = 0,995 \quad \text{Eq. 3.6}$$

$$\text{CIP: } I_p (\mu\text{A}) = -0,233 + 9,87[\text{CIP}] (\mu\text{mol L}^{-1}), r = 0,998 \quad \text{Eq. 3.7}$$

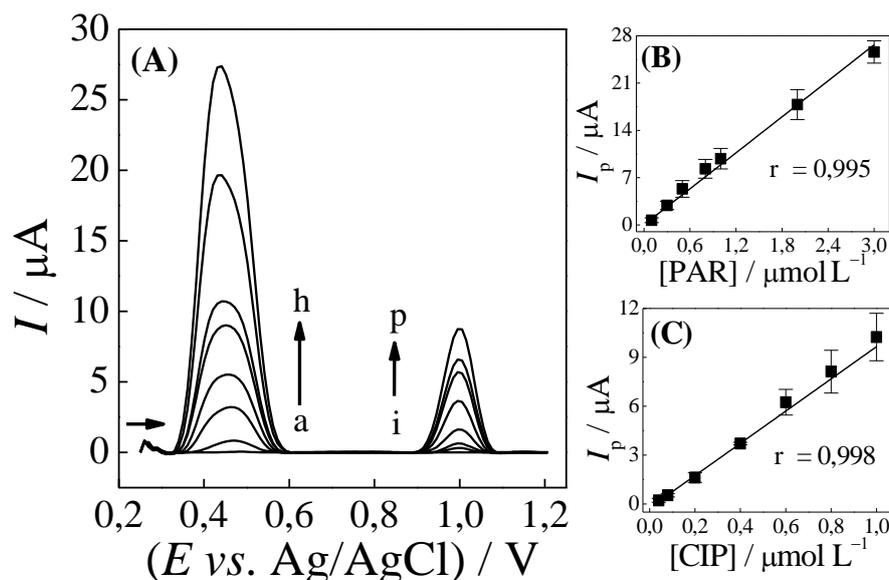


FIGURA 3.15 – (A) Voltamogramas de SWAdAS obtidos utilizando um sensor NiONPs-FG-CTS:EPH/GCE para várias concentrações de PAR (a – h: 0; 0,10; 0,30; 0,50; 0,79; 9,9; 2,0 e 2,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e CIP (i – p: 0; 0,040; 0,079; 0,20; 0,39; 0,58; 0,78 e 0,97 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Eletrólito suporte: solução de tampão fosfato 0,20 mol L^{-1} (pH: 6,0). Condições de SWAdASV: $E_{pc} = 0$, $t_{pc} = 45$ s, $a = 30$ mV, $f = 80$ Hz, e $\Delta E_s = 4$ mV. (B) e (C) curvas analíticas correspondentes.

Por fim, os LODs foram calculados de acordo com a Equação 3.8:

$$LOD = 3\sigma/s \quad \text{Eq. 3.8}$$

sendo σ o desvio-padrão de dez medidas do branco (somente eletrólito suporte) e s o coeficiente angular da curva analítica. Os valores obtidos de LODs foram iguais a 6,7 nmol L^{-1} para o PAR e 6,0 nmol L^{-1} para a CIP. Consultando a

literatura foi encontrado apenas um artigo descrevendo um procedimento voltamétrico dedicado à determinação simultânea de PAR e CIP. Na Tabela 3.2 é apresentada uma comparação do desempenho analítico obtido empregando o método proposto utilizando o sensor NiONPs-FG-CTS:EPH/GCE com o procedimento desenvolvido por Kingsley *et al.*¹⁴⁷ usando um eletrodo de pasta de carbono modificado com nanopartículas de ferrita de cobre-zinco (CZF-CME). Analisando-se a Tabela 3.2, pode-se observar que o sensor aqui proposto apresentou ótimo desempenho analítico para a determinação simultânea desses analitos, com faixas lineares em níveis de concentração mais baixos e limite de detecção similar ou melhor que os reportados anteriormente. Além disso, o potencial de pico de oxidação do PAR e da CIP relatado neste trabalho é cerca de 100 mV menos positivo do que o relatado por esses autores.

TABELA 3.2 – Comparação dos parâmetros analíticos obtidos para a determinação simultânea de PAR e CIP

Analito	Método	Faixa Linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LOD (nmol L^{-1})	r	Referência
PAR	AdSDPV	0,185 – 476	88,5	0,989	147
CIP		0,909 – 470	2,58	0,982	
PAR	SWAdASV	0,10 – 2,9	6,7	0,995	Este trabalho
CIP		0,040 – 0,97	6,0	0,998	

3.3.10 Estudos de repetibilidade e seletividade

A precisão do NiONPs-FG-CTS:EPH/GCE proposto foi avaliada por estudos de repetibilidade intra- e inter-dias. As análises intra-dia foram executadas durante cinco medidas sucessivas no mesmo dia ($n = 5$) utilizando o mesmo eletrodo e, as medidas inter-dia foram realizadas durante três dias consecutivos ($n = 3$) empregando três diferentes eletrodos. Para estes estudos, foram avaliadas

três diferentes concentrações de PAR, a saber: 0,30, 0,80 e 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e de CIP 0,080, 0,40 e 0,80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em solução de tampão fosfato 0,20 mol L^{-1} (pH 6,0). Como pode ser observado na TABELA 3.3, nas análises intra- e inter-dia os resultados obtidos apresentaram RSDs variando de 1,5 a 5,1% para PAR e CIP, respectivamente. Estes resultados indicam que o método analítico proposto possui boa precisão quando empregando-se o sensor NiONPs-FG-CTS:EPH/GCE para a determinação simultânea de PAR e CIP.

TABELA 3.3 – Estudo da repetibilidade intra- e inter-dia da determinação voltamétrica simultânea de PAR e CIP em diferentes concentrações

Analito	Concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	RSD (%)	
		Intra-dia ^a	Inter-dia ^b
PAR	0,30	1,8	1,5
	0,80	2,2	1,8
	2,0	2,7	3,8
CIP	0,080	2,6	2,1
	0,40	3,0	3,2
	0,80	3,9	5,1

^a($n = 5$); ^b($n = 3$).

Além disso, a fim de avaliar a seletividade do sensor proposto estudou-se também a possível interferência de alguns compostos tipicamente encontrados em fluidos biológicos como ácido ascórbico, albumina, cafeína, glicose e ureia. Para avaliar o efeito desses possíveis interferentes na resposta voltamétrica foram realizadas medidas utilizando soluções contendo PAR e CIP na concentração de 0,80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ na ausência e na presença desses compostos a uma proporção em massa de 1:10 (analito/possíveis interferentes) (TABELA 3.4). Os Erros (%) obtidos para as I_p registradas na presença desses compostos foram de -1,9% a +3,8%. Este estudo permitiu concluir que o método proposto é seletivo

para a determinação simultânea de PAR e CIP na presença destes possíveis interferentes até a proporção analisada.

TABELA 3.4 – Efeito de possíveis interferentes na determinação voltamétrica simultânea de PAR $0,80 \mu\text{mol L}^{-1}$ e CIP $0,80 \mu\text{mol L}^{-1}$ na razão de 1:10 m/m (analito/possíveis interferentes).

Possíveis interferentes	Erro (%)	
	PAR	CIP
Albumina	2,2	1,1
Cafeína	0,9	1,5
Ácido Ascórbico	3,8	-1,1
Glicose	-3,8	-0,7
Ureia	-2,2	-1,9

^aErro (%) = $[(\text{Sinal analito}_{\text{presença}} - \text{Sinal analito}_{\text{ausência}}) / \text{Sinal analito}_{\text{ausência}}] \times 100\%$.

3.3.11 Determinação simultânea de PAR e CIP em amostras biológicas

Finalmente, o desempenho do método desenvolvido foi avaliado pela determinação simultânea de PAR ($0,40 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) e CIP ($0,090 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,60 \mu\text{mol L}^{-1}$) em amostras de urina sintética e soro fetal de bovino fortificados (ver TABELA 3.5). A partir desses resultados, com recuperações entre 93 e 108%, pode-se concluir que não houve interferência significativa das matrizes empregando o método proposto. Além disso, as amostras também foram analisadas por um método comparativo (espectrofotométrico) e o Erro (%) entre esses dois métodos variou de -1,7% a +11%, como pode ser visto na TABELA 3.5.

TABELA 3.5 – Determinação simultânea de PAR e CIP em amostras de fluidos biológicos utilizando SWAdASV e um NiONPs-FG-CTS:EPH/GCE

	Amostra	Adicionado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Comparativo^a ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Proposto^a ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Rec.^b (%)	Erro^c (%)
PAR	Urina A	0,40	$0,38 \pm 0,02$	$0,39 \pm 0,02$	98	2,6
	Urina B	1,00	$0,99 \pm 0,01$	$1,08 \pm 0,03$	108	9,0
	Soro A	0,40	$0,40 \pm 0,02$	$0,41 \pm 0,07$	102	2,5
	Soro B	1,00	$0,98 \pm 0,01$	$1,05 \pm 0,07$	106	7,1
CIP	Urina A	0,090	$0,087 \pm 0,005$	$0,097 \pm 0,006$	108	11
	Urina B	0,60	$0,57 \pm 0,01$	$0,56 \pm 0,09$	93	-1,7
	Soro A	0,090	$0,086 \pm 0,005$	$0,089 \pm 0,005$	99	3,4
	Soro B	0,60	$0,58 \pm 0,02$	$0,61 \pm 0,05$	102	5,1

^a $n = 3$; Rec. = Recuperado;

^b Porcentagem de recuperação = $[\text{Proposto}] / [\text{Adicionado}] \times 100$;

^c Erro (%) = $([\text{Proposto}] - [\text{Comparativo}]) / [\text{Comparativo}] \times 100$.

Os resultados obtidos empregando-se os dois métodos (voltamétrico e espectrofotométrico) também foram comparados pela aplicação do teste t de Student pareado (a um nível de confiança de 95%). Os valores calculados do $t_{\text{experimental}}$ (2,2 para PAR e 0,99 para CIP) foram menores do que o valor $t_{\text{crítico}}$ (3,2), demonstrando assim que não houve diferença estatística entre os resultados obtidos usando os dois métodos analíticos, o que sugere a potencialidade do procedimento proposto para a determinação simultânea de PAR e CIP em amostras biológicas reais.

3.4 Conclusões

Um novo método eletroquímico, envolvendo um sensor NiONPs-FG-CTS:EPH/GCE combinado com a SWAdASV, foi proposto para a determinação simultânea de PAR e CIP. Foi alcançada uma boa separação entre os potenciais de pico anódico dos analitos, o que permitiu a determinação de

ambos analitos em amplas faixas lineares e com baixos limites de detecção. Além disso, as análises de fluidos biológicos foram realizadas com sucesso empregando-se o método de adição e recuperação. Fica assim evidente que o método proposto com a modificação realizada na superfície do GCE utilizando NiONPs-FG-CTS:EPH resultou em uma excelente opção para a determinação de PAR e CIP simultaneamente. Além de ser simples, o procedimento proposto é rápido, barato e altamente sensível para a determinação simultânea desses fármacos.

CAPÍTULO 4

Determinação simultânea de salbutamol e propranolol em amostras de fluidos biológicos utilizando um sensor eletroquímico à base de grafeno funcionalizado, líquido iônico e nanopartículas de prata

4.1 Objetivos específicos

Tendo como base os resultados obtidos no trabalho anterior empregando o eletrodo de carbono vítreo modificado com grafeno funcionalizado, nesse trabalho, objetivou-se simplificar o preparo do eletrodo em uma única etapa e, conseqüentemente, ampliar a aplicação com a incorporação de outros materiais, a saber: líquido iônico e nanopartículas de prata suportados em um filme de Nafion[®]. Este novo arranjo de sensor foi projetado com o objetivo de buscar melhores condições analíticas para a determinação voltamétrica simultânea de salbutamol e propranolol em amostras de fluidos biológicos.

Os resultados apresentados neste capítulo encontram-se reportados na literatura no nosso artigo: Santos, A. M.; Wong, A.; Fatibello-Filho, O. “Simultaneous determination of salbutamol and propranolol in biological fluid samples using an electrochemical sensor based on functionalized graphene, ionic liquid and silver nanoparticles”, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 824 (2018) 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2018.07.018>. Reproduzido com autorização da *Elsevier*.

4.2 Experimental

4.2.1 Reagentes e soluções

SAL, PRO, soro fetal bovino, NF e padrões de tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio (IL) foram adquiridos da Sigma-Aldrich; NaOH, KCl e os reagentes para a preparação do tampão fosfato (H_3PO_4 , KH_2PO_4 , K_2HPO_4 e K_3PO_4) foram adquiridos da Acros. O GRA foi adquirido do Graphene Supermarket (Nova Iorque, EUA). Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico, e as soluções foram preparadas em água ultrapura obtida em um sistema Milli-Q (Millipore[®], Bedford, MA) com resistividade superior a 18,2 M Ω cm. As soluções-estoque de SAL e PRO (0,10 mol L⁻¹) foram preparadas diariamente em água ultrapura.

4.2.2 Instrumentação e funcionalização do grafeno

Consultar as seções “3.2.2 Instrumentação” e “3.2.3 Funcionalização do grafeno”.

4.2.3 Síntese das nanopartículas de prata

A síntese das nanopartículas de prata (AgNPs) foi realizada como previamente relatado por Baccarin *et al.*¹⁵⁰. Inicialmente, soluções de AgNO_3 $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ e NaBH_4 $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ foram preparadas. Em seguida, $1,0 \text{ mL}$ da solução de NaBH_4 e 49 mL da solução de AgNO_3 foram transferidos individualmente para dois frascos e deixados em banho de gelo por 30 min . Finalmente, a solução de NaBH_4 foi adicionada gota a gota na solução de AgNO_3 (sob agitação), formando assim uma suspensão coloidal amarelada (indicando a formação das AgNPs), a qual foi agitada durante 30 min . e armazenada em um recipiente âmbar.

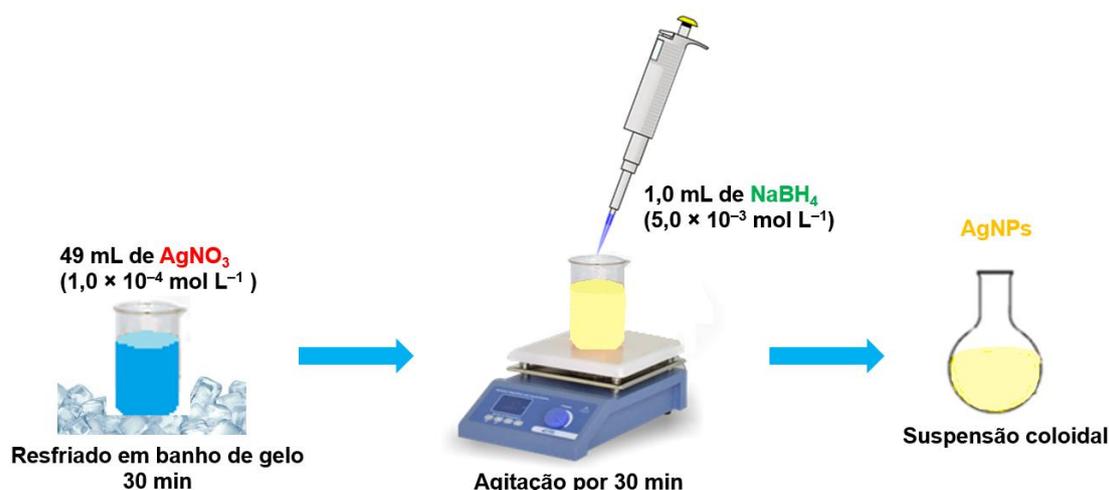


FIGURA 4.1 – Representação esquemática da síntese das AgNPs.

4.2.4 Preparação do sensor AgNPs-IL-FG-NF/GCE

A superfície do GCE foi inicialmente limpa com o auxílio de um pano de polimento e alumina ($0,05 \mu\text{m}$), seguida de limpeza em banho ultrassom com álcool etílico e água ultrapura por 2 min . Sob condições otimizadas, a

dispersão de AgNPs-IL-FG-NF foi preparada usando 1,0 mg de FG, 1,0 mg de IL, 10 μL de solução de NF a 0,25% (v/v), 250 μL de AgNPs e 740 μL de água ultrapura (FIGURA 4.2). Posteriormente, a mistura resultante foi submetida à agitação em banho ultrassônico por aproximadamente 30 min, a fim de se obter uma dispersão homogênea. Em seguida, uma alíquota de 8 μL da dispersão foi depositada sobre a superfície do GCE e seca à temperatura ambiente por 2 h, para obtenção do GCE modificado com o filme de NF contendo AgNPs, IL e FG (assim denominado filme AgNPs-IL-FG-NF).

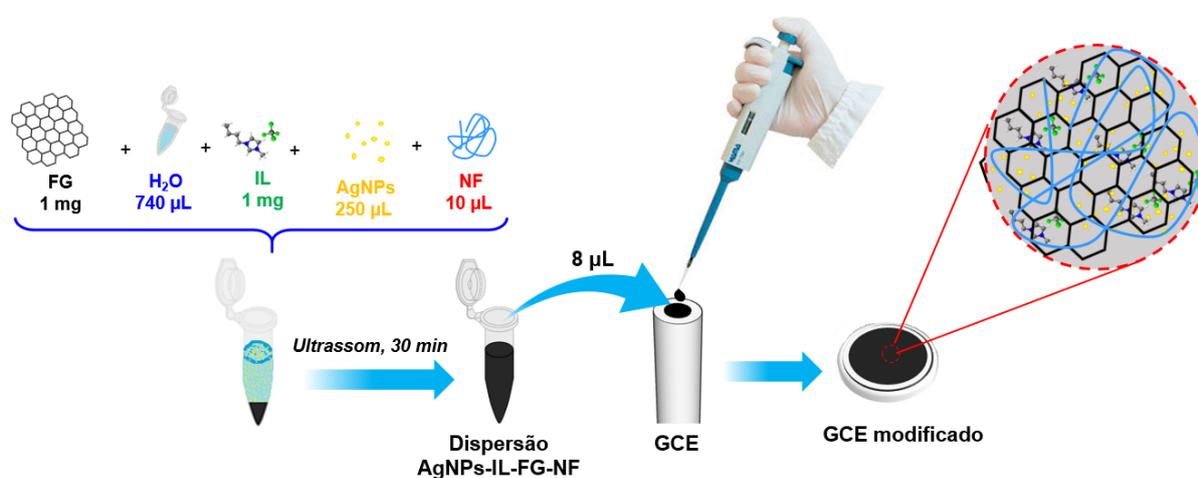


FIGURA 4.2 – Representação esquemática do procedimento de preparação do GCE modificado.

4.2.5 Procedimento analítico

Primeiramente, foram investigadas as proporções de FG, AgNPs e IL a serem utilizadas para obtenção do filme sobre a superfície do GCE. Após essa etapa, as caracterizações eletroquímicas dos eletrodos foram realizadas por CV e EIS. Com base nos resultados, o comportamento eletroquímico de SAL e PRO foram analisados por CV, seguido da otimização das condições experimentais, como eletrólito suporte (composição e pH), e os parâmetros para SWV (frequência (f), amplitude (a) e incremento de potencial (ΔE_s)). Em seguida, as curvas analíticas foram construídas usando adições sucessivas de soluções padrão de SAL e PRO. Todas as medidas foram realizadas em triplicata ($n = 3$). O LOD

foi calculado como três vezes o desvio padrão de dez medidas do branco ($n = 10$) dividido pelo coeficiente angular da curva analítica. A precisão usando o método proposto foi verificada a partir de estudos de repetibilidade intra-dia ($n = 5$) e inter-dia ($n = 3$). Por fim, o procedimento voltamétrico foi empregado na análise de amostras biológicas (urina e soro) fortificadas com concentrações conhecidas de cada analito.

4.3 Resultados e Discussão

Neste trabalho foi proposta a preparação de um eletrodo de GC modificado FG, IL e AgNPs immobilizados em uma matriz polimérica de NF. A escolha do FG como agente modificador foi baseada nas vantagens analíticas e eletroquímicas reportadas com o uso deste material na elaboração de sensores eletroquímicos, como aumento de sinal analítico e sensibilidade analítica. Por outro lado, a motivação para o uso do IL e das AgNPs foi a de melhorar o desempenho do sensor a partir da indução de possíveis efeitos eletrocatalíticos e/ou concentração do analito na superfície do eletrodo. Assim, objetivando-se obter um filme robusto e estável sobre a superfície do GCE, foi selecionado o NF como imobilizador para estes materiais, uma vez que o NF possui a habilidade de formar filmes homogêneos e bem aderentes sobre a superfície de materiais carbonáceos como o GCE.

4.3.1 Otimização do filme

Inicialmente, para a obtenção do filme na superfície do GCE, otimizou-se a quantidade dos modificadores, sendo eles: FG nas concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5 mg mL⁻¹, IL nas concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5 mg mL⁻¹ e as nanopartículas (AgNPs) nas razões volume de AgNPs/volume final da solução, a saber: 0,25: 0,75; 0,5: 0,5 e 0,75: 0,25 (mL mL⁻¹). Assim, as maiores magnitudes de corrente de pico para ambos os analitos, utilizando a SWV, foram obtidos empregando-se 1,0 mg de FG, 1,0 mg de IL, 250 µL de AgNPs, 10 µL de NF e

740 μL de água ultrapura. Cabe salientar que nesta composição também se mostrou ótima para a obtenção de um filme estável e com boa aderência.

4.3.2 Caracterização morfológica dos materiais

A caracterização morfológica das superfícies modificadas foi realizada por SEM. A FIGURA 4.3 mostra as imagens obtidas do (A) FG, (B) IL-FG e (C) AgNPs-IL-FG depositados sobre a superfície do GCE.

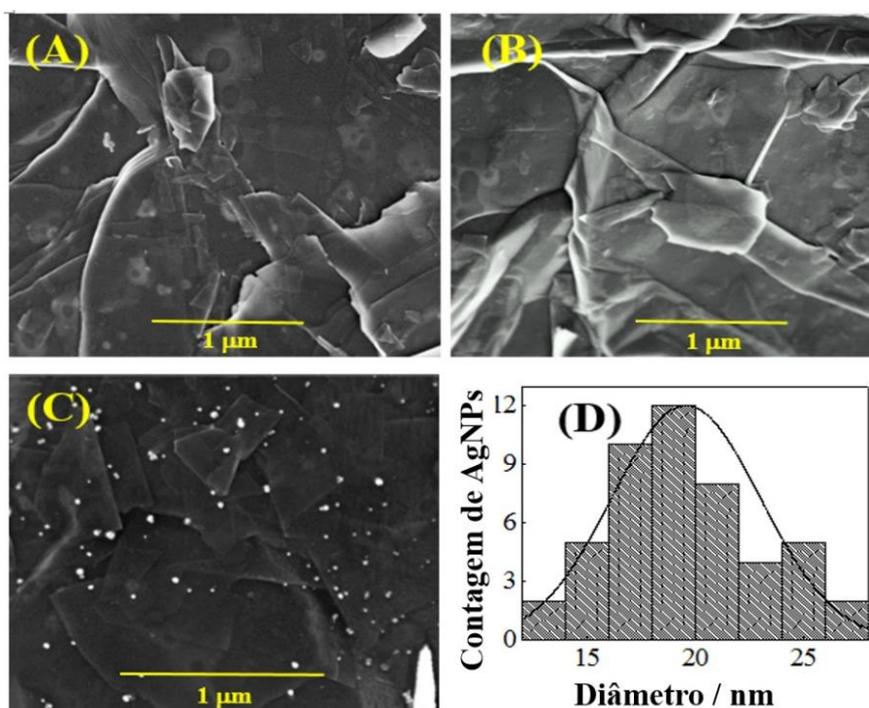


FIGURA 4.3 – SEM (A) FG, (B) FG-IL e (C) AgNPs-IL-FG e (D) Histograma correspondente ao diâmetro das AgNPs.

Na FIGURA 4.3A é possível observar que o FG consistiu em uma estrutura de folhas finas e enrugadas de diferentes tamanhos, o que é característico deste tipo de material^{57,79}. Também pode ser visto na FIGURA 4.3B, que a morfologia da superfície do FG apresentou pequena alteração após a incorporação do IL, no qual as folhas de FG foram dispostas mais próximas e homogêneas. Finalmente, a morfologia do IL-FG na presença das AgNPs é apresentada na FIGURA 4.3C, na qual é possível observar múltiplos pontos referentes às AgNPs

(esferas claras) altamente dispersos ao longo das folhas de FG com um diâmetro médio de 20 nm, como mostrado no histograma da FIGURA 4.3D.

Como pode ser observado na FIGURA 4.4, a espessura do filme composto por AgNP-IL-FG-NF foi estimado utilizando-se a microscopia confocal. Assim, ao analisar a imagem topográfica obtida dos materiais na superfície do GCE, foi possível estimar a espessura média do filme em 3,72 μm .

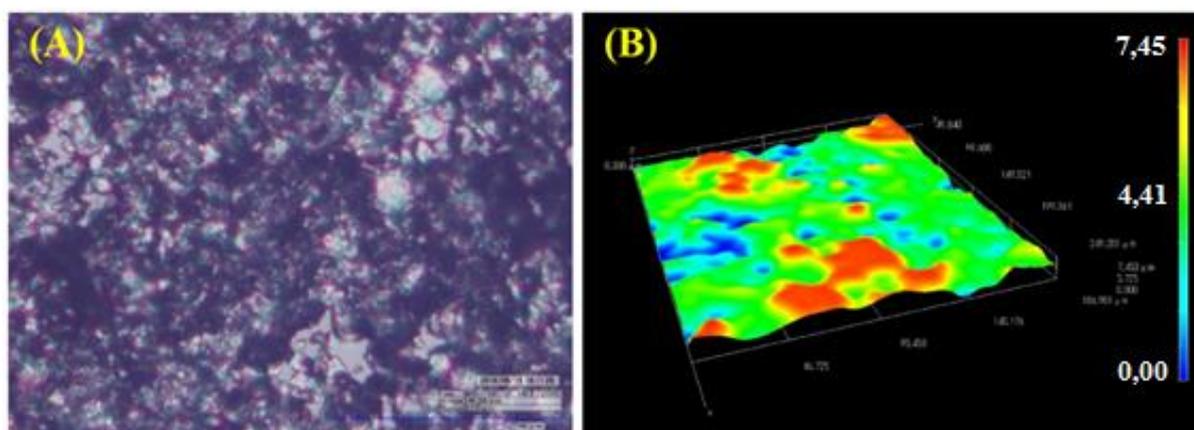


FIGURA 4.4 – Imagem da superfície ($187\mu\text{m} \times 249\mu\text{m}$) do GCE modificada com AgNPs-IL-FG-NF. (A) imagem planar (2D) e (B) imagem topográfica (3D).

4.3.3 Caracterização eletroquímica

Para análise das características eletroquímicas das diferentes modificações realizadas na superfície do eletrodo base, foram realizados estudos de CV utilizando como sonda redox o $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ preparado em KCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito suporte. Na FIGURA 4.5 são mostrados os perfis de CV obtido para o GCE sem modificação e, este mesmo eletrodo após cada modificação com um filme de NF contendo FG, IL-FG, AgNPs-FG e AgNPs-IL-FG, respectivamente. Como pode ser observado, a resposta eletroquímica da sonda redox sofreu alterações após cada etapa de modificação, indicando que a cinética de transferência de elétrons foi melhorada, como mostrado a partir da diminuição da separação de potencial entre os potenciais de pico anódico e catódico (ΔE_p). O valor da ΔE_p diminuiu ao longo de cada

modificação, ou seja, a inserção de FG, IL e AgNPs, indicando as excelentes características de transferência de elétrons dos diferentes eletrodos modificados. Além da cinética de transferência de elétrons melhorada, as correntes de pico anódica (I_{pa}) e catódica (I_{pc}) também aumentaram após cada modificação do GCE. Estes resultados sugerem que a área eletroativa foi aumentada a partir da modificação do GCE com FG, IL e AgNPs. Portanto, ensaios posteriores foram realizados para predição deste parâmetro eletroquímico.

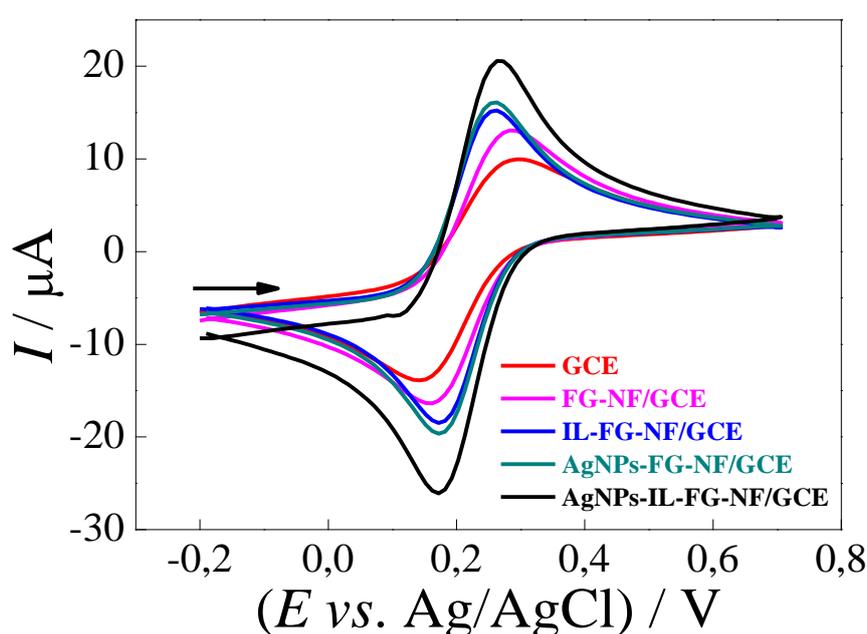


FIGURA 4.5 – Voltamogramas cíclicos obtidos para $[Fe(CN)_6]^{3-}$ $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução de KCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ empregando (--) GCE, (--) FG-NF/GCE, (--) IL-FG-NF/GCE, (--) AgNPs-FG-NF/GCE e (--) AgNPs-IL-FG-NF/GCE. $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Em seguida, para verificação da área eletroativa dos diferentes eletrodos modificados, um conjunto de medidas de CV foram realizadas em diferentes velocidades de varredura de potencial. Na FIGURA 4.6 (A-E) são fornecidos os voltamogramas cíclicos obtidos na faixa de velocidade de varredura de potencial de 10 a 400 mV s^{-1} para GCE sem modificação e o GCE modificado sucessivamente com FG-NF, IL-FG-NF, AgNPs-FG-NF ou AgNPs-IL-FG-NF.

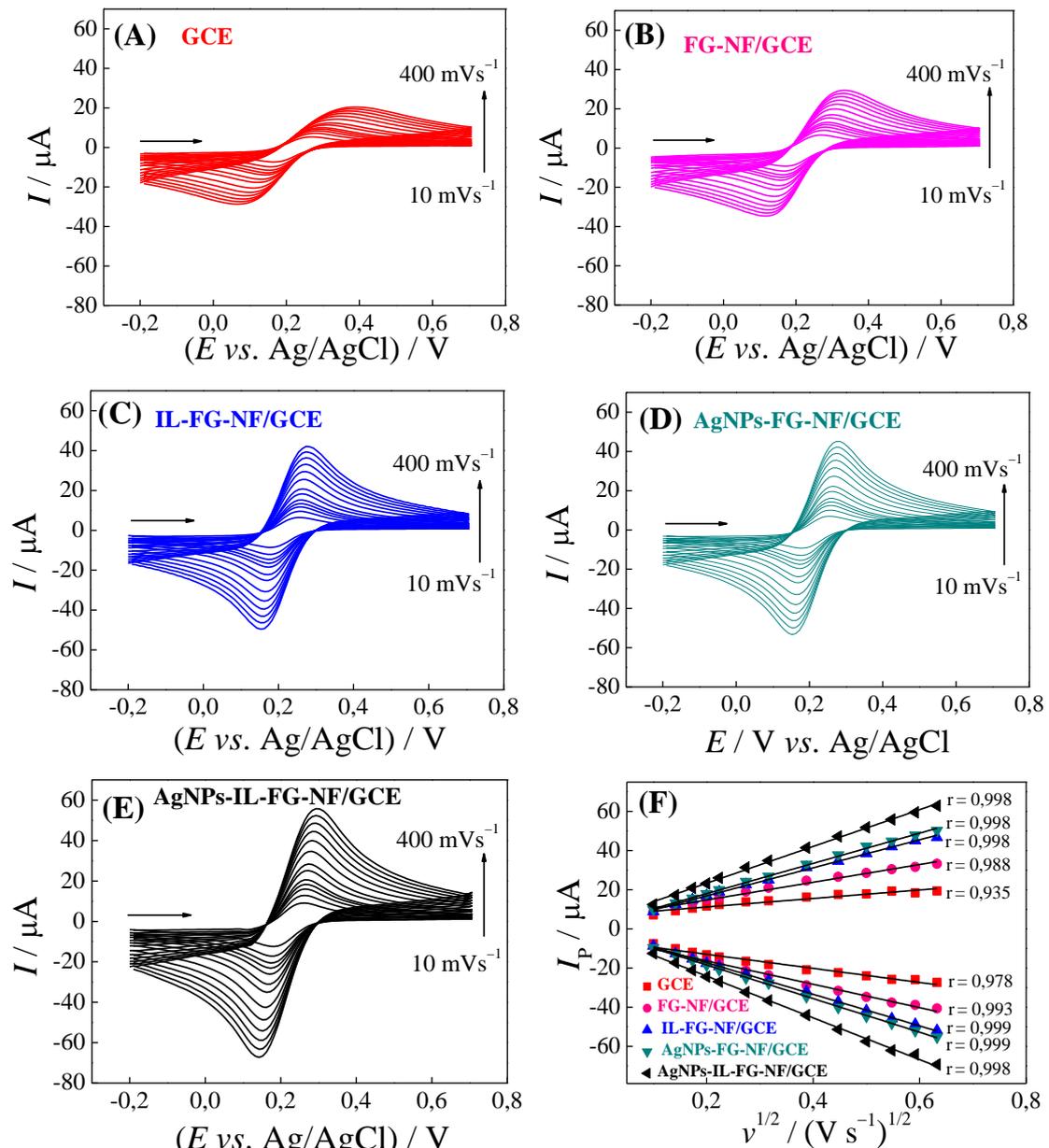


FIGURA 4.6 – Voltamogramas cíclicos obtidos para $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução de $\text{KCl } 0,10 \text{ mol L}^{-1}$ empregando (A) GCE, (B) FG-NF/GCE, (C) IL-FG-NF/GCE, (D) AgNPs-FG-NF/GCE e (E) AgNPs-IL-FG-NF/GCE para diferentes velocidades de varredura de potencial (10, 20, 30, 40, 50, 75, 100; 150; 200; 250; 300; 350 e 400 mV s^{-1}). (F) Gráficos de I_{pa} vs. $v^{1/2}$ e I_{pc} vs. $v^{1/2}$.

Em todos os casos, o incremento da velocidade de varredura de potencial promoveu um aumento das correntes de pico anódica e catódica. A dependência das correntes de pico em relação à velocidade de varredura de potencial foi explorada, e relações lineares foram obtidas entre I_p e $v^{1/2}$. Na

FIGURA 4.6 (F) são apresentados os gráficos de I_p vs. $v^{1/2}$, a partir dos quais se observa que excelentes coeficientes de correlação linear foram obtidos para os diferentes casos. Esta dependência linear de I_p vs. $v^{1/2}$ é prevista pela equação de Randles-Sevick^{144,151} para processos redox governados apenas pelo transporte de massa difusional (Eq. 3.2).

Portanto, a área eletroativa dos eletrodos em estudo pode ser diretamente determinada a partir dos coeficientes angulares dos gráficos de I_p vs. $v^{1/2}$. Na TABELA 4.1 são mostrados os coeficientes angulares obtidos para os gráficos de I_p vs. $v^{1/2}$, bem como os valores da área eletroativa estimada a partir das variações de corrente anódica e catódica.

TABELA 4.1 – Coeficientes angulares dos gráficos de I_p vs. $v^{1/2}$ obtidos do estudo de velocidade de varredura de potencial por CV e respectiva área eletroativa.

Eletrodo	Coef. angulares ($A V^{-1/2} s^{1/2}$)		Área eletroativa (cm^2)
	Corrente anódica	Corrente catódica	
GCE	$2,17 \times 10^{-5}$	$-2,29 \times 10^{-5}$	0,065
FG-NF/GCE	$4,53 \times 10^{-5}$	$-4,67 \times 10^{-5}$	0,14
IL-FG-NF/GCE	$7,16 \times 10^{-5}$	$-7,21 \times 10^{-5}$	0,21
AgNPs-FG-NF/GCE	$7,72 \times 10^{-5}$	$-7,91 \times 10^{-5}$	0,22
AgNPs-IL-FG-NF/GCE	$9,40 \times 10^{-5}$	$-9,47 \times 10^{-5}$	0,28

A partir desses resultados, foi possível concluir que a resposta eletroquímica utilizando a sonda $[Fe(CN)_6]^{3-}$ é significativamente afetada pela modificação da superfície do GCE. De fato, a combinação de AgNPs-IL-FG-NF/GCE ocasionou em um aumento da área eletroativa em 4,3 vezes maior que aquela do GCE sem modificação.

Ademais, a EIS também foi empregada na caracterização dos eletrodos. Para isso utilizou-se como sonda redox o par $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ 2,5 mmol L⁻¹ em KCl 0,1 mol L⁻¹ e faixa de frequência de 100 kHz à 0,1 Hz. O

potencial aplicado selecionado foi o potencial de meia-onda ($E_{1/2}$), determinado a partir da medida CV. Como pode ser observado na FIGURA 4.7, os diagramas de Nyquist apresentaram duas partes bem definidas, uma parte linear em frequências mais baixas e uma parte semicircular em frequências mais altas. O semicírculo corresponde à transferência limitada de elétrons, e seu diâmetro é igual à resistência de transferência de carga (R_{ct}). Com isso, quanto maior o tamanho do semicírculo, maior será a R_{ct} . Na FIGURA 4.7, é possível observar os diagramas obtidos para os diferentes eletrodos, a saber: GCE, FG-NF/GCE, IL-FG-NF/GCE, AgNPs-FG-NF/GCE e AgNPs-IL-FG-NF/GCE, em que os valores de R_{ct} obtidos foram de 1054, 668, 242, 222 e 95 Ω , respectivamente. Assim, analisando os resultados é possível observar um semicírculo maior para o GCE, o que implica em uma elevada R_{ct} . Com a modificação progressiva do eletrodo houve uma diminuição no tamanho do semicírculo (FG-NF/GCE < IL-FG-NF/GCE < AgNPs-FG-NF/GCE < AgNPs-IL-FG-NF/GCE), indicando assim um aumento na condutividade elétrica do eletrodo e uma redução da R_{ct} .

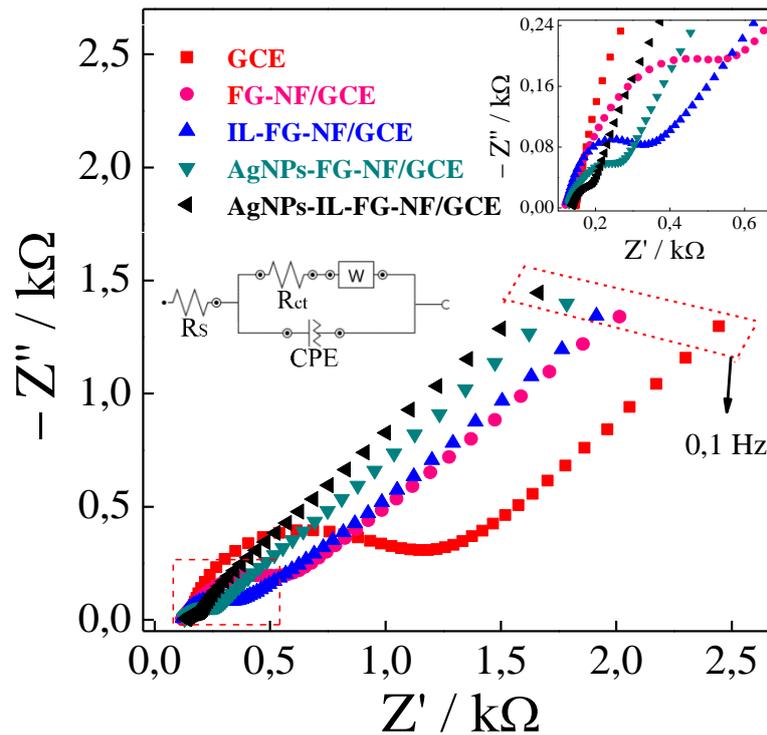


FIGURA 4.7 – Diagramas de EIS obtidos para uma solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ em $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ KCl. Intervalo de frequência de 100 KHz a 0,1 Hz. Inserido: Circuito equivalente de Randles.

Os valores de R_{ct} obtidos pela análise de EIS também foram empregados para calcular a constante heterogênea de transferência de elétrons (k^0) para cada modificação de acordo com a Eq. 3.3. Sendo assim, os valores obtidos de k^0 para o GCE, FG-NF/GCE, IL-FG-NF/GCE, AgNPs-FG-NF/GCE e AgNPs-IL-FG-NF/GCE foram $1,4 \times 10^{-3}$; $2,3 \times 10^{-3}$; $6,3 \times 10^{-3}$; $6,8 \times 10^{-3}$ e $1,6 \times 10^{-2} \text{ cm s}^{-1}$, respectivamente. Assim, com o sensor AgNPs-IL-FG-NF/GCE, o valor de k^0 foi maior que com o AgNPs-FG-NF/GCE > IL-FG-NF/GCE > FG-NF/GCE > CGE, indicando neste caso, uma transferência mais rápida de elétrons.

4.3.4 Estudo do comportamento eletroquímico de SAL e PRO

Neste estudo, a CV foi utilizada para avaliar o comportamento eletroquímico dos analitos SAL ($0,20 \text{ mmol L}^{-1}$) e PRO ($0,20 \text{ mmol L}^{-1}$), utilizando os diferentes eletrodos (GCE, FG-NF/GCE, IL-FG-NF/GCE, AgNPs-

FG-NF/GCE e AgNPs-IL-FG-NF/GCE) em uma faixa de potenciais de +0,40 a +1,25 V ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$) e usando como eletrólito suporte uma solução de tampão fosfato $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). Como pode ser observado na FIGURA 4.8, os voltamogramas cíclicos obtidos para ambos os fármacos mostraram picos de oxidação bem definidos nos potenciais de +0,65 e +1,0 V para SAL e PRO, respectivamente. Além disso, a ausência de picos de redução durante a varredura do potencial catódica, sugere que SAL e PRO sofreram reações de oxidação irreversíveis.

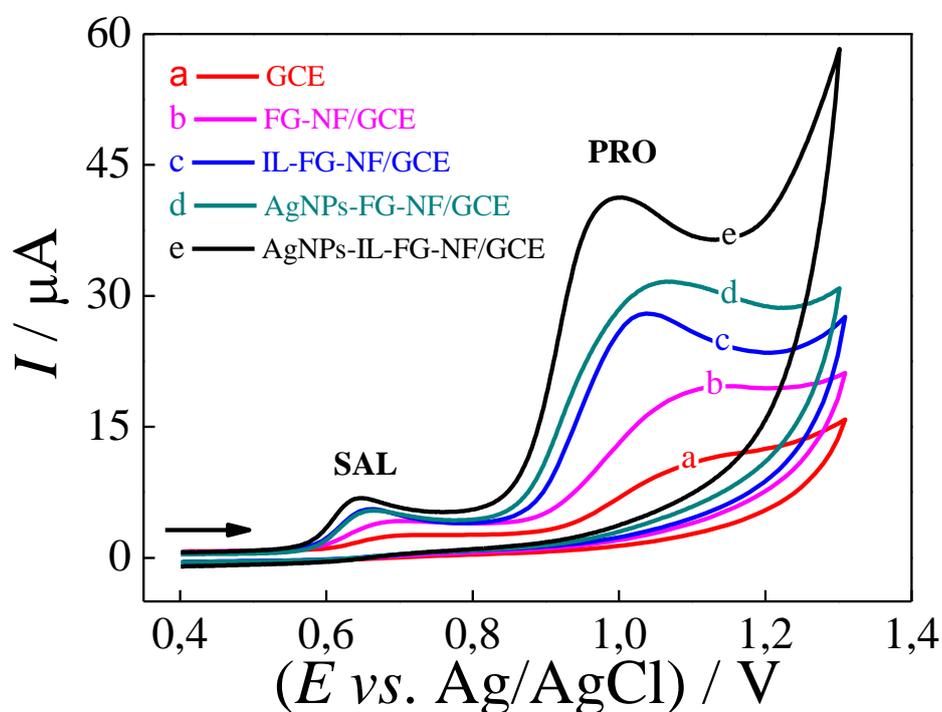


FIGURA 4.8 – Voltamogramas cíclicos obtidos para SAL e PRO $0,20 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução de tampão fosfato $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) a uma $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Como pode ser observado na FIGURA 4.8, a modificação final, AgNPs-IL-FG-NF/GCE, quando comparada com as demais modificações apresentou maior magnitude de corrente de pico anódica (I_{pa}) para ambos os fármacos, no qual a I_{pa} foi aumentada por um fator de até 2,5 e 4,0 vezes para SAL e PRO em comparação com o GCE não modificado. Além disso, houve um

deslocamento dos potenciais de pico para valores menos positivos, causados principalmente pelos agentes modificados da superfície do GCE.

4.3.5 Efeito do pH e otimização dos parâmetros analíticos

Como pode ser visto na FIGURA 4.9, a influência do efeito da concentração hidrogeniônica nas reações de oxidação de SAL e PRO (0,10 mmol L⁻¹) foram investigadas por SWV usando solução tampão fosfato 0,20 mol L⁻¹ com pH variando entre 5,0 a 9,0.

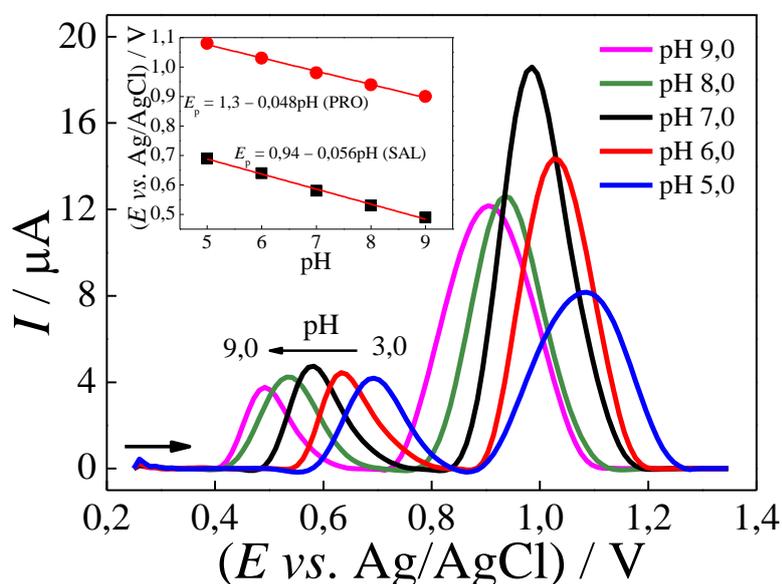


FIGURA 4.9 – SWV registrados para SAL e PRO (ambos na concentração de 3,0 μmol L⁻¹) em solução de tampão fosfato 0,20 mol L⁻¹ com uma variação de pH de 5,0 a 9,0 empregando o sensor AgNPs-IL-FG-NF/GCE. Parâmetros: $f = 30$ Hz, $a = 50$ mV e $\Delta E_s = 4$ mV s⁻¹. Inserido: gráficos de E_p vs. pH.

Desta forma, a maior magnitude de corrente de pico foi obtida utilizando o eletrólito suporte com pH 7,0. Sendo assim, este pH foi selecionado para o restante dos estudos. Por outro lado, o gráfico inserido na FIGURA 4.9 representa a dependência do potencial de pico (E_p) em função do pH para o SAL e PRO. O valor do E_p para a eletrooxidação de SAL e PRO variou linearmente em função do pH com coeficientes angulares de $-0,057$ V pH⁻¹ e de $-0,048$ V pH⁻¹,

duas técnicas, a SWV apresentou melhores condições analíticas como, menor largura e maior magnitude de corrente de pico. Sendo assim, a SWV foi a técnica eletroquímica selecionada para os demais estudos.

TABELA 4.2 – Parâmetros experimentais das técnicas SWV e DPV otimizados para a determinação simultânea de SAL e PRO

Técnica	Parâmetros	Faixa estudada	Valor selecionado
SWV	Frequência, f (Hz)	10 – 100	30
	Amplitude, a (mV)	10 – 100	50
	Incremento de potencial, ΔE_s (mV)	1 – 10	9
DPV	Amplitude de pulso, a (mV)	10 – 100	60
	Velocidade de varredura de potencial, ν (mV s ⁻¹)	5 – 20	15
	Tempo de modulação, t (ms)	10 – 100	40

4.3.6 Efeito da velocidade de varredura de potencial

O efeito da velocidade de varredura de potencial sobre o comportamento eletroquímico dos analitos alvo empregando-se o sensor AgNPs-IL-FG-NF/GCE foi investigado por CV, variando a velocidade de varredura de potenciais de 10 a 400 mV s⁻¹ na presença de SAL ou PRO 0,20 mmol L⁻¹ em tampão fosfato 0,20 mol L⁻¹ (pH 7,0). Como mostrado nas FIGURAS 4.10 (A) e (B), verificou-se que um aumento da velocidade de varredura leva a um aumento contínuo da corrente de pico para ambos os analitos. Analisando-se o efeito da velocidade de varredura de potencial sobre as correntes de pico, relações lineares excelentes entre ΔI_{pa} e $\nu^{1/2}$ foram observadas (gráfico (i) das FIGURAS 4.10 (A) e (B)), indicando assim que o transporte de massa por difusão controlou os processos eletródicos associados ao SAL e PRO, respectivamente.

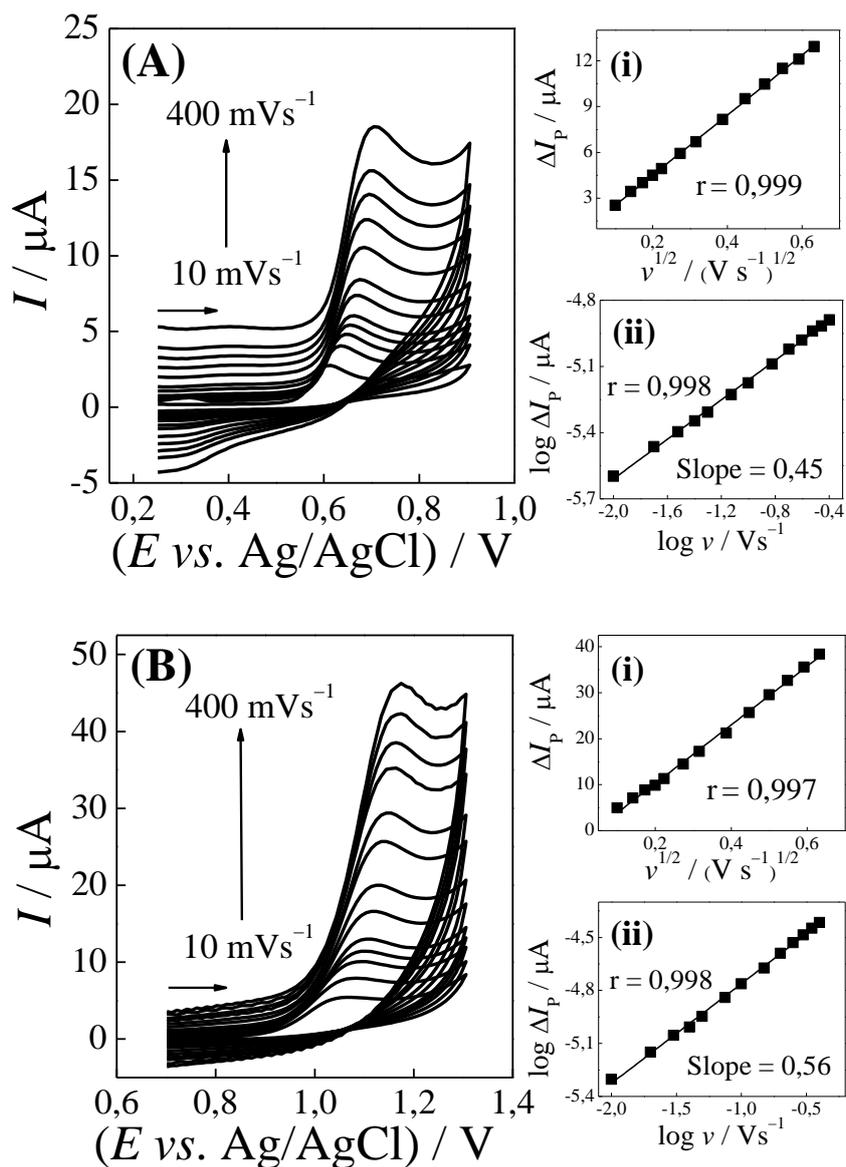


FIGURA 4.10 – Voltamogramas cíclicos obtidos para diferentes velocidades de varredura de potencial (10 - 400 mV s⁻¹) usando o sensor AgNPs-IL-FG-NF/GCE, para (A) 0,20 mmol L⁻¹ de SAL e (B) 0,20 mmol L⁻¹ de PRO, ambos em solução tampão fosfato 0,20 mol L⁻¹ (pH 7,0). Gráficos: (i) ΔI_p vs. $v^{1/2}$ e (ii) $\log \Delta I_p$ vs. $\log v$.

Esta constatação foi comprovada ao se analisar os gráficos de $\log \Delta I_{pa}$ vs. $\log v$. Nestes casos, os coeficientes angulares de 0,45 e 0,56 foram obtidos para SAL e PRO, respectivamente (ver os gráficos (ii) das FIGURAS 4.10 (A) e B)). Como pode ser observado, os coeficientes angulares foram próximos

do valor teórico de 0,5, característico para transporte de massa controlado por difusão.

4.3.7 Determinação simultânea de SAL e PRO por SWV

Primeiramente, para confirmar a possibilidade da determinação simultânea de SAL e PRO por SWV, e verificar se um analito interferiria na determinação do outro, foram obtidas curvas analíticas de um analito na presença do outro. Como pode ser visto na FIGURA 4.11A, a curva analítica para determinação de SAL foi construída fixando-se a concentração de PRO a $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e variando a concentração de SAL de $0,079$ a $2,9 \mu\text{mol L}^{-1}$. Portanto, a partir dos voltamogramas de SW obtidos (FIGURA 4.11A), o valor da I_p para SAL aumentou linearmente com sua concentração ($r = 0,997$), enquanto o valor da I_p para PRO permaneceu relativamente constante, com um RSD = 2,7 %. Da mesma forma, quando a concentração de SAL foi fixada em $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, e a de PRO variada na faixa de $0,10$ a $2,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ (FIGURA 4.11B), o valor da I_p para PRO aumentou progressivamente com sua concentração ($r = 0,998$), enquanto o valor da I_p para SAL permaneceu relativamente constante (RSD = 3,3%). A partir desses resultados, é possível concluir que ambos os fármacos (SAL ou PRO) não interferem na determinação simultânea de um na presença do outro. Desta forma, a determinação simultânea destes fármacos empregando o método proposto utilizando SWV é viável.

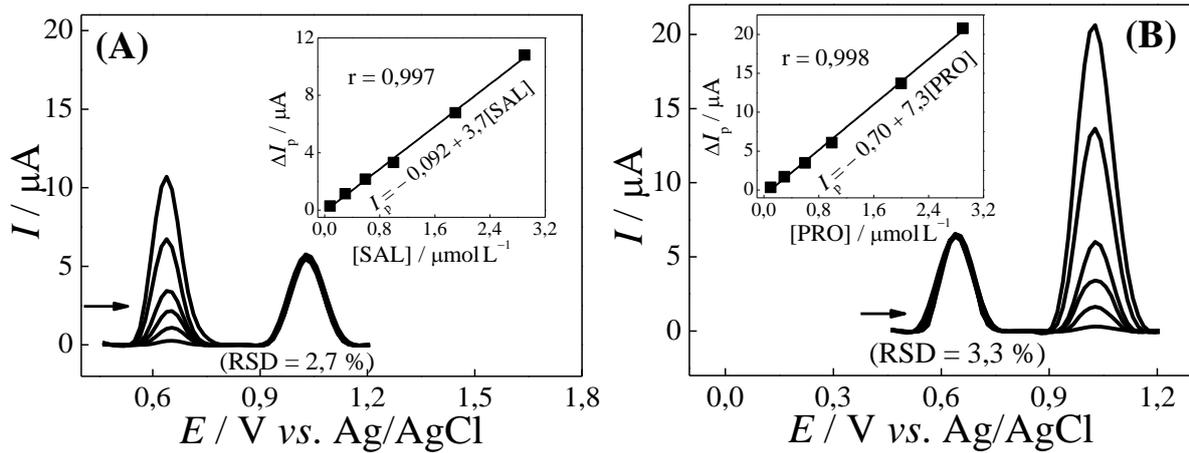


FIGURA 4.11 – Voltamogramas de SW obtidos utilizando o sensor AgNPs-IL-FG-NF/GCE para diferentes concentrações de: **(A)** SAL: 0,079; 0,30; 0,59; 0,97; 1,9 e 2,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a uma concentração fixa de PRO (1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$); **(B)** PRO: 0,10; 0,30; 0,59; 0,97; 1,9 e 2,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a uma concentração fixa de SAL (2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em solução tampão fosfato 0,20 mol L^{-1} (pH: 7,0). Inseridos: curva analítica correspondente. Parâmetros da SWV: $f = 30$ Hz, $a = 50$ mV e $\Delta E_s = 9$ mV.

Por fim, as curvas analíticas para a determinação simultânea destes fármacos foram construídas utilizando a SWV e sucessivas adições de soluções-estoque de SAL e PRO para obtenção de diferentes concentrações destes analitos na célula eletroquímica. Como pode ser visto nos voltamogramas da FIGURA 4.12, um aumento proporcional na corrente de pico anódica ocorreu com o aumento das concentrações dos analitos na célula eletroquímica. Assim, os resultados obtidos nesse estudo foram lineares para as faixas de concentração de 0,079 a 2,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para SAL, e de 0,10 a 2,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para PRO, com um LOD de 13 nmol L^{-1} e 17 nmol L^{-1} para SAL e PRO, respectivamente. Lembrando que os LODs foram calculados de acordo com a Eq. 3.8. Os gráficos da FIGURA 4.12 (i) e (ii) correspondem às curvas analíticas obtidas, com as seguintes equações de regressão linear, Eq. 4.1 e 4.2:

$$I_p (\mu\text{A}) = -0,185 + 3,94 [\text{SAL}] (\mu\text{mol L}^{-1}) \quad (r = 0,997) \quad \text{Eq. 4.1}$$

$$I_p (\mu\text{A}) = -0,642 + 6,82 [\text{PRO}] (\mu\text{mol L}^{-1}) \quad (r = 0,992) \quad \text{Eq. 4.2}$$

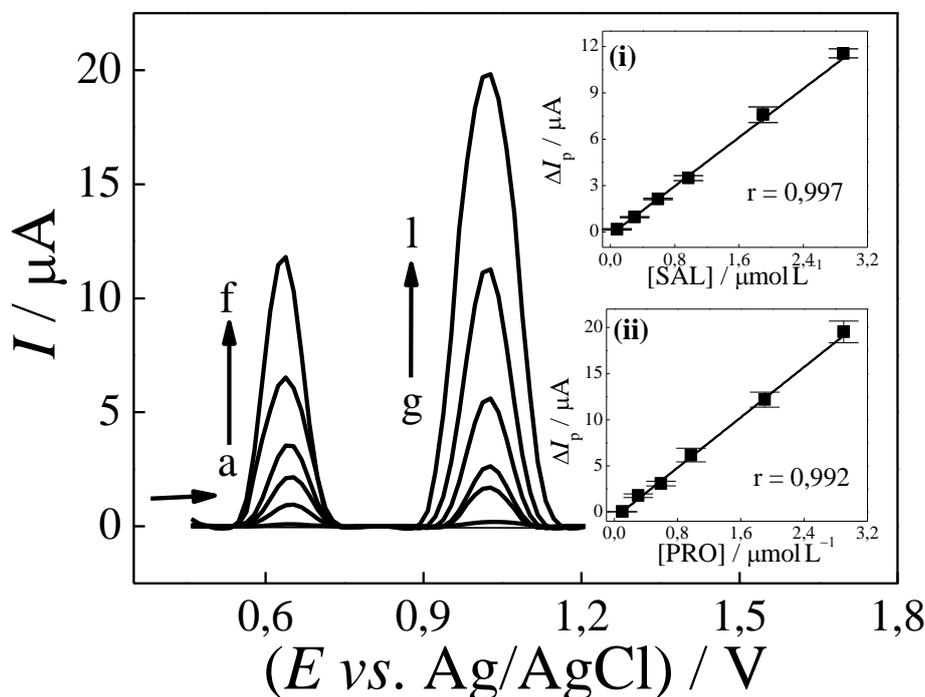


FIGURA 4.12 – Voltamogramas de SW obtidos utilizando o sensor AgNPs-IL-FG-NF/GCE para diferentes concentrações de SAL (a – f: 0,079; 0,30; 0,59; 0,97; 1,9 e 2,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e PRO (g – l: 0,10; 0,30; 0,59; 0,97; 1,9 e 2,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em solução tampão fosfato 0,20 mol L^{-1} (pH: 7,0). Curvas analíticas obtidas para (i) SAL e (ii) PRO. Parâmetros da SWV: $f = 30$ Hz, $a = 50$ mV e $\Delta E_s = 9$ mV.

Os parâmetros analíticos do sensor proposto foram comparados com outros previamente relatados na literatura^{79,153,157-162} (ver Tabela 4.3). Pode-se inferir a partir da Tabela 4.3 que o uso do AgNPs-IL-FG-NF/GCE levou, claramente, a amplas faixas lineares de concentração e LODs para SAL e PRO, respectivamente, sendo similares ou melhores que os reportados por outros autores. Além disso, o sensor aqui proposto foi o primeiro a relatar a determinação eletroquímica simultânea desses analitos, além da alta estabilidade e repetibilidade empregando o método proposto.

TABELA 4.3 – Comparação dos parâmetros analíticos na determinação de SAL e PRO utilizando diferentes sensores

Analito	Eletrodo	Faixa linear/mol L⁻¹	LOD/mol L⁻¹	Ref.	
SAL	MWNT-DHP/GCE	$8,0 \times 10^{-7} - 1,0 \times 10^{-5}$	$2,0 \times 10^{-7}$	153	
	Poly(AHNSA)/GCE	$2,0 \times 10^{-7} - 8,0 \times 10^{-6}$	$6,8 \times 10^{-8}$	157	
		$1,0 \times 10^{-7} - 3,0 \times 10^{-7}$			
	SMWCNT-NF/GCE	$3,0 \times 10^{-7} - 3,3 \times 10^{-6}$	$1,0 \times 10^{-7}$	158	
		$3,3 \times 10^{-6} - 33,3 \times 10^{-6}$			
	Nano-Au/L-cys/MWNTs-NF/GCE	$9,0 \times 10^{-8} - 7,0 \times 10^{-6}$	$5,0 \times 10^{-8}$	159	
	AgNPs-IL-FG-NF/GCE	$7,9 \times 10^{-8} - 2,9 \times 10^{-6}$	$1,3 \times 10^{-8}$	Este trabalho	
PRO	Pasta de carbono	$6,0 \times 10^{-7} - 5,0 \times 10^{-5}$	$2,0 \times 10^{-7}$	160	
	BDD	$2,0 \times 10^{-6} - 4,1 \times 10^{-5}$	$9,3 \times 10^{-7}$	161	
	CuNPs-GO-CB-PEDOT:PSS/GCE	$5,0 \times 10^{-7} - 2,9 \times 10^{-6}$	$1,8 \times 10^{-7}$	79	
	MWCNTs-PAH/GCE	$7,4 \times 10^{-8} - 6,3 \times 10^{-7}$	$2,6 \times 10^{-8}$	162	
		AgNPs-IL-FG-NF/GCE	$1,0 \times 10^{-7} - 2,9 \times 10^{-6}$	$1,7 \times 10^{-8}$	Este trabalho

MWNTs e MWCNTs: nanotubos de carbono de paredes múltiplas; DHP: dihexadecilfosfato; GO: óxido de grafeno; Poly(AHNSA): poli(ácido 4-amino-3-hidroxinaftaleno sulfônico); L-cys: L-cisteína; BDD: diamante dopado com boro; PAH: poli(hidrocloro de alilamina).

4.3.8 Estudo de repetibilidade

O estudo de repetibilidade do sensor AgNPs-IL-FG-NF/GCE foi conduzido empregando a SWV em medidas intra-dia ($n = 5$) e inter-dia ($n = 3$). Para a realização deste estudo, duas concentrações diferentes de SAL ($0,30$ e $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) e PRO ($0,60$ e $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) foram avaliadas. Para a análise intra-dia, o procedimento forneceu RSDs de $2,7\%$ e $1,8\%$ para o SAL e de $1,6\%$ e $2,9\%$ para o PRO. No entanto, as medidas inter-dia apresentaram RSDs de $4,3\%$ e $3,1\%$

para SAL e de 2,8% e 3,6% para PRO, respectivamente. Estes resultados demonstraram que o método analítico proposto apresentou excelente precisão de medidas.

4.3.9 Determinação simultânea de SAL e PRO em amostras biológicas

Finalmente, o sensor AgNPs-IL-FG-NF/GCE foi aplicado na determinação simultânea de SAL e PRO em amostras de fluidos biológicos (urina sintética e soro fetal bovino). Para isso, as amostras de soro e urina sintética foram inicialmente analisadas pela SWV, e não foram verificados picos na região de potenciais estudada. Com base nisso, as amostras foram fortificadas com dois níveis diferentes de concentrações conhecidas de SAL e PRO (0,60 e 2,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e analisadas com o sensor proposto (TABELA 4.4). A concentração de SAL e PRO que poderia ser teoricamente encontrada na urina ou no soro, não tem um valor exato, tendo em vista que estes fármacos não são consumidos de forma simultânea a não ser em algumas exceções como foi o foco deste trabalho, no qual o PRO é utilizado para inibir o efeito do SAL e vice-versa em um caso de sobredosagem ou uso indiscriminado.

Assim, como pode ser observado na TABELA 4.4, as porcentagens de recuperação obtidas ($n = 3$) ficaram na faixa de 96 a 104%, indicando que as matrizes analisadas não causaram interferência para a determinação destes fármacos. Essas amostras também foram analisadas por um método comparativo (espectrofotométrico), e os resultados de ambos os procedimentos também são apresentados na TABELA 4.4. Onde, o Erro (%) entre o método proposto e o método comparativo variaram de -6,3% a +5,6%, demonstrando a concordância entre os dois métodos e a potencialidade do procedimento proposto para a determinação simultânea de SAL e PRO em amostras de fluidos biológicos.

TABELA 4.4 – Determinação simultânea de SAL e PRO em amostras de fluidos biológicos

	Amostra	Adicionado ($\mu\text{mol L}^{-1}$) ^a	Comparativo ($\mu\text{mol L}^{-1}$) ^a	Proposto ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Rec. (%) ^b	Erro (%) ^c
SAL	Urina A	0,60	0,57 \pm 0,02	0,59 \pm 0,03	98	3,5
	Urina B	2,00	1,97 \pm 0,03	1,92 \pm 0,04	96	-2,5
	Soro A	0,60	0,61 \pm 0,01	0,58 \pm 0,03	97	-4,9
	Soro B	2,00	2,05 \pm 0,02	1,97 \pm 0,02	98	-3,9
PRO	Urina A	0,60	0,59 \pm 0,02	0,62 \pm 0,03	103	5,1
	Urina B	2,00	2,11 \pm 0,03	2,01 \pm 0,03	101	-4,7
	Soro A	0,60	0,63 \pm 0,04	0,59 \pm 0,05	98	-6,3
	Soro B	2,00	1,96 \pm 0,03	2,07 \pm 0,04	104	5,6

^a $n = 3$;^b Percentagem de recuperação = [Proposto] / [Adicionado] \times 100;^c Erro = ([Proposto] - [Comparativo]) / [Comparativo] \times 100.

4.4 Conclusões

O presente trabalho mostrou que a utilização do sensor proposto (AgNPs-IL-FG-NF/GCE) combinado com a técnica de SWV levou ao desenvolvimento de um método eletroanalítico com excelente seletividade e sensibilidade para a determinação simultânea de SAL e PRO, oferecendo uma alternativa confiável e barata. Além disso, com a otimização dos parâmetros experimentais, curvas analíticas foram obtidas nas faixas de concentração de 0,079 a 2,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o SAL e de 0,10 a 2,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o PRO, com LODs de 13 nmol L^{-1} e 17 nmol L^{-1} para SAL e PRO, respectivamente. A aplicabilidade do sensor proposto foi demonstrada pela determinação simultânea dos fármacos em amostras de soro e urina, com recuperações próximas a 100%.

CAPÍTULO 5

Eletrodo de carbono vítreo modificado com carbon black, PEDOT:PSS e nanopartículas de prata para a determinação simultânea de paracetamol e levofloxacina

5.1 Objetivos específicos

Neste trabalho, objetivou-se desenvolver um sensor eletroquímico com base na modificação da superfície do eletrodo de carbono vítreo com negro de fumo e nanopartículas de prata imobilizados em um filme de PEDOT: PSS condutor para a determinação simultânea de paracetamol e levofloxacina em amostra ambiental e de fluido biológico.

Os resultados discutidos neste capítulo foram publicados no artigo seguinte: Wong, A.; Santos, A. M.; Fatibello-Filho, O. “Simultaneous determination of paracetamol and levofloxacin using a glassy carbon electrode modified with carbon black, silver nanoparticles and PEDOT:PSS film”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 255, (2018) 2264–2273. <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2017.09.020>. Reproduzido com permissão da Elsevier.

5.2 Experimental

5.2.1 Reagentes e soluções

PAR, LEV, AgNO₃, NaBH₄ e PEDOT:PSS (4% v/v) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. KH₂PO₄, K₂HPO₄, NaOH e KCl foram obtidos da Across e o CB (VULCAN® VXC72R) foi cedido pela empresa Cabot Corporation, Brasil. As soluções-estoque dos analitos (PAR e LEV) foram preparadas nas concentrações de 0,010 mol L⁻¹. Todos os reagentes foram preparados com água ultrapura (resistividade não inferior a 18 MΩ cm) obtida a partir de um sistema de purificação Milli-Q Direct-0.3 (Millipore®).

5.2.2 Instrumentação e síntese das nanopartículas de prata

Por favor, consultar as seções “3.2.2 Instrumentação” e “4.2.3 Síntese das nanopartículas de prata”.

5.2.3 Preparação do sensor AgNPs-CB-PEDOT:PSS/GCE

Inicialmente, a superfície do GCE foi cuidadosamente polida utilizando um pano de polimento e solução de alumina 0,05 μm , posteriormente, foi lavado por 2 min em um banho ultrassom com água ultrapura. Sob condições otimizadas, a dispersão de AgNPs-CB-PEDOT:PSS foi preparada utilizando 1,0 mg de CB, 10 μL de PEDOT:PSS, 250 μL de solução de AgNPs e 740 μL de água ultrapura. A solução obtida foi submetida à agitação em banho ultrassônico durante 1 h com a finalidade de se obter uma dispersão homogênea e estável. Em seguida, uma alíquota de 8 μL da dispersão foi depositada sobre a superfície do GCE (método de *drop-casting*), sendo armazenada em um dessecador por 3 h em temperatura ambiente até a total evaporação do solvente (FIGURA 5.1).

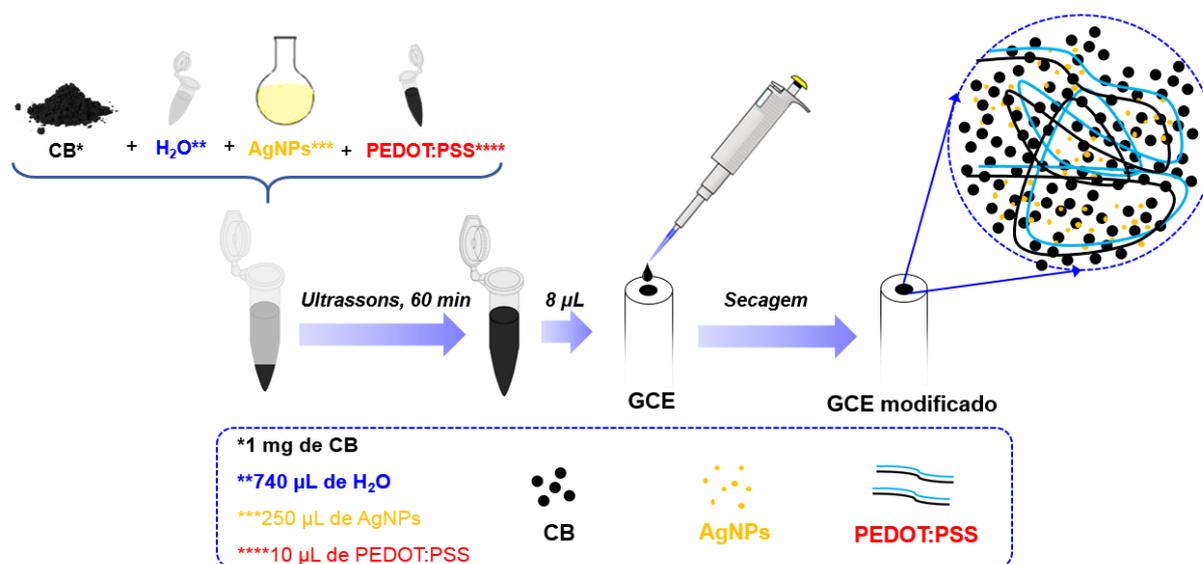


FIGURA 5.1 – Representação esquemática do procedimento de preparação do GCE modificado.

5.2.4 Procedimento analítico

As imagens de SEM foram obtidas empregando-se placas de carbono vítreo modificadas com dispersões contendo 1,0 mg de CB na presença e ausência de 250 μL de AgNPs em um volume final de mistura de 1,0 mL, completado com água deionizada. As caracterizações eletroquímicas dos eletrodos foram avaliadas

empregando a técnica de EIS e como sonda redox uma solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 1,9 mmol L⁻¹ em KCl 0,10 mol L⁻¹ como eletrólito suporte. Em seguida, a otimização das condições experimentais foi realizada para selecionar o melhor eletrólito suporte (composição e pH). Posteriormente, a determinação simultânea de PAR e LEV foi conduzida empregando SWV. Neste caso, os parâmetros instrumentais para SWV foram previamente otimizados. Com todos os parâmetros experimentais otimizados, foram construídas curvas analíticas utilizando adições sucessivas de alíquotas de soluções padrão de PAR e LEV. O LOD foi calculado como sendo três vezes o desvio padrão de dez medidas de corrente da solução de branco ($n = 10$) dividida pelo coeficiente angular da curva analítica. Em seguida, a precisão do método proposto foi avaliada a partir de estudos de repetibilidade inter-dia ($n = 3$) e intra-dia ($n = 5$).

As amostras de urina sintética e de água de rio foram fortificadas com duas concentrações conhecidas de PAR e LEV (2,5 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de PAR e LEV, respectivamente) e analisadas por interpolação na curva analítica. Por fim, os resultados obtidos foram comparados com o método comparativo (espectrofotométrico).

5.2.5 Preparo das amostras

A amostra de urina sintética foi preparada utilizando um balão volumétrico de 25,0 mL com a adição dos seguintes reagentes: 40 mg de KCl, 70 mg de NaCl, 40 mg de KH_2PO_4 , 30 mg de CaCl_2 , 25 mg de NH_4Cl e 600 mg de ureia, por fim o volume restante do frasco foi completado com água ultrapura¹³². A amostra de água de rio foi obtida no rio Gregório, no município de São Carlos – SP. A amostra foi coletada com um frasco acoplado a uma haste. A água coletada (1,0 L) inicialmente foi filtrada no local para remover possíveis partículas sólidas e então transferida para um frasco de polietileno âmbar, que por fim foi armazenada em um refrigerador a aproximadamente 3 °C. Em seguida, a água de rio coletada e a amostra de urina sintética foram divididas em frascos de

5,0 mL e diferentes alíquotas de 10 mmol L⁻¹ das soluções padrão (PAR e LEV) foram cuidadosamente adicionadas em cada frasco. Finalmente, 300 µL da amostra foi adicionada à célula eletroquímica e completada com eletrólito suporte, sendo então feitas as determinações empregando-se o eletrodo proposto.

5.3 Resultados e Discussão

Foi proposto neste trabalho um GCE modificado com CB e AgNPs imobilizados em uma matriz polimérica de PEDOT:PSS. A seleção do CB foi devida o mesmo ser um material carbonáceo de baixo custo e apresentar inúmeras vantagens analíticas quando são empregados nas modificações de sensores eletroquímicos¹⁶³⁻¹⁶⁵. Além disso, o mesmo pode ser utilizado em conjunto com outros nanomateriais com a finalidade de melhorar ainda mais a resposta eletroquímica do sensor. Assim, utilizou-se a combinação do CB com AgNPs com o objetivo de se obter algumas vantagens como, aumento de sinal analítico (maior magnitude de corrente de pico), maior sensibilidade, menor LOD e também diminuição do potencial de trabalho. Da mesma forma, o uso do PEDOT:PSS (polímero condutor) se deu na intenção de melhorar a resposta eletroquímica do sensor e, simultaneamente, promover uma melhora na imobilização dos nanomateriais na superfície do eletrodo oferecendo, assim, maior estabilidade, homogeneidade e melhor condutividade do sensor proposto¹⁶⁶⁻¹⁶⁸. Desta forma, um GCE modificado com materiais com excelentes propriedades eletrocatalíticas (CB, AgNPs e PEDOT:PSS) foi desenvolvido para a determinação simultânea e sensível de PAR e LEV em matrizes complexas.

Inicialmente foi realizada a otimização da quantidade do material eletródico empregado, a saber: AgNPs (100, 250 e 500 µL), PEDOT:PSS (5, 7, 10 e 15 µL) e CB (0,5, 1,0 e 1,5 mg). Em cada uma destas composições, empregou-se a SWV na presença de PAR 2,0 µmol L⁻¹ e LEV 5,0 µmol L⁻¹, sendo então comparadas as magnitudes de corrente de pico anódica (I_{pa}) obtidas. Neste estudo, o melhor sinal analítico foi obtido quando se empregou 8 µL no eletrodo

de trabalho da seguinte composição: 1,0 mg de CB, 250 μL de AgNPs e 10 μL de PEDOT:PSS para 1,0 mL de volume final de dispersão. Para imobilizar o CB, utilizou-se o polímero PEDOT:PSS para formar um filme homogêneo, aderente e de alta condutividade na superfície do GCE. A interação entre o CB e o PEDOT:PSS ocorre possivelmente entre os grupos $-\text{OH}$ presentes no CB e os grupos $-\text{SO}_3^-$ do PEDOT:PSS, como discutido por Soltani-Kordshuli *et al.*¹⁶⁹. Assim, as AgNPs foram parcialmente ou completamente adsorvidas pelo CB e, conseqüentemente, imobilizadas quando o filme CB-PEDOT:PSS foi formado.

5.3.1 Caracterização morfológica e eletroquímica dos nanomateriais

A caracterização morfológica do CB e do CB-AgNPs foram realizadas por imagem de SEM e TEM. A FIGURA 5.2A-C mostra imagens de SEM do CB em diferentes ampliações, no qual é possível observar “grãos” (pequenas esferas) aglomerados apresentando diferentes tamanhos (15-30 nm). A FIGURA 5.2D mostra uma imagem de SEM na qual não é possível observar claramente as AgNPs na presença de CB, devido à forma esférica e tamanho pequeno do CB. Portanto, as AgNPs foram avaliadas por medidas de EDS, no qual é possível observar um pico típico de carbono a 0,3 keV, atribuído ao CB, e um pico bem definido a 3 keV, atribuído as AgNPs (FIGURA 5.2D - inserido). Em seguida, uma imagem de TEM foi empregada para avaliar a distribuição e a forma esférica das AgNPs (FIGURA 5.2E). Um histograma das AgNPs é mostrado na FIGURA 5.2F, em que o diâmetro mediano de 10,6 nm é comparável aos valores obtidos em outros estudos^{170,171}.

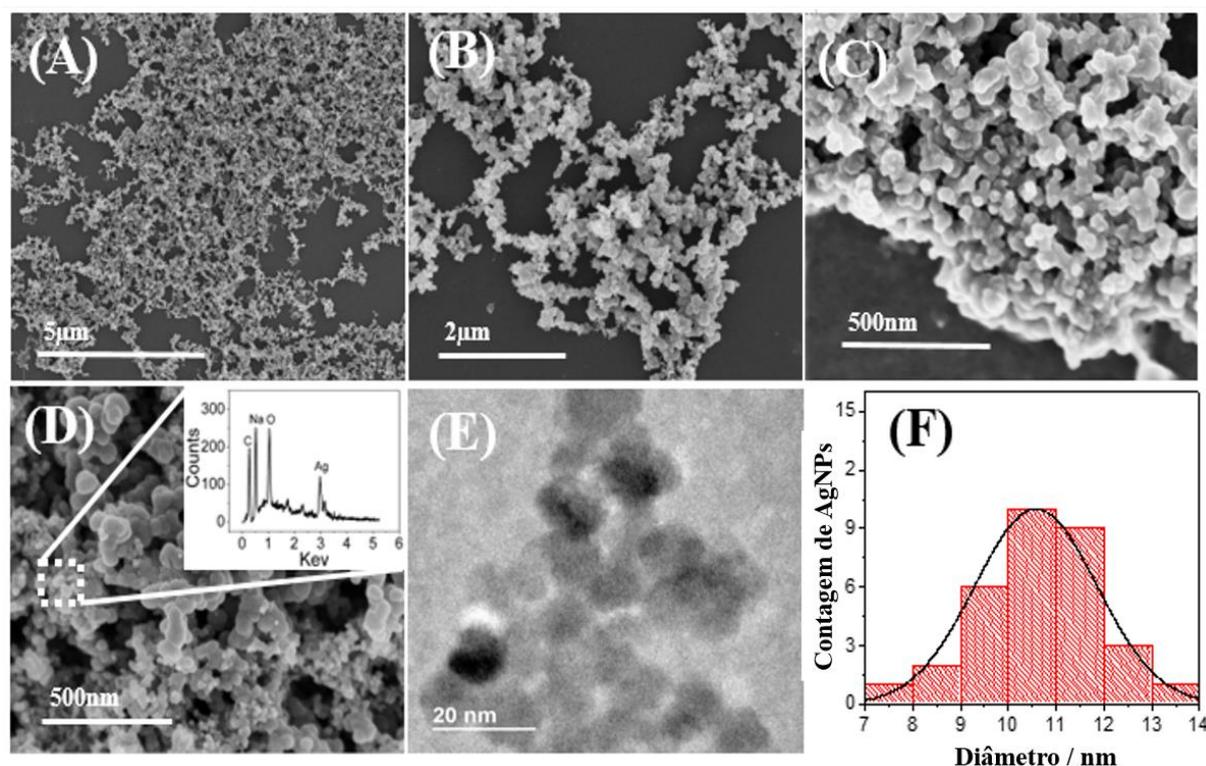


FIGURA 5.2 – Imagens de SEM do CB em diferentes ampliações (A-C), imagem SEM do CB e AgNPs (D), espectro EDS (D, inserido), imagem de TEM das AgNPs (E) e histograma (F).

A caracterização eletroquímica dos eletrodos foi realizada por EIS, utilizando $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1,9 \text{ mmol L}^{-1}$ como sonda redox em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. O potencial aplicado foi selecionado empregando a CV (potencial de meia-onda, $E_{1/2}$). Na FIGURA 5.3 estão representados os diagramas de Nyquist obtidos para os diferentes eletrodos, os quais podem ser observados claramente que o GCE sem modificação apresentou uma parte linear em frequências mais baixas e um semicírculo bem definido em frequências mais altas. Este semicírculo corresponde à transferência limitada de elétrons, e o seu diâmetro é igual ao R_{ct} , como já comentado em capítulos anteriores. Portanto, quanto maior o tamanho do semicírculo, maior o R_{ct} . Os valores de R_{ct} obtidos para o GCE, PEDOT:PSS/GCE, CB-PEDOT:PSS/GCE e AgNPs-CB-PEDOT:PSS/GCE foram de 1050, 270, 6 e 3Ω , respectivamente. Esses resultados indicam que os materiais utilizados foram altamente condutores, possibilitando assim aumentos

significativos na transferência de elétrons entre o eletrodo e as espécies eletroativas. A faixa de frequência empregada nos experimentos foi de 100 kHz a 0,1 Hz.

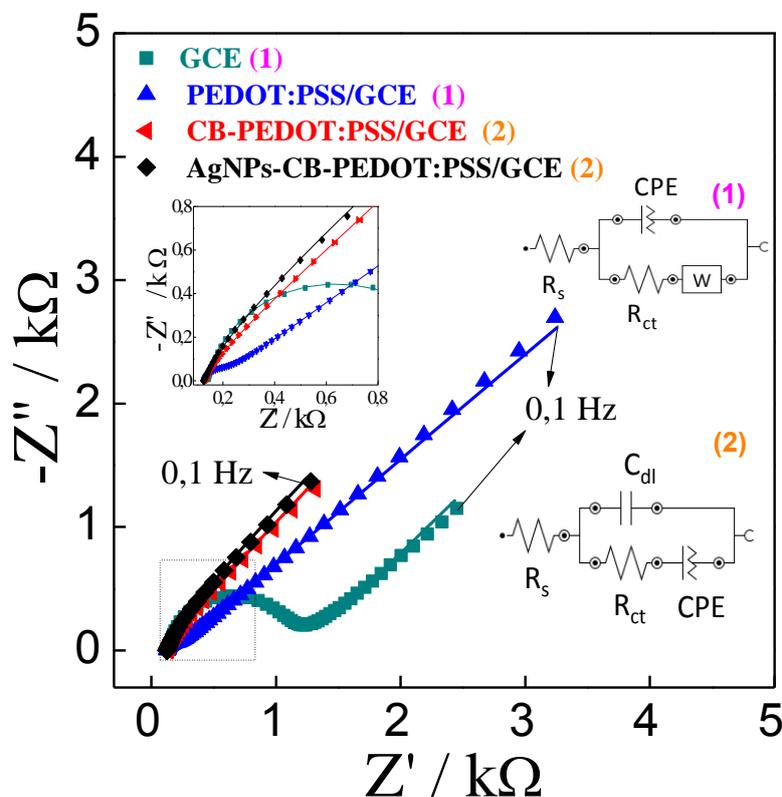


FIGURA 5.3 – Diagramas EIS para $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1,9 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. Intervalo de frequência de 100 KHz a 0,1 Hz. Circuito equivalente adaptado de Randles (inserido), nos quais o R_s é a resistência do eletrólito suporte, R_{ct} é a resistência de transferência de carga, CPE é o elemento de fase constante e W é a impedância de Warburg.

A partir dos resultados obtidos (FIGURA 5.3), foi possível calcular a constante heterogênea de transferência de elétrons (k^0) para os eletrodos utilizando a Equação 3.3, como descrita no capítulo 3. Desta forma, os valores de k^0 encontrados para os eletrodos foram: $9,1 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$ (GCE), $3,5 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$ (PEDOT:PSS/GCE), $3,3 \times 10^{-1} \text{ cm s}^{-1}$ (CB-PEDOT:PSS/GCE) e $6,7 \times 10^{-1} \text{ cm s}^{-1}$ (AgNPs-CB-PEDOT:PSS/GCE). Os resultados mostram um maior valor de k^0 para o sensor AgNPs-CB-PEDOT:PSS/GCE em comparação

com os outros eletrodos estudados, indicando, desta forma, uma melhor transferência de elétrons entre as espécies redox e a superfície do eletrodo. Portanto, pode-se concluir que a modificação com PEDOT:PSS, CB e AgNPs contribuiu fortemente para melhorar o desempenho eletroquímico do sensor proposto.

5.3.2 Estudo do comportamento eletroquímico do PAR e LEV

O comportamento eletroquímico dos analitos PAR e LEV foi avaliado utilizando os diferentes eletrodos (GCE, PEDOT:PSS/GCE, CB-PEDOT:PSS/GCE e AgNPs-CB-PEDOT:PSS/GCE), na presença de $0,12 \text{ mmol L}^{-1}$ de PAR e $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de LEV em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0), empregando uma velocidade de varredura de potenciais de 50 mV s^{-1} , como pode ser observado na FIGURA 5.4.

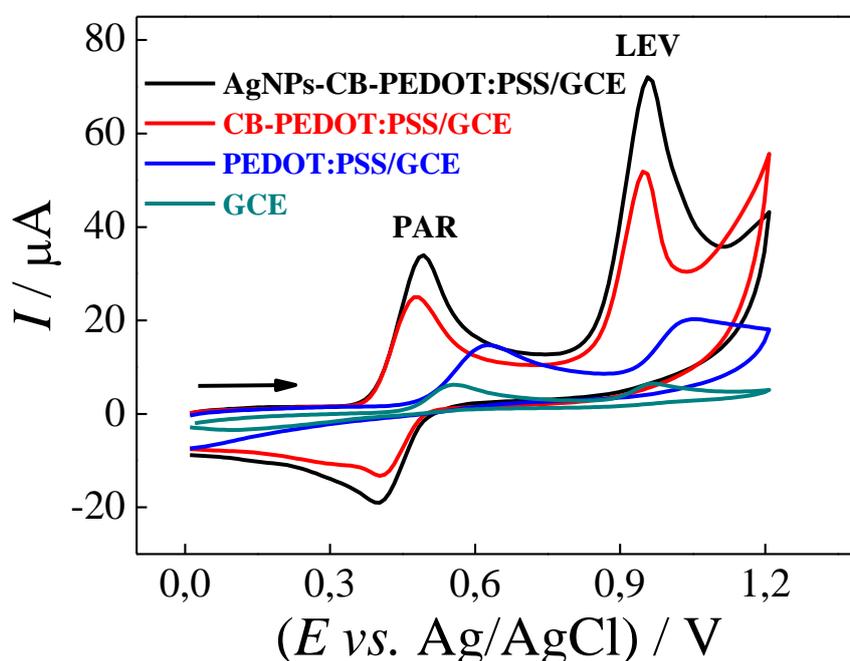


FIGURA 5.4 – Voltamogramas cíclicos obtidos para PAR $0,12 \text{ mmol L}^{-1}$ e LEV $50 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ em diferentes eletrodos (GCE, PEDOT:PSS/GCE, CB-PEDOT:PSS/GCE e AgNPs-CB-PEDOT:PSS/GCE). Condições de análise: $v = 50 \text{ mVs}^{-1}$ e tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0).

O perfil eletroquímico do sensor AgNPs-CB-PEDOT:PSS/GCE mostrou dois picos de oxidação bem intensos e definidos. O primeiro pico em +0,45 V referente à oxidação do PAR e o segundo em +0,95 V referente à oxidação da LEV. Foi observado também, apenas um pico de redução em +0,40 V referente ao PAR, demonstrando assim um processo quase reversível para o PAR e irreversível para a LEV. Para a determinação simultânea, é importante que os potenciais de pico dos analitos sejam bem separados, a fim de evitar interferências. Assim, a separação entre os potenciais de pico do PAR e LEV foi de 0,50 V, o que é bem satisfatório para a determinação simultânea destes compostos. Os valores das correntes do pico anódico dos eletrodos foram as seguintes: 6 e 6 μA (GCE), 15 e 20 μA (PEDOT:PSS/GCE), 25 e 52 μA (CB-PEDOT:PSS/GCE) e 34 e 72 μA (AgNPs-CB-PEDOT:PSS/GCE). Os resultados demonstraram que uma maior atividade da modificação foi alcançada utilizando CB, AgNPs e PEDOT:PSS, devido ao efeito sinérgico proporcionado por estes materiais eletródicos. Em comparação com o GCE, os sinais eletroquímicos obtidos com o sensor AgNPs-CB-PEDOT:PSS/GCE foram 5,7 vezes e 12 vezes maiores para PAR e LEV, respectivamente.

5.3.3 Efeito do pH e otimização dos parâmetros analíticos

O efeito do pH (intervalo de 3,0 a 9,0) sobre a resposta eletroquímica dos analitos alvo foi avaliado por SWV, utilizando o sensor proposto na presença de PAR 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e LEV 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em solução de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (FIGURA 5.5A). Como pode ser visto na FIGURA 5.5B, as correntes de pico anódico máximas (I_{pa}) para PAR e LEV foram obtidas empregando-se a solução tamponada com pH = 6,0. Assim, o pH 6,0 foi selecionado para a condução dos demais ensaios eletroquímicos.

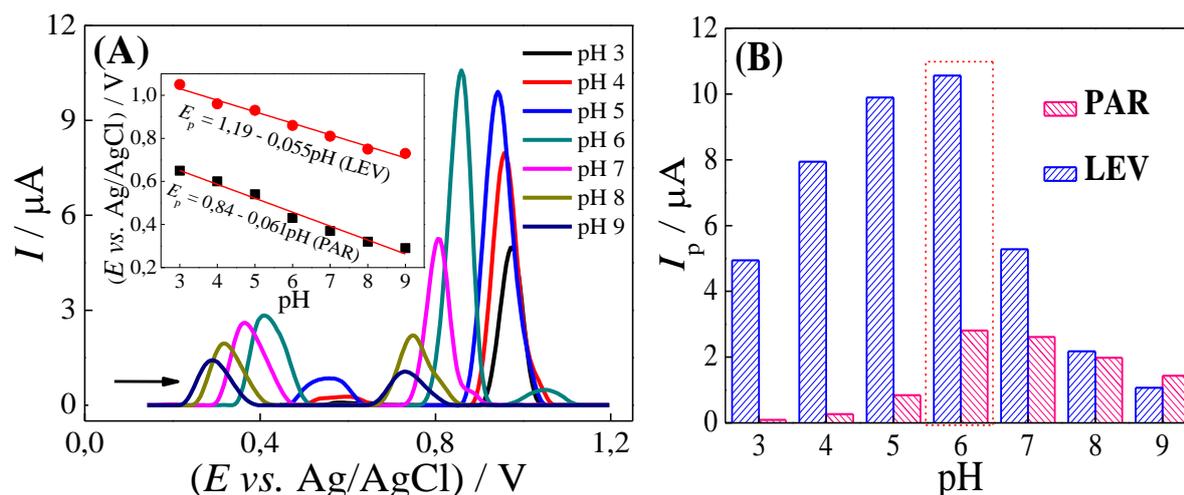
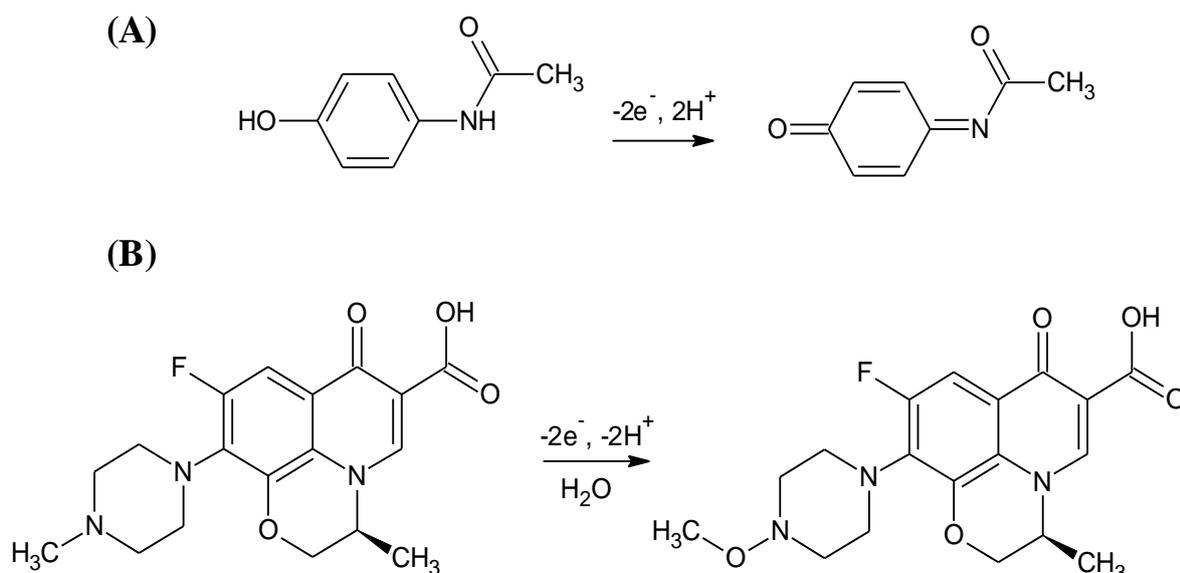


FIGURA 5.5 – (A) Voltamogramas de SW obtidos empregando-se o sensor AgNPs-CB-PEDOT:PSS/GCE para PAR 2,0 μmol L⁻¹ e LEV 5,0 μmol L⁻¹ em soluções de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ com pH variando de 3,0 a 9,0 (inserido: Gráficos de E_p vs. pH). Condições da SWV: $f = 15$ Hz, $a = 75$ mV e $\Delta E_s = 7$ mV. (B) Gráficos de barras I_p vs. pH obtidos para PAR e LEV.

Em seguida, avaliou-se a relação entre E_p vs. pH para ambos os fármacos e, como pode ser visto na FIGURA 5.5A (inserido) observou-se uma relação linear entre E_p e pH nos dois casos. Desta forma, as equações de regressão linear ($E_p = 0,84 - 0,061pH$ (PAR) e $E_p = 1,2 - 0,055pH$ (LEV)) apresentaram coeficientes angulares de $-0,061$ e $-0,055$ mV pH⁻¹ para PAR e LEV, respectivamente. Esses valores estão próximos do coeficiente angular teórico da equação de Nernst de $-0,0592$ V pH⁻¹ típico para reações redox envolvendo números iguais de prótons e elétrons¹⁴⁵. As possíveis reações de eletrooxidação para as moléculas de PAR e LEV que tem sido propostas na literatura¹⁷²⁻¹⁷⁵, estão representadas no Esquema 5.1 e são consistentes com a condição de igual número de prótons e elétrons.



Esquema 5.1 – Possíveis reações de eletrooxidação propostas para as moléculas de PAR (A) e LEV (B).

Após a avaliação do efeito do pH, foi estudada a influência dos parâmetros da SWV (TABELA 5.1). Os melhores resultados foram obtidos quando os parâmetros da SWV foram empregados nos seguintes valores: $f = 15$ Hz, $a = 75$ mV e $\Delta E_s = 7$ mV.

TABELA 5.1 – Otimização dos parâmetros experimentais da técnica de SWV para a determinação simultânea de PAR e LEV

Técnica	Parâmetros	Faixa estudada	Valor selecionado
SWV	Frequência, f (Hz)	10 – 100	15
	Amplitude, a (mV)	10 – 100	75
	Incremento de potencial, ΔE_s (mV)	1 – 10	7

5.3.4 Efeito da velocidade de varredura de potencial

A influência da velocidade de varredura de potencial no comportamento eletroquímico dos analitos empregando-se o eletrodo AgNPs-

CB-PEDOT:PSS/GCE foi investigada usando-se voltametria cíclica em diferentes velocidades de varredura de potenciais (10 a 200 mV s⁻¹) em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,0), na presença de 50,0 μmol L⁻¹ de PAR e LEV, respectivamente (FIGURA 5.6 A e B). Os resultados mostraram linearidade para os gráficos de ΔI_{pa} vs. v (típico para processo controlado por adsorção) e ΔI_{pa} vs. $v^{1/2}$ (típico para processo controlado por transporte difusional de massa), gráficos (i) e (ii), respectivamente. Neste sentido, os gráficos de $\log \Delta I_p$ vs. $\log v$ foram lineares com coeficientes angulares de 1,0 para o PAR e 0,75 para LEV, gráficos (iii). Desta forma, o valor do coeficiente angular para o PAR foi idêntico ao valor teórico de 1,0 tipicamente relatado para processos redox governados por adsorção. Por outro lado, no caso da LEV o valor do coeficiente angular ficou entre os valores teóricos de 0,5, típico para um processo redox controlado apenas por transporte de massa difusional e 1,0 para um processo redox governado por adsorção. Desta forma, um processo misto foi caracterizado para a LEV, ou seja, controlado pela mistura dos fenômenos de difusão e adsorção. Além disso, no caso da LEV, o potencial de pico variou para valores mais positivos à medida que a velocidade de varredura de potencial aumentou, indicando desta forma um processo irreversível¹⁷⁶.

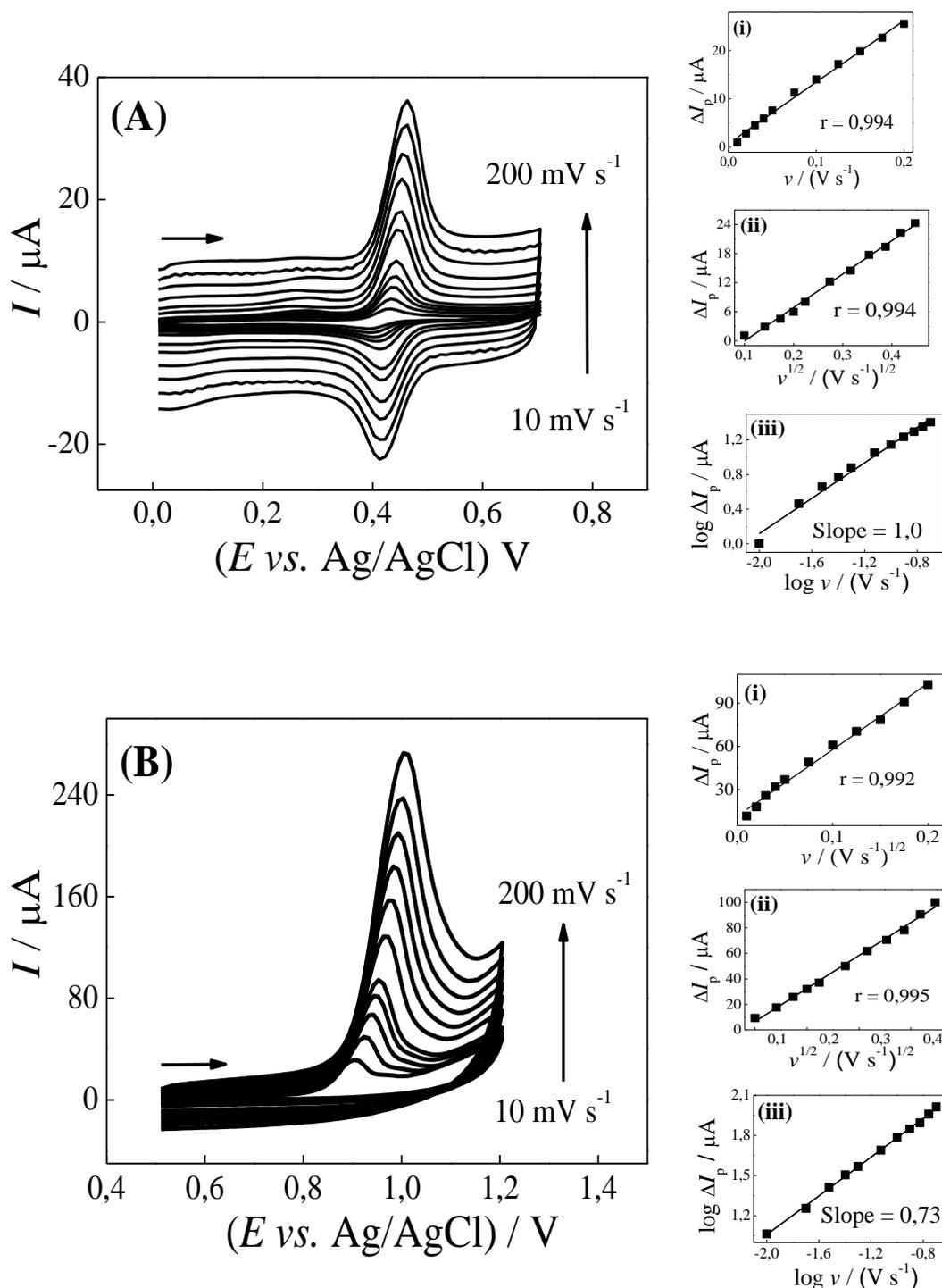


FIGURA 5.6 – Voltamogramas cíclicos obtidos para o sensor AgNPs-CB-PEDOT:PSS/GCE em solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0) em diferentes velocidades de varredura de potencial ($10 - 200 \text{ mV s}^{-1}$) na presença de (A) PAR $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e (B) LEV $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Gráficos de (i) ΔI_p vs. v ; (ii) ΔI_p vs. $v^{1/2}$ e (iii) $\log \Delta I_p$ vs. $\log v$.

5.3.5 Determinação eletroquímica de PAR e LEV

Tendo em vista a determinação simultânea de PAR e LEV realizou-se, inicialmente, um estudo para avaliar a influência da interação mútua destes fármacos entre suas respostas eletroquímicas. Para isso, utilizou-se medidas de SWV para a construção da curva analítica de um dos analitos enquanto manteve-se a concentração do outro fixa. Sendo assim, variou-se a concentração do PAR na faixa de 0,62 a 6,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e manteve-se a concentração de LEV fixa a 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (FIGURA 5.7A). Posteriormente, a concentração de LEV foi variada na faixa de 0,67 a 9,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ na presença de PAR 3,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (FIGURA 5.7B). Os RSDs obtidos para as concentrações fixas de PAR e LEV foram de 3,8% (PAR) e 3,5% (LEV) demonstrando, assim, a boa estabilidade das correntes de pico para ambos os analitos. Da mesma forma, quando se variou a concentração dos fármacos, foram obtidos coeficientes de correlação linear $\geq 0,994$ para as respectivas curvas analíticas. Este conjunto de resultados deixou evidenciado que nenhum dos analitos interferiu na determinação do outro, o que viabilizou a possibilidade da determinação voltamétrica simultânea destes fármacos empregando o sensor proposto.

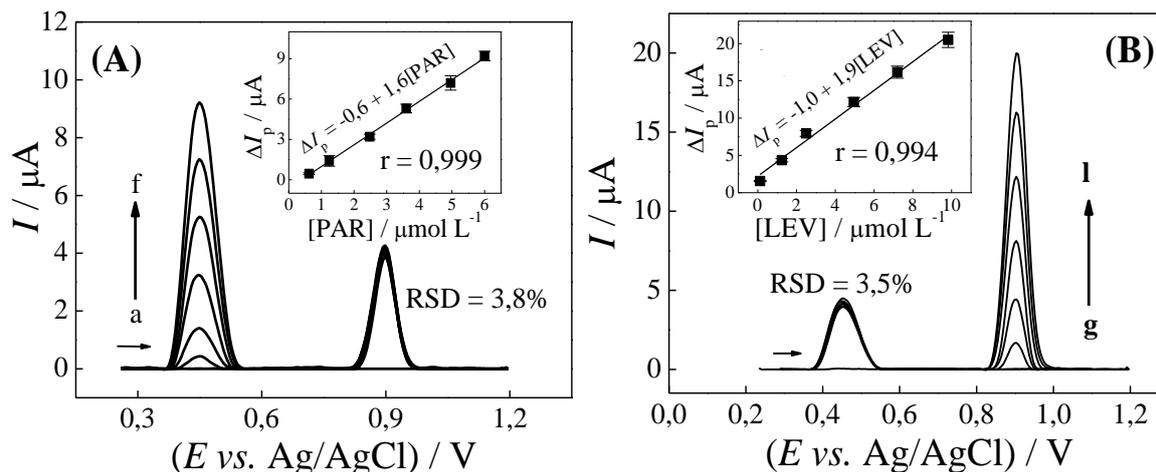


FIGURA 5.7 – Voltamogramas de SW obtidos utilizando AgNPs-CB-PEDOT:PSS/GCE em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,0) contendo: **(A)** LEV 2,0 × 10⁻⁶ mol L⁻¹ e diferentes concentrações de PAR (a) 0,62; (b) 1,2; (c) 2,5; (d) 3,6; (e) 5,0 e (f) 6,0 μmol L⁻¹, **(B)** PAR 3,0 μmol L⁻¹ e diferentes concentrações de LEV: (g) 0,67; (h) 1,3; (i) 2,5; (j) 5,0; (k) 7,2 e (l) 9,9 μmol L⁻¹. Curvas analíticas (inseridas).

Em seguida, construiu-se as curvas analíticas para PAR e LEV de forma simultânea, ou seja, variando-se a concentração de ambos os fármacos na célula eletroquímica (FIGURA 5.8). As faixas lineares de concentração obtidas foram de 0,62 a 7,1 μmol L⁻¹ e de 0,67 a 12 μmol L⁻¹ para o PAR e LEV, respectivamente. Os LODs previstos foram iguais a 12 nmol L⁻¹ (PAR) e 14 nmol L⁻¹ (LEV) (LOD = 3σ/s, Eq. 3.8). As seguintes equações de regressão linear foram obtidas para as curvas analíticas:

$$I_p (\mu\text{A}) = -0,4 + 1,6 [\text{PAR}] (\mu\text{mol L}^{-1}) \quad (r = 0,998) \quad \text{Eq. 5.1}$$

$$I_p (\mu\text{A}) = 0,2 + 1,8 [\text{LEV}] (\mu\text{mol L}^{-1}) \quad (r = 0,997) \quad \text{Eq. 5.2}$$

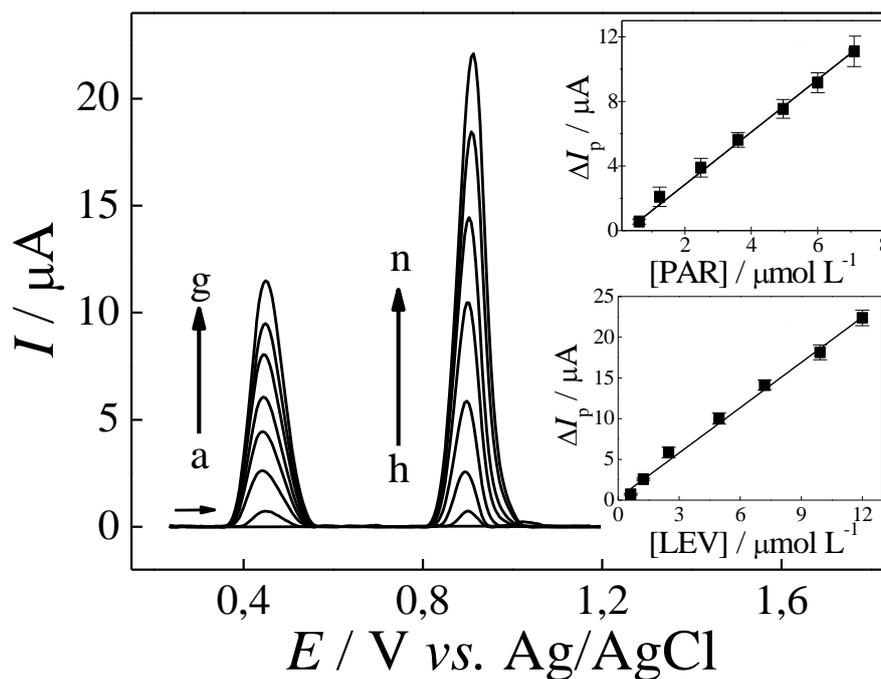


FIGURA 5.8 – Voltamogramas de SW obtidos utilizando-se AgNPs-CB-PEDOT:PSS/GCE em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0) contendo diferentes concentrações de PAR (a) 0,62; (b) 1,2; (c) 2,5; (d) 3,6; (e) 5,0; (f) 6,0 e (g) $7,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ e de LEV: (h) 0,67; (i) 1,3; (j) 2,5; (k) 5,0; (l) 7,2; (m) 9,9 e (n) $12 \mu\text{mol L}^{-1}$. Curvas analíticas (inseridas).

Até a data de elaboração desta tese, não foram encontrados relatos na literatura da determinação simultânea destes fármacos utilizando sensores eletroquímicos. Assim, os resultados aqui obtidos foram comparados com outros estudos envolvendo a determinação individual de PAR e LEV com eletrodos modificados^{173-175,177-181}. Como pode ser visto na TABELA 5.2, o sensor aqui proposto apresentou bom desempenho analítico para a determinação de PAR e LEV, com LODs e/ou faixa linear de concentração semelhantes ou melhores do que os relatados anteriormente, com exceção dos métodos descritos por Devaraj *et al.*¹⁷⁷, Yigit *et al.*¹⁷⁸ e Huang *et al.*¹⁸¹. Entretanto, o eletrodo aqui proposto apresentou muitas vantagens, incluindo a determinação simultânea dos compostos, facilidade de uso, alta estabilidade, excelente repetibilidade, rápida análise e baixo custo.

TABELA 5.2 – Comparação de parâmetros analíticos para determinação de PAR e LEV empregando-se vários eletrodos modificados

Analito	Eletrodo	Faixa linear/mol L⁻¹	LOD/mol L⁻¹	Ref.
PAR	AuNPs/PCA-GCE	$2,0 \times 10^{-7} - 2,0 \times 10^{-5}$	$1,4 \times 10^{-8}$	173
	MWCNTs-G4.0/GCE	$3,0 \times 10^{-7} - 2,0 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-7}$	174
	Cu/Cu ₂ O-OA/MWCNTs	$2,0 \times 10^{-8} - 1,6 \times 10^{-6}$	$3,3 \times 10^{-9}$	177
	GR-NF/GCE	$8,2 \times 10^{-9} - 5,0 \times 10^{-8}$	$1,2 \times 10^{-9}$	178
	AgNPs-CB-PEDOT:PSS/GCE	$6,2 \times 10^{-7} - 7,1 \times 10^{-6}$	$1,2 \times 10^{-8}$	Este trabalho
	LEV	AgNPs/CeO ₂ -Au/GCE	$3,0 \times 10^{-8} - 1,0 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-8}$
GC/MWCNT-SnO ₂		$1,0 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-5}$	$2,0 \times 10^{-7}$	179
MWCNT-PAR/GCE		$5,0 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-4}$	$4,0 \times 10^{-7}$	180
PoAP/GQD/GCE		$5,0 \times 10^{-8} - 1,0 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-10}$	181
AgNPs-CB-PEDOT:PSS/GCE		$6,7 \times 10^{-7} - 1,2 \times 10^{-5}$	$1,4 \times 10^{-8}$	Este trabalho

PCA: poli(ácido cafeico); MWCNTs: nanotubo de carbono de paredes múltiplas; G4.0: dendrímeros de poli(amidoamina) de quarta geração; GR: grafeno; NF: nafion; PAR: alizarina polimérica; GQD: pontos quânticos de grafeno; PoAP: poli(o-aminofenol).

5.3.7 Estabilidade de resposta e seletividade

A estabilidade do sensor AgNPs-CB-PEDOT:PSS/GCE foi avaliada por SWV. Neste caso, uma sequência de medidas eletroquímicas ($n = 40$) foram realizadas utilizando concentrações de $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de PAR e LEV. Os valores de RSD obtidos para essas medições foram inferiores a 5%, demonstrando que a modificação do sensor proposto proporcionou uma boa estabilidade e repetibilidade (medidas intra-dia). Além disso, a resposta do sensor foi avaliada durante 10 dias consecutivos (experimentos inter-dias). As análises foram realizadas em triplicata ($n = 3$) todos os dias, utilizando concentrações de $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de PAR e LEV. As correntes de pico anódico (I_{pa}) obtidas no

primeiro dia ($I_{pa} = 4 \mu\text{A}$ para PAR e $I_{pa} = 6 \mu\text{A}$ para LEV) e no último dia ($I_{pa} = 3,6 \mu\text{A}$ para PAR e $I_{pa} = 5,1 \mu\text{A}$ para LEV) revelaram um decréscimo ao longo do período de 10% (PAR) e 15% (LEV). Os valores de RSD obtidos nos experimentos realizados foram de 4,6% para o PAR e 5,5% para o LEV. Nessas medidas eletroquímicas, o eletrodo foi lavado com água ultrapura após o uso e armazenado em um dessecador.

Posteriormente, a seletividade do sensor foi avaliada na presença de possíveis substâncias interferentes comumente encontradas em amostras biológicas (glicose, albumina, cafeína e ureia), utilizando uma proporção de 1:1 (analito: interferente). Os erros (%) obtidos nas medidas eletroquímicas variaram de -1,5% a +4,5% para PAR e LEV (TABELA 5.3). Os resultados obtidos mostraram que não houve interferência significativa nas intensidades da corrente de pico anódico (I_{pa}) para ambos os analitos, demonstrando que esses compostos poderiam ser determinados na presença de várias outras substâncias.

TABELA 5.3 – Efeito de possíveis interferentes na determinação voltamétrica simultânea de PAR e LEV na proporção de 1:1 (analito: interferente)

Possíveis interferentes	Erro (%) ^a	
	PAR	LEV
Albumina	4,5	1,3
Cafeína	0,6	1,9
Glicose	-1,5	-0,8
Ureia	-0,7	-1,1

^aErro (%) = $[(\text{Sinal analito}_{\text{presença}} - \text{Sinal analito}_{\text{ausência}}) / \text{Sinal analito}_{\text{ausência}}] \times 100\%$.

5.3.7 Aplicação do sensor AgNPs-CB-PEDOT:PSS/GCE em amostras ambientais e biológicas

Por fim, para avaliar a aplicabilidade do sensor, o mesmo foi utilizado para a determinação simultânea de PAR e LEV em amostras de água de

rio e de urina sintética sendo que, inicialmente, foram realizadas análises por SWV na presença destas amostras para verificar quaisquer reações eletroquímicas na faixa de potenciais estudada. Os resultados não revelaram picos de oxidação correspondentes aos compostos sob investigação ou qualquer outro. Assim, as amostras foram fortificadas com dois níveis conhecidos de concentração de PAR e LEV. As porcentagens de recuperação obtidas ($n = 3$) com o sensor AgNPs-CB-PEDOT:PSS/GCE foram satisfatórias, na faixa de 95,0 a 108% (TABELA 5.4), indicando desta forma que as matrizes analisadas (amostras de água de rio e de urina) não causaram interferência significativa sobre a determinação destes fármacos na faixa de potencial estudada. Posteriormente, realizou-se uma comparação entre os resultados obtidos empregando-se o método proposto com aqueles fornecidos por um método comparativo, utilizando espectrofotometria UV/VIS, no qual resultou em erros menores que 10% demonstrando, assim, que o sensor poderia ser aplicado de forma eficiente para a determinação destes analitos nas amostras avaliadas.

TABELA 5.4 – Determinação simultânea de PAR e LEV em amostras de água de rio e urina utilizando SWV e o sensor AgNPs-CB-PEDOT:PSS/GCE

	Amostra	Adicionado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Comparativo^a ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Proposto^a ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Rec.^b (%)	Erro^c (%)
PAR	Urina A	2,5	$2,5 \pm 0,1$	$2,6 \pm 0,2$	104	4,0
	Urina B	10	$9,8 \pm 0,3$	$9,5 \pm 0,4$	95,0	-3,1
	Rio A	2,5	$2,6 \pm 0,2$	$2,7 \pm 0,3$	108	3,8
	Rio B	10	$9,7 \pm 0,1$	$9,6 \pm 0,2$	96,0	-1,0
LEV	Urina A	2,5	$2,5 \pm 0,1$	$2,5 \pm 0,2$	100	0
	Urina B	10	$9,5 \pm 0,2$	$9,9 \pm 0,3$	99,0	4,2
	Rio A	2,5	$2,5 \pm 0,2$	$2,6 \pm 0,1$	104	4,0
	Rio B	10	$9,9 \pm 0,1$	$9,7 \pm 0,3$	97,0	-2,0

^a $n = 3$; Rec. = Recuperado;

^b Percentagem de recuperação = $[\text{Proposto}] / [\text{Adicionado}] \times 100$;

^c Erro = $([\text{Proposto}] - [\text{Comparativo}]) / [\text{Comparativo}] \times 100$.

5.4 Conclusões

O sensor AgNPs-CB-PEDOT:PSS/GCE proposto neste trabalho apresentou bom desempenho para determinação simultânea de PAR e LEV, oferecendo desta forma um método analítico confiável, eficaz e de baixo custo. A modificação da superfície do GCE com CB, AgNPs e PEDOT:PSS resultaram em alta atividade catalítica, com medições eletroquímicas altamente reprodutíveis e resultados satisfatórios para análise de água de rio e amostras de urina, com recuperações próximas a 100%. Ressalta-se que este foi o primeiro dispositivo eletroquímico confeccionado para a detecção simultânea de PAR e LEV, com aplicações em amostras biológica e ambiental.

CAPÍTULO 6

Sensoriamento voltamétrico simultâneo de levodopa, piroxicam, ofloxacina e metocarbamol utilizando um eletrodo de pasta de carbono modificado com grafite funcionalizado e β -ciclodextrina

6.1 Objetivos específicos

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um novo sensor eletroquímico através da modificação de um eletrodo de pasta de carbono com grafite funcionalizado e β -ciclodextrina para a determinação voltamétrica simultânea de quatro analitos, sendo eles, levodopa, piroxicam, ofloxacina e metocarbamol em amostras de água de rio e de urina sintética.

Os resultados apresentados neste capítulo encontram-se reportados no nosso artigo: Santos, A.M.; Wong, A.; Vicentini, F.C.; Fatibello-Filho, O. “Simultaneous voltammetric sensing of levodopa, piroxicam, ofloxacin and methocarbamol using a carbon paste electrode modified with graphite oxide and β -cyclodextrin”. *Microchimica Acta* (2019) 186:174. <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3296-x>. Reproduzido com permissão da Springer Nature (Licença: 4603161236077).

6.2 Experimental

6.2.1 Material e reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico (pureza $\geq 97\%$) e foram usados como recebidos. Pó de grafite (Gr), óleo mineral, β CD, LVD, PRX, OFX e MCB foram adquiridos da Sigma-Aldrich. HNO_3 e H_2SO_4 foram adquiridos da Synth. As soluções-estoque dos fármacos foram preparadas diariamente em meio fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0). Todas as soluções foram preparadas em água ultrapura (resistividade maior que $18,0 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) fornecida por um sistema Milli-Q (Millipore®, Bedford MA). O tampão fosfato foi empregado como eletrólito suporte em todas as medidas com o β CD-FGr/CPE.

6.2.2 Instrumentação

Por favor, consultar seção “3.2.2 Instrumentação”

6.2.3 Funcionalização do Grafite

O Gr foi funcionalizado empregando uma mistura de dois ácidos, a saber, $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ (1:1 v/v). Para isto, 1,0 g de Gr e 200 mL da solução dos agentes oxidantes foram misturados em um béquer, e a mistura foi mantida sobre agitação com o auxílio de um agitador magnético durante aproximadamente 12 h à temperatura ambiente (24 ± 1 °C). Em seguida, o FGr obtido foi centrifugado, filtrado e o sólido remanescente foi lavado durante várias vezes com água ultra-pura até a obtenção de um pH entre 6,5 e 7,0. Por fim, o FGr foi seco a 90 °C por aproximadamente 10 h e armazenado (FIGURA 6.1).

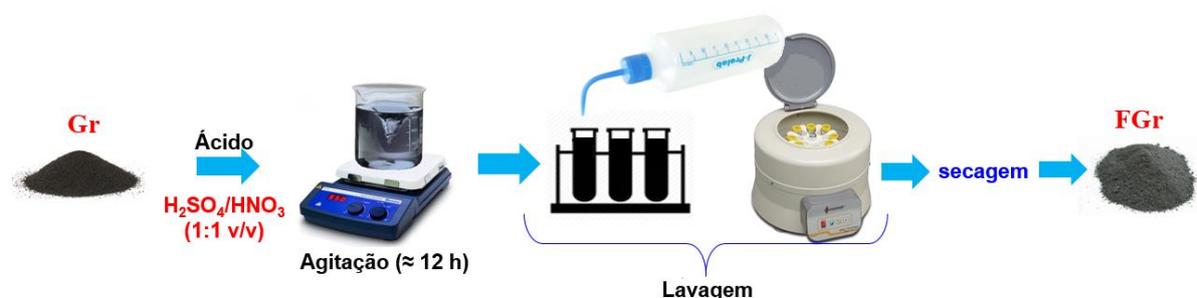


FIGURA 6.1 – Representação esquemática do processo de funcionalização do Gr.

6.2.4 Preparação do eletrodo modificado

A preparação do $\beta\text{CD-FGr/CPE}$ foi realizada pela mistura de FGr, βCD e óleo mineral em diferentes proporções. Fazendo-se isto, a melhor proporção foi de 45% (m/m) de FGr, 5% (m/m) de βCD e 50% (m/m) de óleo mineral. A pasta de carbono modificada obtida foi inserida em um tubo cilíndrico de Teflon[®], pressionada contra uma superfície lisa para compactação e, por fim polida sobre a superfície limpa e lisa de uma folha de papel. A FIGURA 6.2 representa uma visão esquemática da montagem e modificação do eletrodo.

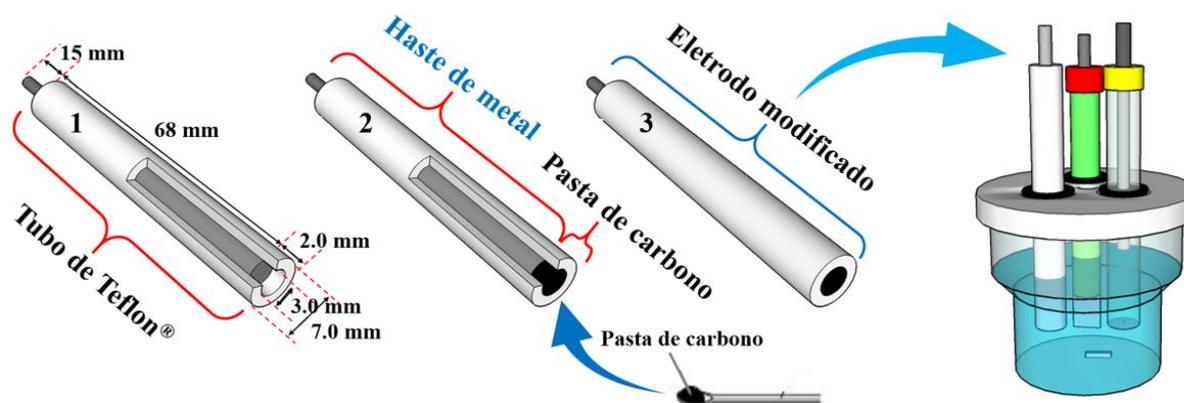


FIGURA 6.2 – Esquema do eletrodo utilizado. (1) Corte lateral do eletrodo com as respectivas camadas, (2) tubo cilíndrico de Teflon®, haste de metal e o poço para preenchimento com a pasta de carbono modificada, (3) β CD-FGr/CPE pronto para uso.

6.2.5 Preparo das amostras

As amostras de água de rio foram coletadas do Rio Monjolinho (município de São Carlos, Brasil, amostra 1 (21°59'11.0''S 47°52'52.1''W)) e do Rio Chibarro (município de Araraquara, Brasil, amostra 2 (21°48'25.0''S 48°10'21.7''W)) e as amostras de urina sintética foram preparadas como relatado por Laube *et al.*¹³². Para mais informações sobre as formas de coleta e preparo das amostras consulte, por favor, a seção “5.2.5 Preparo das amostras”.

6.2.6 Etapas analíticas

As etapas analíticas consistiram do estudo do comportamento eletroquímico das moléculas de LVD, PRX, OFX e MCB, otimização das condições experimentais, construção das curvas analíticas, estudos de repetibilidade, potenciais interferentes e análise de amostras. O comportamento eletroquímico dos analitos sobre o β CD-FGr/CPE foi investigado por voltametria cíclica em solução de tampão fosfato 0,10 mol L⁻¹ (pH = 7,0). Para propósitos de comparação, as respostas voltamétricas dos fármacos também foram estudadas sobre o FGr/CPE e Gr/CPE. Após confirmada a eletroatividade das moléculas alvo, uma série de ensaios foram realizados com o objetivo de se otimizar as

condições experimentais para os analito. Assim, foi avaliada a influência do eletrólito suporte (pH e composição) e os parâmetros experimentais da técnica de SWV, sendo estes: frequência (f), amplitude (a) e incremento de potencial (ΔE_s). Em seguida, as curvas analíticas foram construídas a partir de adições sucessivas de soluções-estoque de LVD, PRX, OFX e MCB na célula eletroquímica contendo 10,0 mL de eletrólito suporte. A partir disso, os parâmetros analíticos para a determinação dos fármacos foram obtidos, incluindo a faixa linear de resposta e o LOD. A precisão das medições do sensor voltamétrico proposto foi testada por estudos de repetibilidade intra- e inter-dias. Por fim, o procedimento proposto foi aplicado na determinação destes fármacos em amostras ambientais (água de rio) e fluído biológico sintético (urina). Ambas as amostras foram fortificadas com concentrações conhecidas de LVD, PRX, OFX e MCB e diretamente analisadas pelo procedimento proposto. Neste caso, os resultados foram reportados como porcentagem de recuperação e comparados com os resultados obtidos utilizando-se o método comparativo (UV-vis).

6.3 Resultados e Discussão

Neste trabalho, foi proposta a preparação de um eletrodo de pasta de carbono modificado com FGr e β CD. O FGr e a β CD foram selecionados como agentes modificadores devido, principalmente, às suas vantagens analíticas e eletroquímicas que já foram reportadas anteriormente em outros trabalhos, como melhora de sinal analítico (maiores magnitudes de corrente de pico), elevada sensibilidade analítica e baixos limites de detecção¹⁸²⁻¹⁸⁶. Além disso, o uso destes materiais se destaca, principalmente, pela praticidade no preparo do sensor e no seu baixo custo, tendo em vista que são materiais relativamente baratos e de fácil aquisição.

6.3.1 Caracterização morfológica e química do Gr e FGr

Inicialmente, foram investigadas a morfologia superficial do Gr (sem modificação) e do FGr. Na FIGURA 6.2 estão representadas as imagens de SEM do (A) Gr e do (B) FGr. Como pode ser observado, após a funcionalização do Gr houve uma esfoliação da superfície do material, devido ao surgimento de grupos funcionais oxigenados (ex: grupos carboxila, hidroxila e epóxi)^{182,187}, levando à formação do FGr. Além disso, o Gr e o FGr foram avaliados por análise de molhabilidade, no qual mediu-se o ângulo de contato para cada material utilizando água ultrapura. Ao analisar as FIGURAS 6.2 (C) e (D), é possível notar que o ângulo de contato diminuiu após o procedimento de funcionalização do Gr de $(66 \pm 2)^\circ$ no caso do Gr para $(51 \pm 1)^\circ$ no caso do FGr, mostrando um aumento na molhabilidade ou hidroflicidade do material funcionalizado devido à inserção de espécies oxigenadas no material. Além disso, o Gr e FGr também foram caracterizados por EDS, a fim de se obter informações sobre a porcentagem de carbono e oxigênio presentes nesses materiais. Assim, na FIGURA 6.3E (i) e (ii) pode ser observado que o FGr apresentou um aumento na porcentagem relativa de oxigênio quando comparado ao Gr, isso se explica devido aos grupos oxigenados inseridos no material de Gr após o tratamento ácido.

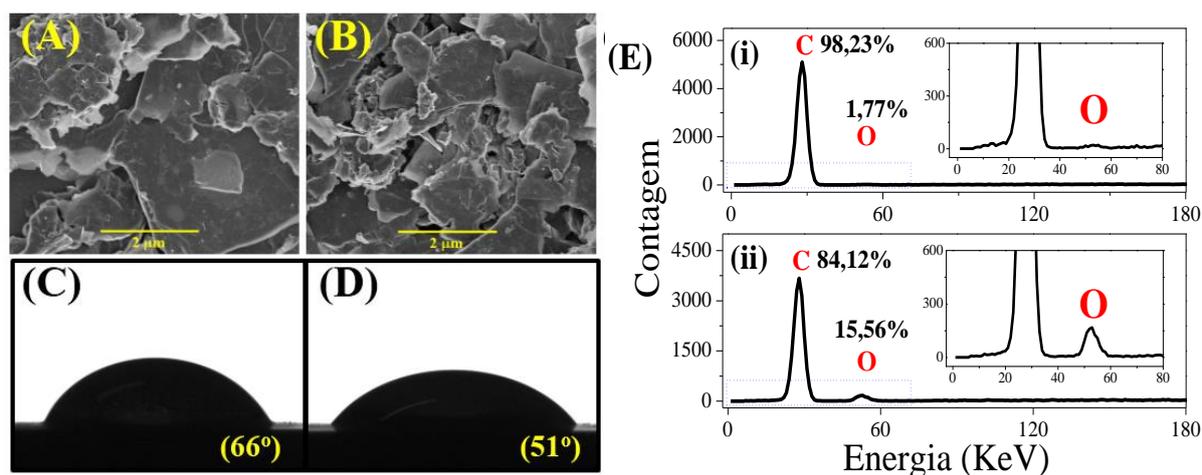


FIGURA 6.3 – Imagem de SEM obtida para (A) Gr; (B) FGr sintetizado; ângulo de contato com água para: (C) Gr, (D) FGr e (E) espectros de EDS correspondentes ao (i) Gr e (ii) FGr.

Em seguida, foi avaliada a dispersibilidade do Gr e do FGr em água ultrapura. Sendo assim, quando se utilizou o FGr houve a formação de uma dispersão estável em água devido a incorporação de grupos funcionais (após o tratamento oxidativo do Gr)¹⁸⁷. Na FIGURA 6.4 são apresentadas as dispersões de Gr e FGr em água ultrapura após (A) 0, (B) 30 e (C) 60 min e, como pode ser observado a dispersão de FGr permaneceu estável por mais tempo que o Gr. Demonstrando assim, o maior grau de hidrofilicidade do FGr como era de se esperar devido ao processo de funcionalização a qual o material foi submetido.

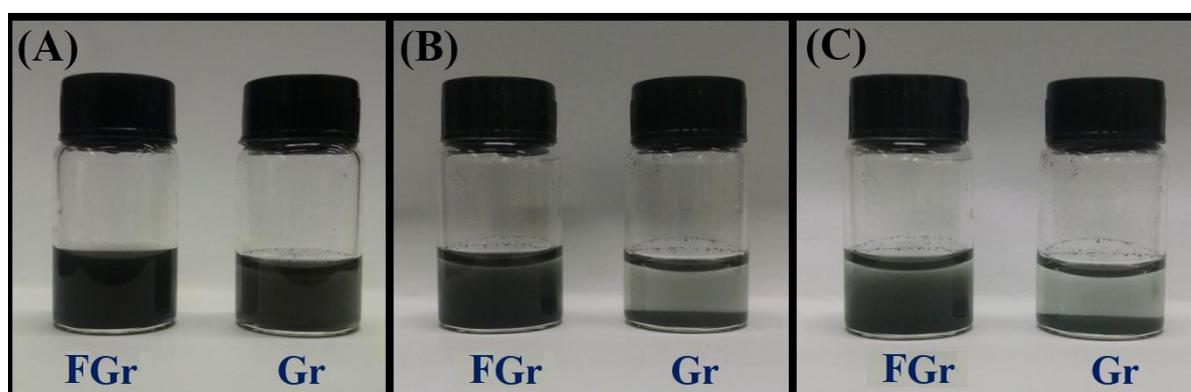


FIGURA 6.4 – Dispersões de FGr e Gr em água ultrapura após (A) 0, (B) 30 e (C) 60 min.

6.3.2 Caracterização eletroquímica do β CD-FGr/CPE

Para análise das características eletroquímicas e da área eletroativa para as diferentes modificações, foram realizados estudos de voltametria cíclica na faixa de velocidades de varredura de potencial de 10 a 400 mV s^{-1} utilizando como sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 0,50 mmol L^{-1} em KCl 0,1 mol L^{-1} como eletrólito suporte.

Na FIGURA 6.5A-C estão representados os perfis voltamétricos do CPE contendo as diferentes modificações, a saber, Gr, FGr ou β CD-FGr, respectivamente. Como pode ser visto, a resposta eletroquímica da sonda redox sofreu alterações após cada etapa de modificação. Assim, após a funcionalização do Gr obtendo o FGr e, posteriormente, com a incorporação da β CD (β CD-FGr), a cinética de transferência de elétrons foi melhorada, conforme demonstrado a partir da diminuição da separação dos potenciais de pico obtida entre os potenciais de pico anódico e catódico (ΔE_p). Por outro lado, além da cinética de transferência de elétrons melhorada, as correntes de pico anódica (I_{pa}) e catódica (I_{pc}) também aumentaram após cada modificação ($\text{Gr} < \text{FGr} < \beta\text{CD-FGr}$). Estes resultados sugerem que a área eletroativa da superfície do sensor foi aumentada a partir de cada modificação. Assim, a dependência da I_p vs. $v^{1/2}$ foi explorada.

Como pode ser observado na FIGURA 6.5D, os coeficientes angulares obtidos para as curvas de I_p vs. $v^{1/2}$ para o processo de oxidação do $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ foram de $2,04 \times 10^{-5} \text{ A V}^{-1/2} \text{ s}^{1/2}$ para o Gr/CPE, $3,38 \times 10^{-5} \text{ A V}^{-1/2} \text{ s}^{1/2}$ para o FGr/CPE e $6,80 \times 10^{-5} \text{ A V}^{-1/2} \text{ s}^{1/2}$ para o β CD-FGr/CPE, respectivamente. Assim, as áreas eletroativas para as diferentes modificações foram estimadas de acordo com a equação de Randles-Sevcik (Eq. 3.2). Desta forma, as áreas eletroativas estimadas foram de 0,047, 0,092 e 0,18 cm^2 , para o Gr/CPE, FGr/CPE e β CD-FGr/CPE, respectivamente. A partir desses resultados, foi possível concluir que a resposta eletroquímica ao $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ foi claramente afetada pelo material imobilizado na confecção do

sensor eletroquímico. Assim, a combinação da β CD e do FGr levou a um aumento da área eletroativa em 3,8 vezes quando comparado ao Gr/CPE (eletrodo base).

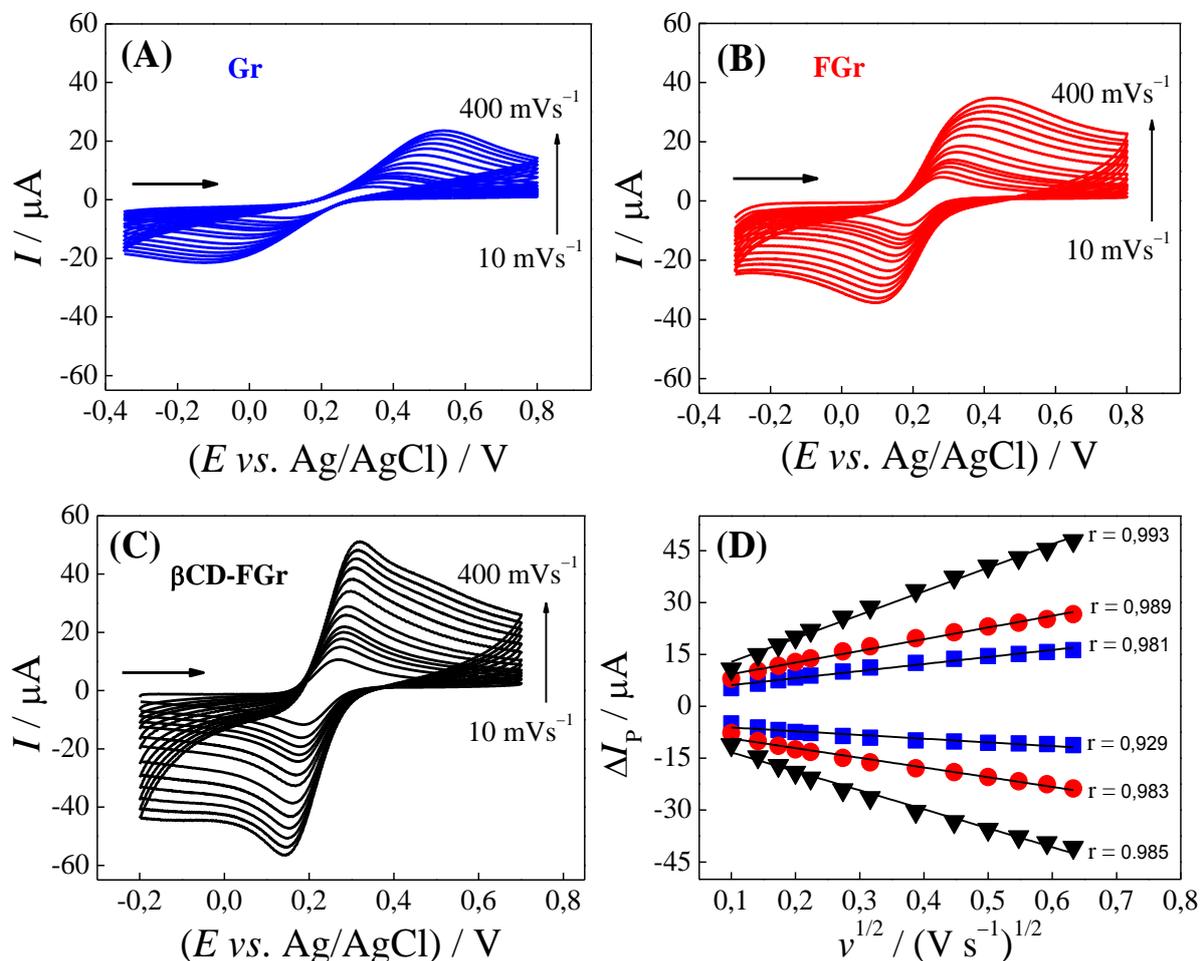


FIGURA 6.5 – Voltamogramas cíclicos obtidos para $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução de KCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ com (A) Gr/CPE, (B) FGr/CPE e (C) β CD-FGr/CPE em diferentes velocidades de varredura de potenciais (10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350 e 400 mV s^{-1}). (D) Gráficos de I_p vs. $v^{1/2}$.

Por fim, para calcular a constante heterogênea de transferência de elétrons (k^0), foi empregando o método de Nicholson¹⁸⁸, que é frequentemente utilizado para sistemas *quasi*-reversíveis controlados por difusão. Assim, o valor de k^0 pode ser obtido utilizando-se a Eq. 6.1:

$$\Psi = k^0 [\pi D n v F / (R T)]^{-1/2} \quad \text{Eq. 6.1}$$

sendo Ψ o parâmetro cinético, k^0 a constante heterogênea de transferência de elétrons (cm s^{-1}), $\pi = 3,1415$, F a constante de Faraday (96485 C mol^{-1}), R a constante universal dos gases ($8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) e T a temperatura termodinâmica ($298,15 \text{ K}$), e os demais termos já foram definidos anteriormente (Eq. 3.2). Os valores de Ψ foram obtidos utilizando as Eq. 6.2 ou 6.3 propostas por Lavagnini *et al.*¹⁸⁹ que correlaciona o valor de Ψ com a ΔE_p .

$$\Psi = (-0,6288 + 0,0021n\Delta E_p)/(1 - 0,017n\Delta E_p) \quad \text{Eq. 6.2}$$

$$\Psi = 2,18 [\beta/\pi]^{1/2} \exp[-(\beta^2 F/RT)n\Delta E_p] \quad \text{Eq. 6.3}$$

sendo β o coeficiente de transferência de carga. Assim, a Eq. 6.2 é utilizada quando $n \times \Delta E_p < 200 \text{ mV}$, enquanto a Eq. 6.3 é empregada quando $n \times \Delta E_p > 200 \text{ mV}$.

Em seguida, com base nos valores calculados para Ψ , a relação entre Ψ vs. $([\pi D n F/(R T)]^{-1/2})$ ou $(32,79 \text{ v}^{-1/2})$ foi obtida, sendo então determinado o valor de k^0 . A equação da reta (Eq. 6.4 – 6.6) obtida para cada eletrodo foi:

$$\Psi = -0,023 + 0,00031 \text{ v}^{-1/2} \quad (r = 0,996) \quad \text{Eq. 6.4}$$

$$\Psi = -0,15 + 0,0023 \text{ v}^{-1/2} \quad (r = 0,999) \quad \text{Eq. 6.5}$$

$$\Psi = -0,036 + 0,0033 \text{ v}^{-1/2} \quad (r = 0,998) \quad \text{Eq. 6.6}$$

Portanto, ao usar essas equações, o coeficiente angular da equação da reta representa, diretamente, o valor obtido de k^0 , que neste caso foram iguais a $3,1 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$ para Gr/CPE; $2,3 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$ para FGr/CPE e $3,3 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$ para β CD-FGr/CPE. Assim, o k^0 obtido para o β CD-FGr/CPE foi cerca de 11 vezes maior que a obtida para o Gr/CPE e 1,4 vezes maior do que a do FGr/CPE. Indicando assim, uma melhora na velocidade de transferência eletrônica para o β CD-FGr/CPE quando comparado ao demais eletrodos.

6.3.3 Comportamento eletroquímico de LVD, PRX, OFX e MCB

Inicialmente, o comportamento eletroquímico dos compostos LVD, PRX, OFX e MCB foram obtidos utilizando a CV e, em todos os casos, não foi observado nenhum processo de redução no sentido catódico de varredura de potencial, o que caracteriza um processo de transferência de carga irreversível para esses analitos (FIGURA 6.6A). Porém, devido à grande corrente capacitiva obtida por estes eletrodos optou-se por realizar a caracterização utilizando a SWV. Assim, na FIGURA 6.6B é mostrada a resposta voltamétrica (SWV) obtida para a determinação simultânea de 0,1 mmol L⁻¹ LVD, 0,2 mmol L⁻¹ PRX, 0,1 mmol L⁻¹ OFX e 0,2 mmol L⁻¹ MCB em tampão fosfato 0,1 mmol L⁻¹ (pH 7,0) utilizando diferentes eletrodos (Gr/CPE, FGr/CPE e βCD-FGr/CPE).

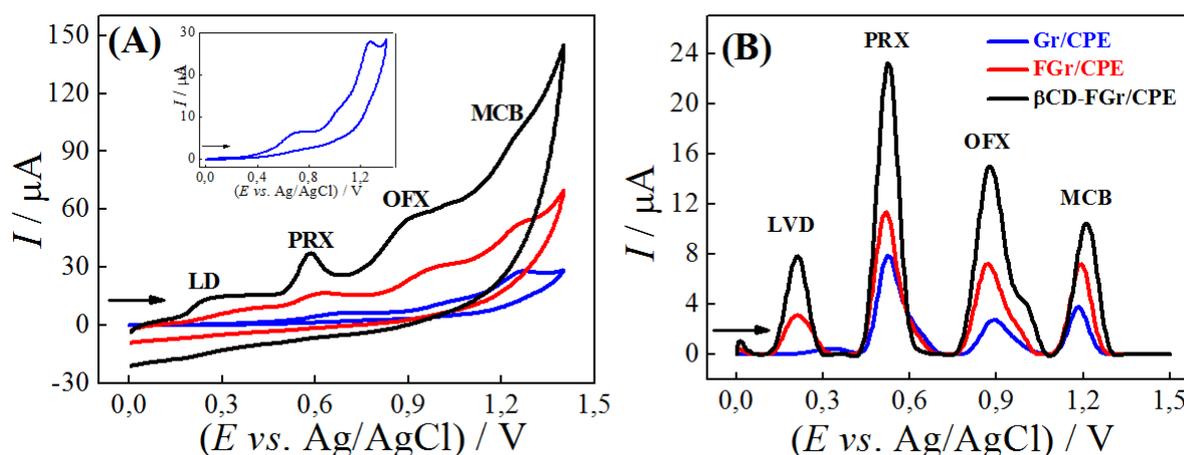


FIGURA 6.6 – Voltamogramas obtidos usando Gr/CPE (—), FGr/CPE (—) e βCD-FGr/CPE (—) em solução de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH = 7,0). (A) CV contendo 0,50 mmol L⁻¹ (LVD, OFX e MCB) e 2,0 mmol L⁻¹ (PRX). $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$. (B) SWV contendo 0,10 mmol L⁻¹ de LVD e OFX e 0,2 mmol L⁻¹ PRX e MCB. Parâmetros da SWV: $f = 20 \text{ Hz}$, $a = 75 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$.

Como pode ser observado na FIGURA 6.6B, todos os analitos apresentaram processo de oxidação bem definidos para os diferentes eletrodos utilizados, exceto a LVD empregando o eletrodo Gr/CPE. Os potenciais de

oxidação obtidos utilizando-se os diferentes eletrodos foram: LVD (+0,210 V), PRX (+0,523 V), OFX (+0,878 V) e MCB (+1,211 V).

Adicionalmente, para todos os compostos a utilização do sensor β CD-FGr/CPE resultou em uma magnitude de corrente de pico (I_{pa}) de 7,84 μ A (LVD), 23,2 μ A (PRX), 15,0 μ A (OFX) e 10,5 μ A (MCB), para o Gr/CPE foi de 0,430 μ A (LVD), 7,88 μ A (PRX), 2,74 μ A (OFX) e 3,77 μ A (MCB) e para o FGr/CPE 3,09 μ A (LVD), 11,4 μ A (PRX), 7,22 μ A (OFX) e 7,22 μ A (MCB). Desta forma, os melhores resultados foram obtidos empregando o β CD-FGr/CPE devido ao efeito sinérgico entre o aumento da condutividade do FGr e a capacidade de adsorção da β CD^{190,191}. Ou seja, quando se utilizou o β CD-FGr/CPE, a magnitude do sinal de corrente de pico aumentou 18,2 vezes para LVD, 2,95 vezes para PRX, 5,48 vezes para OFX e 2,78 vezes para MCB, em comparação com o Gr/CPE.

6.3.4 Otimização do método

Durante a etapa de otimização do método eletroanalítico, os seguintes parâmetros foram avaliados: pH da solução; composição do eletrólito suporte e os parâmetros que influenciam a SWV.

Assim, o efeito do pH do eletrólito suporte na oxidação simultânea de LVD, PRX, OFX e MCB foi avaliado usando tampão fosfato 0,10 mol L⁻¹ (pH variando de 3,0 a 8,0). Na FIGURA 6.7 são apresentados os voltamogramas de SW obtidos empregando o β CD-FGr/CPE contendo 0,10 mmol L⁻¹ de LVD, PRX, OFX e 0,30 mmol L⁻¹ de MCB. Analisando-se os voltamogramas da FIGURA 6.7 podemos notar que a concentração hidrogeniônica afetou diretamente a resposta voltamétrica das moléculas. No entanto, uma vez que diferentes mecanismos de oxidação com grau de complexidade variável estão envolvidos em cada caso, foram observadas relações lineares entre a dependência do potencial de pico (E_p) em relação ao pH (E_p vs. pH) apenas para LVD, PRX e OFX (gráficos inseridos na FIGURA 6.7). Estas relações lineares obedeceram às seguintes equações de

regressão linear, Eqs. 6.7-6.9, enquanto que para o MCB não foi visto, conforme Eq. 6.10:

$$\text{LVD: } E_p = 0,60 - 0,058\text{pH}, r = 0,994 \quad \text{Eq. 6.7}$$

$$\text{PRX: } E_p = 0,72 - 0,026\text{pH}, r = 0,993 \quad \text{Eq. 6.8}$$

$$\text{OFX: } E_p = 1,26 - 0,053\text{pH}, r = 0,968 \quad \text{Eq. 6.9}$$

$$\text{MCB: } E_p = 1,3 - 0,010\text{pH}, r = 0,861 \quad \text{Eq. 6.10}$$

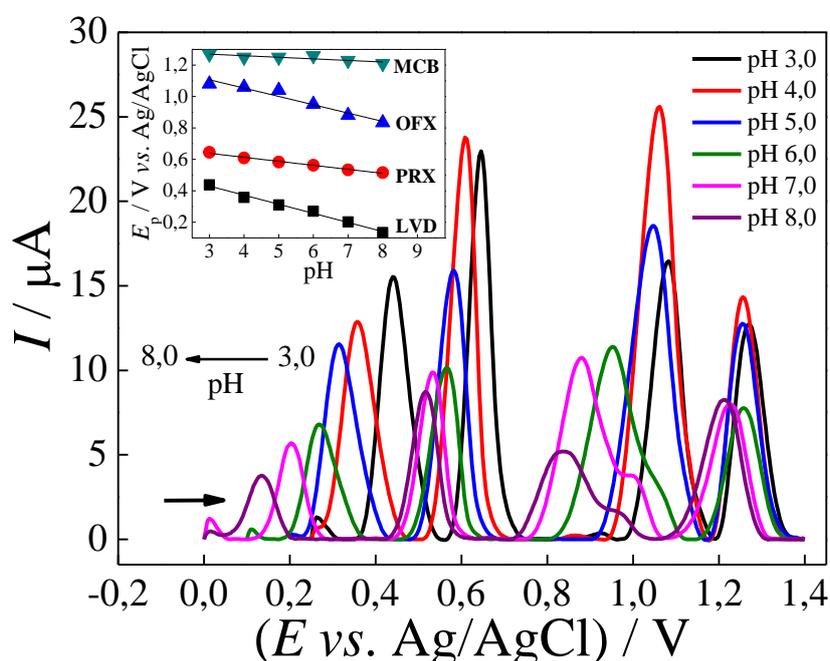
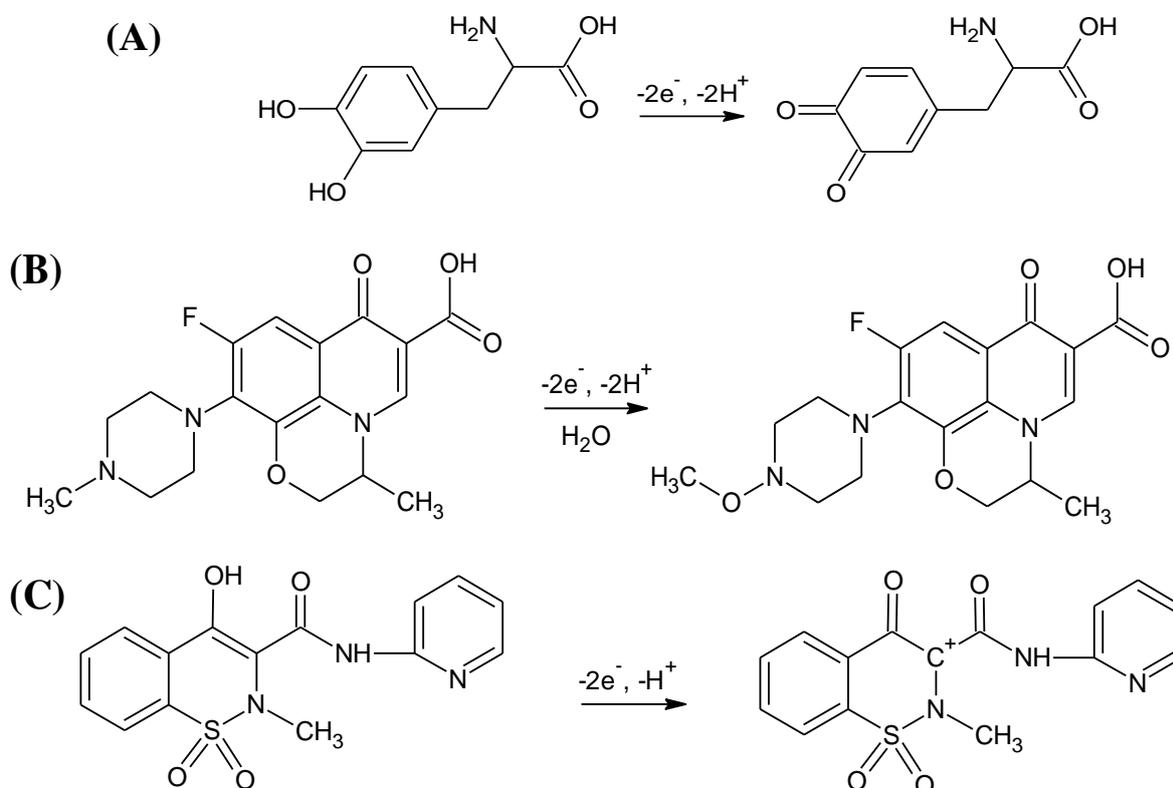


FIGURA 6.7 – SWV obtidos em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes pHs (3,0 – 8,0) contendo $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ de LVD, PRX, OFX e $0,30 \text{ mmol L}^{-1}$ de MCB usando o $\beta\text{CD-FGr/GCE}$. Inserido: gráficos de E_p vs. pH.

Assim, os valores de potenciais de pico registrados para a eletrooxidação de LVD e OFX mudaram linearmente com o pH com coeficientes angulares de $-0,058 \text{ V pH}^{-1}$ e $-0,053 \text{ V pH}^{-1}$, respectivamente. Estes coeficientes angulares foram próximos do valor teórico Nernstiano de $-0,0592 \text{ V pH}^{-1}$ típico para reações redox envolvendo o mesmo número de elétrons e prótons. Estas constatações estão de acordo com trabalhos anteriores envolvendo a eletrooxidação da LVD^{192,193} e OFX¹⁹⁴, que relataram a perda de dois elétrons e

dois prótons. Por outro lado, o coeficiente angular de $-0,026 \text{ V pH}^{-1}$ foi obtido no caso do PRX. Este coeficiente angular também é consistente com o coeficiente angular teórico de Nernst de $-0,0296 \text{ V pH}^{-1}$ para reações redox envolvendo uma razão entre o número de elétrons e prótons igual a 2:1. Assim, a reação de eletrooxidação para PRX envolveu um número de elétrons duas vezes maior que o número de prótons. Esta informação também está de acordo com outros trabalhos descritos anteriormente para o PRX¹⁹⁵⁻¹⁹⁷. Por fim, embora o potencial de pico do processo de oxidação do MCB apresenta oscilações através dos diferentes pHs, não foi possível observar uma dependência linear neste caso. Sendo assim, inviabilizando qualquer tipo de relação, o que também foi verificado em outro trabalho reportado pelo grupo¹⁹⁸. Desta forma, as possíveis reações de eletrooxidação propostas para cada molécula encontram-se representadas no Esquema 6.1.



Esquema 6.1 - Possíveis reação de eletrooxidação proposta para a molécula de (A) LVD, (B) OFX e (C) PRX, respectivamente.

Em relação às correntes de pico (FIGURA 6.7), os máximos de corrente de pico foram observados na estreita faixa de pH de 3,0 a 5,0. Considerando que a maior parte dos analitos apresentou uma maior magnitude de corrente de pico em pH = 4,0, este foi o pH selecionado do eletrólito de suporte. Desta forma, o efeito da composição do eletrólito suporte foi investigada usando tampão fosfato, acetato e BR 0,10 mol L⁻¹. Assim, como pode ser observado na FIGURA 6.8, a melhor definição de pico (largura e repetibilidade) para todos os analitos e, maior magnitude de corrente de pico para o MCB (analito com potencial de pico mais positivo), foi obtida utilizando-se o eletrólito suporte solução fosfato (pH 4,0). Desta forma, tendo em vista o comportamento eletroquímico do MCB e o objetivo de se obter os melhores parâmetros possíveis, optou-se por utilizar como eletrólito suporte a solução de meio fosfato 0,10 mol L⁻¹ (pH 4,0), mesmo este apresentando baixa capacidade tamponante neste valor de pH^{144,199}.

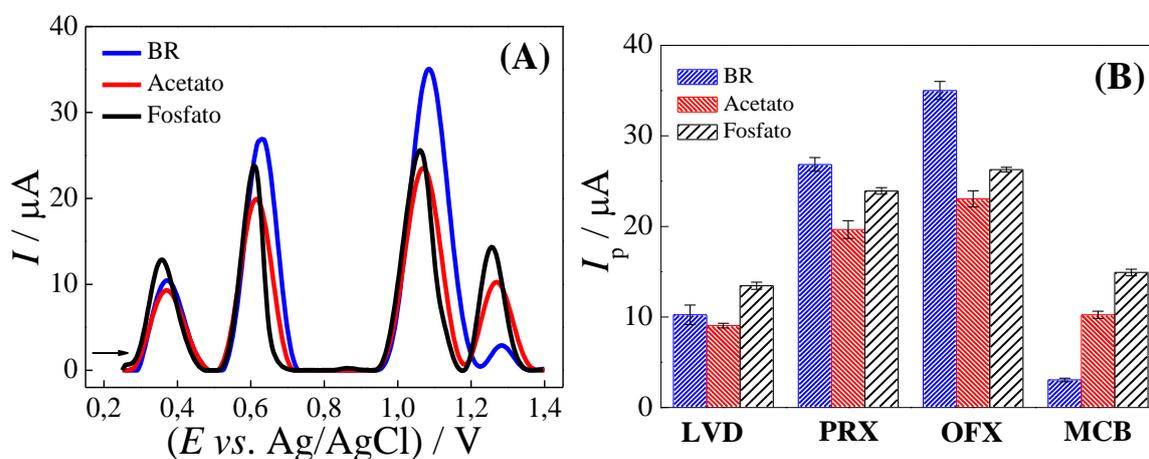


FIGURA 6.8 – (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos em diferentes eletrólitos suporte 0,10 mol L⁻¹ pH 4,0 (BR, acetato e fosfato) contendo 0,10 mmol L⁻¹ de LVD, PRX, OFX e 0,30 mmol L⁻¹ de MCB. Parâmetros da SWV: $f = 70$ Hz, $A = 50$ mV e $\Delta E_s = 5$ mV. (B) Gráfico de I_p vs. Analito para as diferentes soluções de eletrólito suporte.

A determinação voltamétrica destes compostos foi realizada utilizando a técnica de SWV. Assim, os parâmetros experimentais frequência (f), amplitude (a) e incremento de potencial (ΔE_s) desta técnica foram otimizados. Os ensaios de otimização foram conduzidos empregando uma concentração de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de LVD, PRX, OFX e MCB em meio fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0). Os intervalos avaliados foram de $10 \text{ Hz} \leq f \leq 100 \text{ Hz}$, $10 \text{ mV} \leq a \leq 100 \text{ mV}$ e $1,0 \text{ mV} \leq \Delta E_s \leq 10 \text{ mV}$. Os valores ótimos obtidos para esses parâmetros foram: $f = 20 \text{ Hz}$, $a = 70 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$. A otimização levou em consideração a magnitude do sinal analítico, a repetibilidade e a estabilidade da linha de base utilizando o $\beta\text{CD-FGr/CPE}$.

6.3.5 Determinação simultânea de LVD, PRX, OFX e MCB

Inicialmente, para avaliar a possibilidade da determinação simultânea de LVD, PRX, OFX e MCB por SWV, foram obtidas curvas analíticas de um analito na presença dos demais, ou seja, construiu-se uma curva analítica para cada analito, enquanto os demais foram mantidos em uma determinada concentração fixa (FIGURA 6.9). Este estudo é realizado para avaliar a possível interferência mútua entre os analitos sob investigação. Assim, a curva analítica para a determinação de LVD foi construída fixando-se as concentrações de PRX, OFX e MCB em $7,0$, $10,0$ e $25,0 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto a concentração de LVD foi variada na faixa de $1,0$ a $20,0 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$. Como pode ser visto na FIGURA 6.9A, a corrente de pico (I_p) para LVD aumentou proporcionalmente de forma linear com a concentração ($r = 0,997$), enquanto para os sinais de corrente obtidos para os demais analitos permaneceram praticamente constantes com valores de $\text{RSD} \leq 6,01\%$. Em seguida, a concentração de PRX foi variada de $1,0$ a $15,0 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ e a concentração dos outros analitos mantida constante a $10,0$ (LVD), $10,0$ (OFX) e $25,0 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ (MCB). A I_p para PRX também aumentou regularmente com a sua concentração ($r = 0,997$) e o RSDs para LVD, OFX e MCB foram iguais a $3,62$, $5,25$ e $8,61\%$, respectivamente (FIGURA 6.9B). Subsequentemente, a

concentração de OFX foi variada na faixa de 1,0 a 20,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com uma concentração fixa de 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de LVD, 7,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de PRX e 25,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de MCB, tal como apresentado na FIGURA 6.9C. Finalmente, a curva analítica para MCB foi obtida na faixa de 1,0 a 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ mantendo-se a concentração de LVD, PRX e OFX em 10,0, 7,0 e 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Da mesma forma, o sinal analítico para o MCB foi linearmente dependente de sua concentração ($r = 0,996$) e o RSD foi de 3,35% (LVD), 6,82% (PRX) e 4,39% (OFX) (FIGURA 6.9D). Portanto, foi possível concluir que a mistura dos quatro analitos poderia ser determinada simultaneamente por SWV e pelo sensor eletroquímico proposto sem complicações práticas relacionadas a possíveis interferências entre si.

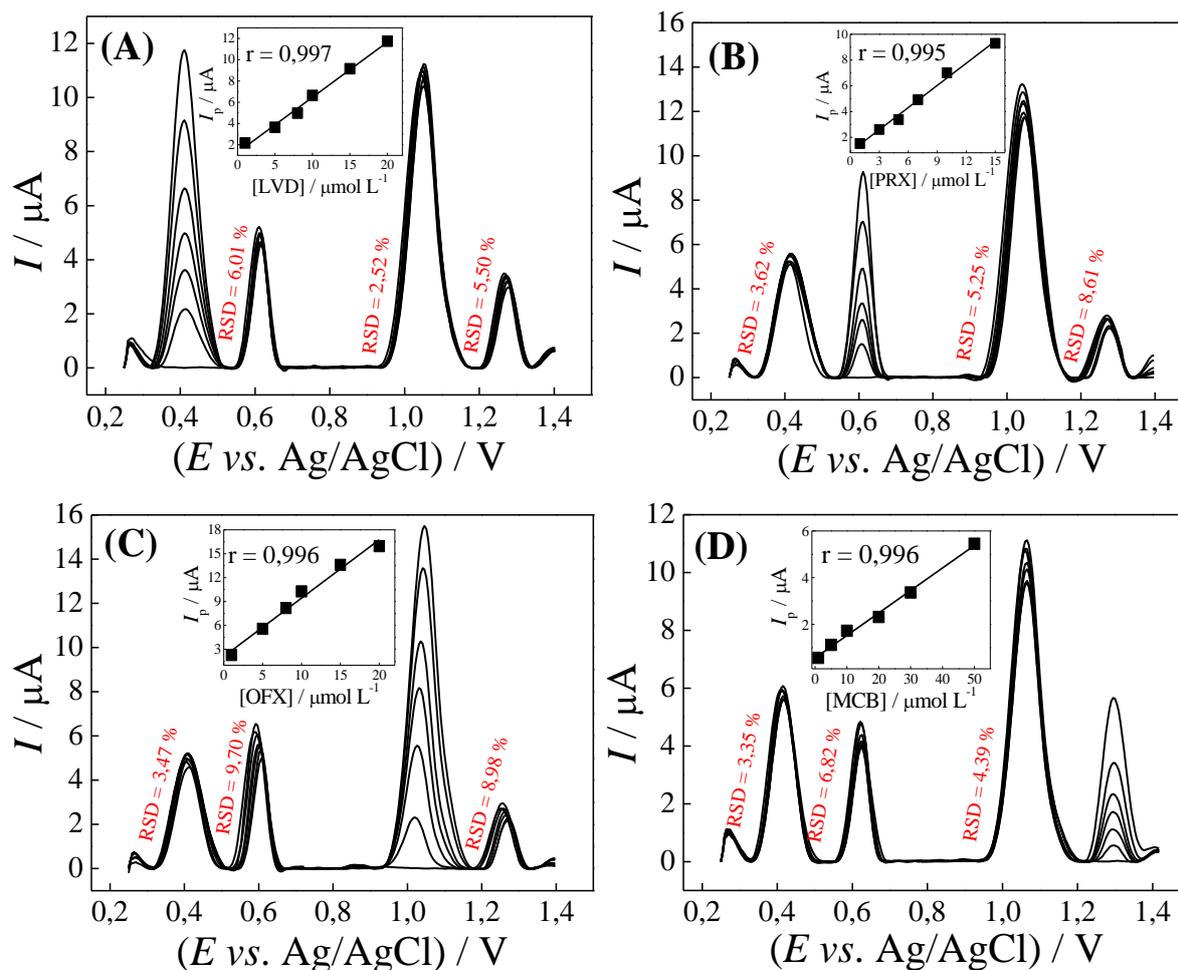


FIGURA 6.9 – Voltamogramas de SW obtidos utilizando o $\beta\text{CD-FGr/CPE}$ para várias concentrações de: **(A)** LVD (1,0 a 20,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) a uma concentração fixa de PRX (7,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$), OFX (10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e MCB (25,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$); **(B)** PRX (1,0 a 15,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) a uma concentração fixa de LVD (10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$), OFX (10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e MCB (25,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$); **(C)** OFX (1,0 a 20,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) a uma concentração fixa de LVD (10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$), PRX (7,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e MCB (25,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e **(D)** MCB (1,0 a 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) a uma concentração fixa de LVD (10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$), PRX (7,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e OFX (10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Eletrólito suporte: meio fosfato 0,10 mol L^{-1} (pH 4,0). Parâmetros da SWV: $f = 20 \text{ Hz}$, $a = 70 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$. Curvas analíticas (inseridas).

Em seguida, a determinação simultânea de LVD, PRX, OFX e MCB foi realizada por SWV utilizando o $\beta\text{CD-FGr/CPE}$ em meio fosfato 0,10 mol L^{-1} (pH 4,0). Nas FIGURAS 6.10A-E são apresentados os voltamogramas de SW

para a determinação simultânea dos analitos e os respectivas curvas analíticas obtidas. As equações de regressão linear associadas às curvas analíticas foram:

$$I_p (\mu\text{A}) = 1,33 + 0,550 [\text{LVD}] (\mu\text{mol L}^{-1}) (r = 0,996) \quad \text{Eq. 6.11}$$

$$I_p (\mu\text{A}) = 0,628 + 0,551 [\text{PRX}] (\mu\text{mol L}^{-1}) (r = 0,998) \quad \text{Eq. 6.12}$$

$$I_p (\mu\text{A}) = 2,59 + 0,699 [\text{OFX}] (\mu\text{mol L}^{-1}) (r = 0,995) \quad \text{Eq. 6.13}$$

$$I_p (\mu\text{A}) = 0,401 + 0,0751[\text{MCB}] (\mu\text{mol L}^{-1}) (r = 0,995) \quad \text{Eq. 6.14}$$

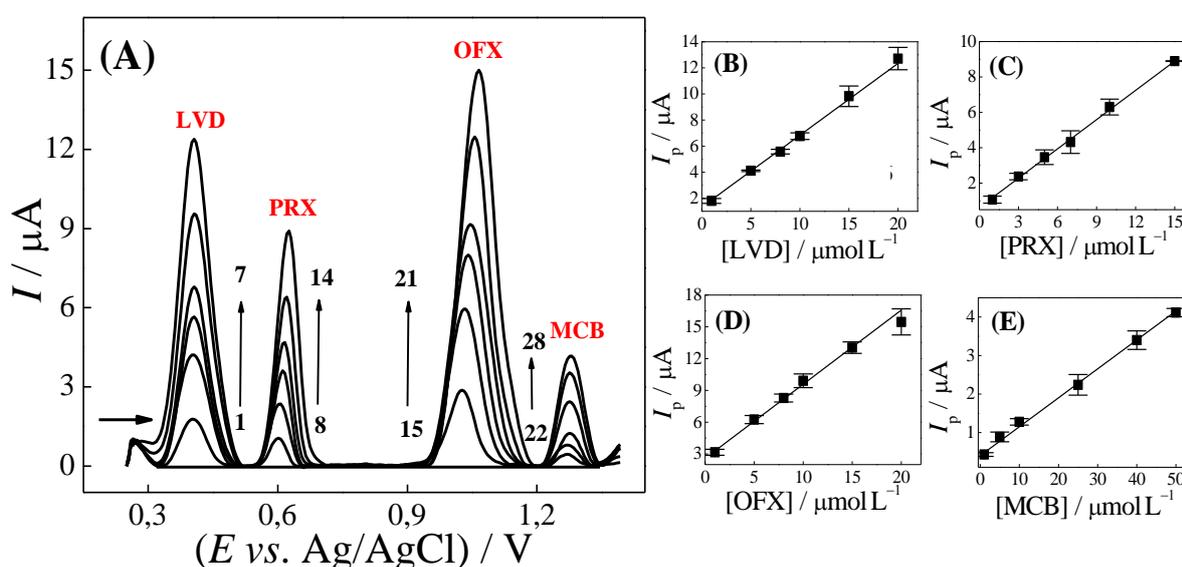


FIGURA 6.10 – Voltamogramas de SW registrados em solução de meio fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 4,0$) contendo diferentes níveis de concentração de (A) LVD (1-7: 0; 1,0; 5,0, 8,0; 10; 15 e $20 \mu\text{mol L}^{-1}$), PRX (8-14: 0; 1,0; 3,0; 5,0; 7,0; 10 e $15 \mu\text{mol L}^{-1}$), OFX (15-21: 0; 1,0; 5,0; 8,0; 10; 15 e $20 \mu\text{mol L}^{-1}$), MCB (22-28: 0; 1,0; 5,0; 10; 25; 40 e $50 \mu\text{mol L}^{-1}$) utilizando o $\beta\text{CD-FGr/CPE}$. Curva analítica obtida para (B) LVD, (C) PRX, (D) OFX e (E) MCB. Condições da técnica de SWV: $f = 20 \text{ Hz}$, $a = 70 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$.

Como pode ser visto na TABELA 6.1, as curvas analíticas obtidas foram lineares nas faixas de concentração de $1,0$ a $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ para LVD, de $1,0$ a $15,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ para PRX, de $1,0$ a $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ para OFX e de $1,0$ a $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ para MCB, com LODs de $0,065$, $0,105$, $0,089$ e $0,398 \mu\text{mol L}^{-1}$,

respectivamente. Até o presente momento nenhum procedimento voltamétrico dedicado à determinação simultânea de LVD, PRX, OFX e MCB foi reportado.

TABELA 6.1 – Parâmetros analíticos registrados para a determinação simultânea de LVD, PRX, OFX e MCB usando SWV e o sensor proposto

Analito	Parâmetros analíticos		
	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Coefficiente de correlação (r)
LVD	1,0 – 20	0,065	0,996
PRX	1,0 – 15	0,105	0,998
OFX	1,0 – 20	0,089	0,995
MCB	1,0 – 50	0,398	0,995

$n = 3$.

6.3.6 Estudos de repetibilidade, seletividade e estabilidade

Os estudos de repetibilidade e seletividade do sensor $\beta\text{CD-FGr/CPE}$ foram conduzidos usando-se concentrações de $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de LVD, $7,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de PRX, $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de OFX e $25,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de MCB em meio fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 4,0$). Para avaliar a repetibilidade do método, foram realizados estudos de repetibilidade intra-dia ($n = 5$) e inter-dia ($n = 3$). Sendo assim, os valores de RSD obtidos para análise intra-dia foram de 1,45% (LVD), 1,41% (PRX), 3,34% (OFX) e 4,20% (MCB), e para as análises inter-dia o procedimento apresentou valores de RSD de 4,82%, 2,32%, 4,26% e 5,88% para LVD, PRX, OFX e MCB, respectivamente. Os valores de RSD obtidos indicaram a excelente precisão do método analítico empregando o sensor $\beta\text{CD-FGr/CPE}$ para a detecção simultânea de LVD, PRX, OFX e MCB.

Os estudos de seletividade foram realizados na presença de diferentes potenciais interferentes (cátions, ânions e compostos orgânicos) na razão de concentração de 1:10 (analito: potencial interferente). Como pode ser visto na

TABELA 6.2, os valores de Erro (%) obtidos ficaram entre $-5,2\%$ e $+4,1\%$ em todos os casos, indicando a elevada seletividade do sensor β CD-FGr/CPE para determinação destes fármacos na presença destes potenciais interferentes até a proporção avaliada.

TABELA 6.2 – Efeito de possíveis interferentes na determinação voltamétrica de LVD, PRX, OFX e MCB em meio fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0) usando o sensor β CD-FGr/CPE

Possíveis interferentes	Erro (%) ^a			
	LVD	PRX	OFX	MCB
Cd ²⁺ , Pb ²⁺ e Ni ²⁺	2,1	1,0	-1,3	-3,1
Ca ²⁺ e Mg ²⁺	1,3	1,6	2,1	1,8
Na ⁺ e K ⁺	-1,2	-1,9	2,2	-3,4
CO ₃ ²⁻ , SO ₄ ²⁻ e PO ₄ ³⁻	3,0	-2,2	-1,1	4,1
Cl ⁻ , NO ₃ ⁻ e HCO ₃ ⁻	-2,4	-1,7	0,5	-3,7
Cafeína	0,3	1,3	-1,1	2,7
Ureia	-0,7	1,9	2,4	1,7
Ácido Úrico	2,5	3,3	-1,2	-2,1
Ácido Ascórbico	0,8	-1,1	1,4	0,7
Ácido Fúlvico	-3,8	-2,7	-4,1	-2,9
Ácido Húmico	-3,2	-2,2	-3,9	-5,2

^aErro (%) = [(Sinal analito_{presença} - Sinal analito_{ausência}) / Sinal analito_{ausência}] × 100%.

Adicionalmente, a estabilidade do β CD-FGr/CPE foi avaliada monitorando a sua resposta analítica na presença de $6,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de LVD, $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de PRX, $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de OFX e $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ de MCB em meio fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0) durante 15 dias (20 medições neste período). Após esse tempo, a resposta da corrente de pico anódica diminuiu para 86,0, 76,0, 82,4

e 77,3% para LVD, PRX, OFX e MCB, respectivamente. Esta estabilidade pode ser atribuída à compatibilidade entre a β CD e o FGr na pasta de carbono. Além disso, vale ressaltar que a resposta do sensor pode ser recuperada com um simples polimento do sensor em papel limpo e liso.

6.3.7 Determinação simultânea de LVD, PRX, OFX e MCB em amostras de água de rio e urina sintética

Por fim, a determinação simultânea de LVD, PRX, OFX e MCB em amostras de água de rio e urina sintética foi realizada pelo método eletroanalítico aqui proposto. Assim, duas concentrações diferentes de cada analito foram utilizadas e as porcentagens de recuperação calculadas a partir das concentrações encontradas aplicando-se o método de interpolação na curva analítica. Como pode ser observado na TABELA 6.3, os percentuais de recuperação obtidos foram bastante satisfatórios, variando de 92,4 a 110%. As amostras também foram analisadas por um método comparativo (método espectrofotométrico UV-Vis), e o Erro (%) entre esses dois procedimentos variou de -11,6 a 13,4%. Além disso, os resultados obtidos pelos dois métodos também foram comparados estatisticamente aplicando-se o teste- t pareado a um nível de confiança de 95%. Fazendo isto, o $t_{\text{experimental}}$ (0,24) foi menor que o valor de $t_{\text{crítico}}$ (2,06) podendo então, se concluir que não houve diferença estatística entre os resultados obtidos empregando os dois procedimentos de análise. Demonstrando assim, que o método proposto pode ser aplicado com sucesso para a determinação individual ou simultânea de LVD, PRX, OFX e MCB em diferentes amostras utilizando o método proposto.

TABELA 6.3 – Resultados obtidos para a determinação simultânea de LVD, PRX, OFX e MCB em amostras de água de rio e urina sintética utilizando o método voltamétrico proposto e o procedimento comparativo espectrofotométrico

	Amostra	Adicionado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Comparativo^a ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Proposto^a ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Rec.^b (%)	Erro^c (%)
LVD	Monjolinho	5,00	5,25 ± 0,06	5,15 ± 0,03	103	-1,90
	Monjolinho	15,0	14,1 ± 0,2	14,3 ± 0,4	95,3	1,42
	Chibarro	5,00	4,98 ± 0,07	4,91 ± 0,09	98,2	-1,40
	Chibarro	15,0	14,8 ± 0,2	15,6 ± 0,2	104	5,40
	Urina sintética	8,00	8,11 ± 0,03	8,56 ± 0,07	107	5,55
	Urina sintética	20,0	20,6 ± 0,2	19,9 ± 0,5	99,5	-3,40
PRX	Monjolinho	3,00	2,99 ± 0,09	2,96 ± 0,07	98,6	-1,00
	Monjolinho	10,0	10,5 ± 0,3	10,2 ± 0,2	102	-2,86
	Chibarro	3,00	3,02 ± 0,03	3,15 ± 0,07	105	4,30
	Chibarro	10,0	9,95 ± 0,08	9,72 ± 0,05	97,2	-2,31
	Urina sintética	5,00	5,13 ± 0,07	5,31 ± 0,02	106	3,51
	Urina sintética	15,0	15,2 ± 0,1	15,7 ± 0,3	105	3,29
OFX	Monjolinho	5,00	4,88 ± 0,06	4,62 ± 0,06	92,4	-5,33
	Monjolinho	15,0	15,1 ± 0,1	15,9 ± 0,1	106	5,30
	Chibarro	5,00	4,92 ± 0,05	5,15 ± 0,07	103	4,67
	Chibarro	15,0	14,2 ± 0,4	16,1 ± 0,1	107	13,4
	Urina sintética	8,00	8,32 ± 0,06	8,82 ± 0,06	110	6,01
	Urina sintética	20,0	19,8 ± 0,1	18,8 ± 0,6	94,0	-5,05
MCB	Monjolinho	10,0	9,85 ± 0,07	9,67 ± 0,08	96,7	-1,82
	Monjolinho	40,0	40,1 ± 0,3	40,4 ± 0,1	101	0,75
	Chibarro	10,0	10,6 ± 0,2	9,37 ± 0,04	93,7	-11,6
	Chibarro	40,0	41,0 ± 0,5	37,4 ± 0,1	93,5	-8,78
	Urina sintética	10,0	9,67 ± 0,08	10,8 ± 0,05	108	11,7
	Urina sintética	50,0	50,4 ± 0,1	49,5 ± 0,1	99,0	-1,78

^a $n = 3$;

^b Percentagem de recuperação = $[\text{Proposto}] / [\text{Adicionado}] \times 100$;

^c Erro (%) = $([\text{Proposto}] - [\text{Comparativo}]) / [\text{Comparativo}] \times 100$.

6.4 Conclusões

As propriedades eletroquímicas exibidas pelo β CD-FGr/CPE possibilitaram aplicá-lo pela primeira vez na detecção simultânea de LVD, PRX, OFX e MCB em amostras de água de rio e urina sintética utilizando a SWV. O FGr foi caracterizado com sucesso por técnicas de SEM, EDS, ângulo de contato e voltametria, indicando que o FGr foi eficientemente sintetizado. Os resultados auspiciosos obtidos com o compósito β CD-FGr podem estar relacionados ao efeito sinérgico obtido pela combinação da atividade eletrocatalítica e aumento do sinal analítico proporcionado pelo FGr e a capacidade de adsorção da β CD. As vantagens obtidas com este sensor foram a preparação relativamente simples, elevada sensibilidade e a alta seletividade e estabilidade, oferecendo assim um método analítico alternativo, confiável, rápido e, principalmente, de baixo custo. Além disso, uma vantagem especial e muito importante em relação a outros sensores eletroquímicos é a possibilidade de realização de inúmeras análises e renovação da superfície do eletrodo modificado por simples polimento sobre uma superfície limpa de papel.

CAPÍTULO 7

Conclusões gerais

7. Conclusões Gerais

Os procedimentos eletroanalíticos propostos neste trabalho de doutorado empregando diferentes materiais carbonáceos e distintas plataformas sensoriais, apresentaram condições analíticas bastante satisfatórias, com métodos relativamente simples, rápidos, precisos e com elevada sensibilidade. Além disso, a aplicabilidade dos sensores foi demonstrada através da quantificação simultânea de diferentes fármacos em amostras ambientais (água de rio) e/ou fluidos biológicos (urina sintética e soro), com recuperações próximas a 100%. Demonstrando desta forma, a eficiência dos métodos desenvolvidos e a possibilidade da aplicabilidade analítica para a determinação individual ou simultânea destes fármacos em diferentes amostras. Sendo assim, esta é uma alternativa viável que emprega reagentes de baixa toxicidade e custo relativamente baixo.

Referências

Referências

1. FONTENELE, E.G.P.; MARTINS, M.R.A.; QUIDUTE, A.R.P. & MONTENEGRO JÚNIOR, R.M. "Contaminantes ambientais e os interferentes endócrinos". *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, **54**: 6, 2010.
2. LEITE, S.N.; VIEIRA, M. & VEBER, A.P. "Drug utilization studies: a synthesis of articles published in Brazil and Latin America". *Ciencia & Saude Coletiva*, **13**: 793, 2008.
3. LOYOLA FILHO, A.I.D.; UCHOA, E.; GUERRA, H.L.; FIRMO, J.O.A. & LIMA-COSTA, M.F. "Prevalência e fatores associados à automedicação: resultados do projeto Bambuí". *Revista de Saúde Pública*, **36**: 55, 2002.
4. SILVA, T.A.; MORAES, F.C.; JANEGITZ, B.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Electrochemical biosensors based on nanostructured carbon black: a review". *Journal of Nanomaterials*: 14, 2017.
5. WU, S.X.; HE, Q.Y.; TAN, C.L.; WANG, Y.D. & ZHANG, H. "Graphene-based electrochemical sensors". *Small*, **9** (8): 1160, 2013.
6. XUE, Y.; LIU, Y.; LU, F.; QU, J.; CHEN, H. & DAI, L. "Functionalization of graphene oxide with polyhedral oligomeric silsesquioxane (POSS) for multifunctional applications". *The Journal of Physical Chemistry Letters*, **3** (12): 1607, 2012.
7. MOO, J.G.S.; AMBROSI, A.; BONANNI, A. & PUMERA, M. "Inherent electrochemistry and activation of chemically modified graphenes for electrochemical applications". *Chemistry – An Asian Journal*, **7** (4): 759, 2012.
8. SINHA, A.; DHANJAI; JAIN, R.; ZHAO, H.; KAROLIA, P. & JADON, N. "Voltammetric sensing based on the use of advanced carbonaceous nanomaterials: a review". *Microchimica Acta*, **185** (2): 89, 2018.
9. LIU, J.Q.; LIU, Z.; BARROW, C.J. & YANG, W.R. "Molecularly engineered graphene surfaces for sensing applications: A review". *Anal. Chim. Acta*, **859**: 1, 2015.
10. RATINAC, K.R.; YANG, W.R.; GOODING, J.J.; THORDARSON, P. & BRAET, F. "Graphene and related materials in electrochemical sensing". *Electroanalysis*, **23** (4): 803, 2011.
11. GEIM, A.K. "Graphene: status and prospects". *Science*, **324** (5934): 1530, 2009.
12. JANG, B.Z. & ZHAMU, A. "Processing of nanographene platelets (NGPs) and NGP nanocomposites: a review". *Journal of Materials Science*, **43** (15): 5092, 2008.

13. ZHU, Y.W.; MURALI, S.; STOLLER, M.D.; VELAMAKANNI, A.; PINER, R.D. & RUOFF, R.S. "Microwave assisted exfoliation and reduction of graphite oxide for ultracapacitors". *Carbon*, **48** (7): 2118, 2010.
14. BLAKE, P.; BRIMICOMBE, P.D.; NAIR, R.R.; BOOTH, T.J.; JIANG, D.; SCHEDIN, F.; PONOMARENKO, L.A.; MOROZOV, S.V.; GLEESON, H.F.; HILL, E.W.; GEIM, A.K. & NOVOSELOV, K.S. "Graphene-based liquid crystal device". *Nano Letters*, **8** (6): 1704, 2008.
15. MCALLISTER, M.J.; LI, J.L.; ADAMSON, D.H.; SCHNIEPP, H.C.; ABDALA, A.A.; LIU, J.; HERRERA-ALONSO, M.; MILIUS, D.L.; CAR, R.; PRUD'HOMME, R.K. & AKSAY, I.A. "Single sheet functionalized graphene by oxidation and thermal expansion of graphite". *Chem. Mat.*, **19** (18): 4396, 2007.
16. PARK, S. & RUOFF, R.S. "Chemical methods for the production of graphenes". *Nature Nanotechnology*, **4** (4): 217, 2009.
17. ZHU, J. "Graphene production: New solutions to a new problem". *Nature Nanotechnology*, **3** (9): 528, 2008.
18. E D VIEIRA SEGUNDO, J. & O. VILAR, E. "Grafeno: Uma revisão sobre propriedades, mecanismos de produção e potenciais aplicações em sistemas energéticos". *Revista Eletronica de Materiais e Processos*, **11**: 54, 2016.
19. KARIMI, A.; OTHMAN, A.; UZUNOGLU, A.; STANCIU, L. & ANDREESCU, S. "Graphene based enzymatic bioelectrodes and biofuel cells". *Nanoscale*, **7** (16): 6909, 2015.
20. LIU, C.; YU, Z.; NEFF, D.; ZHAMU, A. & JANG, B.Z. "Graphene-based supercapacitor with an ultrahigh energy density". *Nano Letters*, **10** (12): 4863, 2010.
21. BAHADIR, E.B. & SEZGINTÜRK, M.K. "Applications of graphene in electrochemical sensing and biosensing". *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **76**: 1, 2016.
22. JANEGITZ, B.C.; SILVA, T.A.; WONG, A.; RIBOVSKI, L.; VICENTINI, F.C.; TABOADA SOTOMAYOR, M.D.P. & FATIBELLO-FILHO, O. "The application of graphene for in vitro and in vivo electrochemical biosensing". *Biosensors and Bioelectronics*, **89**: 224, 2017.
23. AMBROSI, A.; CHUA, C.K.; LATIFF, N.M.; LOO, A.H.; WONG, C.H.A.; ENG, A.Y.S.; BONANNI, A. & PUMERA, M. "Graphene and its electrochemistry - an update". *Chemical Society Reviews*, **45** (9): 2458, 2016.
24. AMBROSI, A.; CHUA, C.K.; BONANNI, A. & PUMERA, M. "Electrochemistry of graphene and related materials". *Chemical Reviews*, **114** (14): 7150, 2014.

25. PUMERA, M. "Graphene-based nanomaterials and their electrochemistry". *Chemical Society Reviews*, **39** (11): 4146, 2010.
26. GOH, M.S. & PUMERA, M. "Single-, few-, and multilayer graphene not exhibiting significant advantages over graphite microparticles in electroanalysis". *Anal. Chem.*, **82** (19): 8367, 2010.
27. BROWNSON, D.A.C.; MUNRO, L.J.; KAMPOURIS, D.K. & BANKS, C.E. "Electrochemistry of graphene: not such a beneficial electrode material?". *RSC Advances*, **1** (6): 978, 2011.
28. VALENTINI, F.; ROSCIOLI, D.; CARBONE, M.; CONTE, V.; FLORIS, B.; PALLESCHI, G.; FLAMMINI, R.; BAUER, E.M.; NASILLO, G. & CAPONETTI, E. "Oxidized graphene in ionic liquids for assembling chemically modified electrodes: a structural and electrochemical characterization study". *Anal. Chem.*, **84** (13): 5823, 2012.
29. LI, F.; XUE, M.; MA, X.; ZHANG, M. & CAO, T. "Facile patterning of reduced graphene oxide film into microelectrode array for highly sensitive sensing". *Anal. Chem.*, **83** (16): 6426, 2011.
30. JIANG, Z.; JIN, J.; XIAO, C. & LI, X. "Effect of surface modification of carbon black (CB) on the morphology and crystallization of poly(ethylene terephthalate)/CB masterbatch". *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **395**: 105, 2012.
31. LONG, C.M.; NASCARELLA, M.A. & VALBERG, P.A. "Carbon black vs. black carbon and other airborne materials containing elemental carbon: Physical and chemical distinctions". *Environmental Pollution*, **181**: 271, 2013.
32. FABRY, F.; FLAMANT, G. & FULCHERI, L. "Carbon black processing by thermal plasma. Analysis of the particle formation mechanism". *Chemical Engineering Science*, **56** (6): 2123, 2001.
33. SILVA, T.A.; MORAES, F.C.; JANEGITZ, B.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Electrochemical Biosensors Based on Nanostructured Carbon Black: A Review". *Journal of Nanomaterials*, **2017**: 14, 2017.
34. TOMEI, M.R.; ARDUINI, F.; NEAGU, D. & MOSCONE, D. "Carbon black-based disposable sensor for an on-site detection of free chlorine in swimming pool water". *Talanta*, **189**: 262, 2018.
35. ŁAWRYWIANIEC, M.; SMAJDOR, J.; PACZOSA-BATOR, B. & PIECH, R. "Application of a glassy carbon electrode modified with carbon black nanoparticles for highly sensitive voltammetric determination of quetiapine". *Anal. Methods*, **9** (47): 6662, 2017.
36. SANTOS, A.M.; WONG, A.; CINCOTTO, F.H.; MORAES, F.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Square-wave adsorptive anodic stripping

- voltammetric determination of norfloxacin using a glassy carbon electrode modified with carbon black and CdTe quantum dots in a chitosan film". *Mikrochimica acta*, **186** (3): 148, 2019.
37. BACCARIN, M.; SANTOS, F.A.; VICENTINI, F.C.; ZUCOLOTTO, V.; JANEGITZ, B.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Electrochemical sensor based on reduced graphene oxide/carbon black/chitosan composite for the simultaneous determination of dopamine and paracetamol concentrations in urine samples". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **799**: 436, 2017.
38. DHARASKAR, S.A.; WASEWAR, K.L.; VARMA, M.N.; SHENDE, D.Z. & YOO, C. "Synthesis, characterization and application of 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate for extractive desulfurization of liquid fuel". *Arabian Journal of Chemistry*, **9** (4): 578, 2016.
39. FERNICOLA, A.; SCROSATI, B. & OHNO, H. "Potentialities of ionic liquids as new electrolyte media in advanced electrochemical devices". *Ionics*, **12** (2): 95, 2006.
40. OPALLO, M. & LESNIEWSKI, A. "A review on electrodes modified with ionic liquids". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **656** (1): 2, 2011.
41. SHANGGUAN, X.D.; TANG, H.S.; LIU, R.X. & ZHENG, J.B. "Ionic liquids and its application in electroanalytical chemistry". *Chin. J. Anal. Chem.*, **38** (10): 1510, 2010.
42. MIRAKI, M.; KARIMI-MALEH, H.; TAHER, M.A.; CHERAGHI, S.; KARIMI, F.; AGARWAL, S. & GUPTA, V.K. "Voltammetric amplified platform based on ionic liquid/NiO nanocomposite for determination of benserazide and levodopa". *J. Mol. Liq.*, **278**: 672, 2019.
43. WONG, A.; SILVA, T.A.; VICENTINI, F.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Electrochemical sensor based on graphene oxide and ionic liquid for ofloxacin determination at nanomolar levels". *Talanta*, **161**: 333, 2016.
44. VENTURINI, C.D.G.; NICOLINI, J.; MACHADO, C. & MACHADO, V.G. "Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas". *Química Nova*, **31**: 360, 2008.
45. GIDWANI, B. & VYAS, A. "A Comprehensive Review on Cyclodextrin-Based Carriers for Delivery of Chemotherapeutic Cytotoxic Anticancer Drugs". *Biomed Research International*, 2015.
46. OKADA, S. "Application of cyclodextrin glycosyltransferase - review". *Hakkokogaku Kaishi-Journal of the Society of Fermentation Technology*, **57** (5): 396, 1979.
47. BARBOSA, P.F.P.; CUMBA, L.R.; ANDRADE, R.D.A. & DO CARMO, D.R. "Chemical modifications of cyclodextrin and chitosan for biological and

- environmental applications: metals and organic pollutants adsorption and removal". *Journal of Polymers and the Environment*, **27** (6): 1352, 2019.
48. ZHAO, Q.; LI, S.H. & LIU, Y. "Construction and functions of supramolecular cyclodextrin gels". *Prog. Chem.*, **30** (5): 673, 2018.
49. ZHU, G.B.; YI, Y.H. & CHEN, J.H. "Recent advances for cyclodextrin-based materials in electrochemical sensing". *Trac-Trends Anal. Chem.*, **80**: 232, 2016.
50. KOR, K. & ZAREI, K. " β -Cyclodextrin Incorporated Carbon Nanotube Paste Electrode as Electrochemical Sensor for Nifedipine". *Electroanalysis*, **25** (6): 1497, 2013.
51. ZHAN, F.; GAO, F.; WANG, X.; XIE, L.; GAO, F. & WANG, Q. "Determination of lead(II) by adsorptive stripping voltammetry using a glassy carbon electrode modified with β -cyclodextrin and chemically reduced graphene oxide composite". *Microchimica Acta*, **183** (3): 1169, 2016.
52. ALI, A. & AHMED, S. "A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery". *International Journal of Biological Macromolecules*, **109**: 273, 2018.
53. GOY, R.C.; BRITTO, D.D. & ASSIS, O.B.G. "A review of the antimicrobial activity of chitosan". *Polímeros*, **19**: 241, 2009.
54. RAVI KUMAR, M.N.V. "A review of chitin and chitosan applications". *Reactive and Functional Polymers*, **46** (1): 1, 2000.
55. JANEGITZ, B.C.; FIGUEIREDO-FILHO, L.C.S.; MARCOLINO-JUNIOR, L.H.; SOUZA, S.P.N.; PEREIRA-FILHO, E.R. & FATIBELLO-FILHO, O. "Development of a carbon nanotubes paste electrode modified with crosslinked chitosan for cadmium(II) and mercury(II) determination". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **660** (1): 209, 2011.
56. VICENTINI, F.C.; SILVA, T.A.; PELLATIERI, A.; JANEGITZ, B.C.; FATIBELLO-FILHO, O. & FARIA, R.C. "Pb(II) determination in natural water using a carbon nanotubes paste electrode modified with crosslinked chitosan". *Microchemical Journal*, **116**: 191, 2014.
57. WONG, A.; RAZZINO, C.A.; SILVA, T.A. & FATIBELLO-FILHO, O. "Square-wave voltammetric determination of clindamycin using a glassy carbon electrode modified with graphene oxide and gold nanoparticles within a crosslinked chitosan film". *Sensors and Actuators B-Chemical*, **231**: 183, 2016.
58. SHEPHERD, R.; READER, S. & FALSHAW, A. "Chitosan functional properties". *Glycoconjugate Journal*, **14** (4): 535, 1997.
59. YUSOFF, N., Chapter 7 - graphene-polymer modified electrochemical sensors, in *Graphene-Based Electrochemical Sensors for Biomolecules*, PANDIKUMAR, A. & RAMESHKUMAR, P., Editors. 2019, Elsevier. p. 155.

60. PINHEIRO, S.C.L. & RAIMUNDO JR, I.M. "Uso de membranas de Nafion para a construção de sensores ópticos para medidas de pH". *Química Nova*, **28**: 932, 2005.
61. PERLES, C.E. "Propriedades físico-químicas relacionadas ao desenvolvimento de membranas de Nafion® para aplicações em células a combustível do tipo PEMFC". *Polímeros*, **18**: 281, 2008.
62. VANDERWAL, P.D.; DEROOIJ, N.F. & KOUDELKAHEP, M. "Extremely stable Nafion based carbon monoxide sensor". *Sensors and Actuators B-Chemical*, **35** (1-3): 119, 1996.
63. ZHANG, D.Z.; WANG, M.Y. & YANG, Z.M. "Facile fabrication of graphene oxide/Nafion/indium oxide for humidity sensing with highly sensitive capacitance response". *Sensors and Actuators B-Chemical*, **292**: 187, 2019.
64. LAI, Y.J.; BAI, J.; ZHU, W.; XIAN, Y.Z. & JIN, L.T. "Electrochemical determination of phenylethanolamine a based on Nafion/MWCNTs/AuNPs modified carbon electrode". *Chin. J. Chem.*, **31** (2): 221, 2013.
65. ZHANG, C.; JIANG, H.H.; MA, R.; ZHANG, Y.Y. & CHEN, Q. "Simple non-enzymatic electrochemical sensor for hydrogen peroxide based on nafion/platinum nanoparticles/reduced graphene oxide nanocomposite modified glassy carbon electrode". *Ionics*, **23** (5): 1309, 2017.
66. ZAREI, K. & KHODADADI, A. "Very sensitive electrochemical determination of diuron on glassy carbon electrode modified with reduced graphene oxide–gold nanoparticle–Nafion composite film". *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **144**: 171, 2017.
67. HAN, Y.Q. & LU, Y. "Easy fabrication and excellent electrical conductivity of graphite oxide/poly(3,4-ethylenedioxythiophene) nanocomposites". *Synthetic Metals*, **158** (19-20): 744, 2008.
68. KIRCHMEYER, S. & REUTER, K. "Scientific importance, properties and growing applications of poly(3,4-ethylenedioxythiophene)". *Journal of Materials Chemistry*, **15** (21): 2077, 2005.
69. HORII, T.; HIKAWA, H.; KATSUNUMA, M. & OKUZAKI, H. "Synthesis of highly conductive PEDOT:PSS and correlation with hierarchical structure". *Polymer*, **140**: 33, 2018.
70. WEN, Y.P. & XU, J.K. "Scientific importance of water-processable PEDOT-PSS and preparation, challenge and new application in sensors of its film electrode: a review". *J. Polym. Sci. Pol. Chem.*, **55** (7): 1121, 2017.
71. SOLTANI-KORDSHULI, F.; ZABIHI, F. & ESLAMIAN, M. "Graphene-doped PEDOT:PSS nanocomposite thin films fabricated by conventional and

- substrate vibration-assisted spray coating (SVASC)". *Engineering Science and Technology-an International Journal-Jestech*, **19** (3): 1216, 2016.
72. SHIN, N.R.; CHOI, S.H. & KIM, J.Y. "Highly conductive PEDOT:PSS electrode films hybridized with gold-nanoparticle-doped-carbon nanotubes". *Synthetic Metals*, **192**: 23, 2014.
73. SUN, K.; ZHANG, S.; LI, P.; XIA, Y.; ZHANG, X.; DU, D.; ISIKGOR, F.H. & OUYANG, J. "Review on application of PEDOTs and PEDOT:PSS in energy conversion and storage devices". *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, **26** (7): 4438, 2015.
74. YOO, D.; KIM, J. & KIM, J.H. "Direct synthesis of highly conductive poly(3,4-ethylenedioxythiophene):poly(4-styrenesulfonate) (PEDOT:PSS)/graphene composites and their applications in energy harvesting systems". *Nano Research*, **7** (5): 717, 2014.
75. VUORINEN, T.; NIITTYNEN, J.; KANKKUNEN, T.; KRAFT, T.M. & MANTYSALO, M. "Inkjet-printed graphene/PEDOT:PSS temperature sensors on a skin-conformable polyurethane substrate". *Scientific Reports*, **6** 2016.
76. SEEKAEW, Y.; LOKAVEE, S.; PHOKHARATKUL, D.; WISITSORAAT, A.; KERDCHAROEN, T. & WONGCHOOSUK, C. "Low-cost and flexible printed graphene-PEDOT:PSS gas sensor for ammonia detection". *Organic Electronics*, **15** (11): 2971, 2014.
77. SIAO, H.W.; CHEN, S.M. & LIN, K.C. "Electrochemical study of PEDOT-PSS-MDB-modified electrode and its electrocatalytic sensing of hydrogen peroxide". *Journal of Solid State Electrochemistry*, **15** (6): 1121, 2011.
78. HUANG, T.-Y.; KUNG, C.-W.; WEI, H.-Y.; BOOPATHI, K.M.; CHU, C.-W. & HO, K.-C. "A high performance electrochemical sensor for acetaminophen based on a rGO-PEDOT nanotube composite modified electrode". *Journal of Materials Chemistry A*, **2** (20): 7229, 2014.
79. WONG, A.; SANTOS, A.M.; SILVA, T.A. & FATIBELLO-FILHO, O. "Simultaneous determination of isoproterenol, acetaminophen, folic acid, propranolol and caffeine using a sensor platform based on carbon black, graphene oxide, copper nanoparticles and PEDOT:PSS". *Talanta*, **183**: 329, 2018.
80. CAMPOLI-RICHARDS, D.M.; MONK, J.P.; PRICE, A.; BENFIELD, P.; TODD, P.A. & WARD, A. "Ciprofloxacin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use". *Drugs*, **35** (4): 373, 1988.
81. ASSERAY, N.; BOURIGAULT, C.; BOUTOILLE, D.; HAPPI, L.; TOUCHAIS, S.; CORVEC, S.; BEMER, P. & NAVAS, D. "Levofloxacin at the usual dosage to treat bone and joint infections: a cohort analysis". *International journal of antimicrobial agents*, **47** (6): 478, 2016.

82. ERNST, M.E.; ERNST, E.J. & KLEPSE, M.E. "Levofloxacin and trovafloxacin: The next generation of fluoroquinolones?". *Am. J. Health-Syst. Pharm.*, **54** (22): 2569, 1997.
83. LEE, C.H.; CHEUNG, R.T. & CHAN, T.M. "Ciprofloxacin-induced oral facial dyskinesia in a patient with normal liver and renal function". *Hospital medicine (London, England : 1998)*, **61** (2): 142, 2000.
84. KUULA, L.S.M.; VILJEMAA, K.M.; BACKMAN, J.T. & BLOM, M. "Fluoroquinolone-related adverse events resulting in health service use and costs: A systematic review". *Plos One*, **14** (4): 17, 2019.
85. AVERSANO, M.G.; SCHROEDER, J.; CITTERIO, A.; SCIBILIA, J.; GAMBA, C.; BALOSI, L.G.; MASCHERI, A.; LOSAPPIO, L.M. & PASTORELLO, E.A. "Levofloxacin induced Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis overlap syndrome: case reports". *Clinical and Translational Allergy*, **4** (3): 1, 2014.
86. HIDI, I.J.; JAHN, M.; PLETZ, M.W.; WEBER, K.; CIALLA-MAY, D. & POPP, J. "Toward levofloxacin monitoring in human urine samples by employing the LoC-SERS technique". *J. Phys. Chem. C*, **120** (37): 20613, 2016.
87. HADDOW, L.J.; SEKHAR, M.C.; HAJELA, V. & RAO, G.G. "Spontaneous Achilles tendon rupture in patients treated with levofloxacin". *J. Antimicrob. Chemother.*, **51** (3): 747, 2003.
88. ISSA, M.M.; NEJEM, R.M.; EL-ABADLA, N.S.; EL-NABY, M.K.; ROSHDY, A.A. & KHEIRALLA, Z.A. "Effects of paracetamol on the pharmacokinetics of ciprofloxacin in plasma using a microbiological assay". *Clinical drug investigation*, **27** (7): 463, 2007.
89. PASARE, G.; PASARE, V.; EFTIMESCU, N.; IVAN, M. & MILICI, A. "Combination of antibiotics with analgesic and antipyretic substances (author's transl)]". *Zentralbl Bakteriolog Naturwiss*, **134** (7): 640, 1979.
90. JEFFERIES, S.; SAXENA, M. & YOUNG, P. "Paracetamol in critical illness: a review". *Crit Care Resusc.*, **14** (1): 74, 2012.
91. GRAHAM, G.G. & SCOTT, K.F. "Mechanism of action of paracetamol". *American Journal of Therapeutics*, **12** (1): 46, 2005.
92. KULO, A.; PEETERS, M.Y.; ALLEGAERT, K.; SMITS, A.; DE HOON, J.; VERBESSELT, R.; LEWI, L.; VAN DE VELDE, M. & KNIBBE, C.A.J. "Pharmacokinetics of paracetamol and its metabolites in women at delivery and post-partum". *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **75** (3): 850, 2013.
93. JAESCHKE, H.; WILLIAMS, C.D.; RAMACHANDRAN, A. & BAJT, M.L. "Acetaminophen hepatotoxicity and repair: the role of sterile inflammation and innate immunity". *Liver Int.*, **32** (1): 8, 2012.

94. LARSON, A.M.; POLSON, J.; FONTANA, R.J.; DAVERN, T.J.; LALANI, E.; HYNAN, L.S.; REISCH, J.S.; SCHIODT, F.V.; OSTAPOWICZ, G.; SHAKIL, A.O.; LEE, W.M. & ACUTE LIVER FAILURE STUDY, G. "Acetaminophen-induced acute liver failure: Results of a United States multicenter, prospective study". *Hepatology*, **42** (6): 1364, 2005.
95. ENDIMIANI, A.; BRIGANTE, G.; BETTACCINI, A.A.; LUZZARO, F.; GROSSI, P. & TONIOLO, A.Q. "Failure of levofloxacin treatment in community-acquired pneumococcal pneumonia". *BMC Infectious Diseases*, **5**: 106, 2005.
96. FIGUEIRA-COELHO, J.; PEREIRA, O.; PICADO, B.; MENDONÇA, P.; NEVES-COSTA, J. & NETA, J. "Acute hepatitis associated with the use of levofloxacin". *Clin. Ther.*, **32** (10): 1733, 2010.
97. EL-KOSASY, A.M.; ABDEL-AZIZ, O.; MAGDY, N. & EL ZAHAR, N.M. "Spectrophotometric and chemometric methods for determination of imipenem, ciprofloxacin hydrochloride, dexamethasone sodium phosphate, paracetamol and cilastatin sodium in human urine". *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **157**: 26, 2016.
98. SOLANGI, A.R.; MEMON, S.Q.; MALLAH, A.; MEMON, N.; KHUHAWAR, M.Y. & BHANGER, M.I. "Development and implication of a capillary electrophoresis methodology for ciprofloxacin, paracetamol and diclofenac sodium in pharmaceutical formulations and simultaneously in human urine samples". *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, **24** (4): 539, 2011.
99. CHEN, T.-S.; HUANG, K.-L. & CHEN, J.-L. "An electrochemical approach to simultaneous determination of acetaminophen and ofloxacin". *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, **89** (6): 1284, 2012.
100. DUMKA, V.K. "Disposition kinetics and dosage regimen of levofloxacin on concomitant administration with paracetamol in crossbred calves". *Journal of veterinary science*, **8** (4): 357, 2007.
101. LIN, A.Y.C.; YU, T.H. & LIN, C.F. "Pharmaceutical contamination in residential, industrial, and agricultural waste streams: Risk to aqueous environments in Taiwan". *Chemosphere*, **74** (1): 131, 2008.
102. LUNDBLAD, L.K.A.; RINALDI, L.M.; POYNTER, M.E.; RIESENFELD, E.P.; WU, M.; AIMI, S.; BARONE, L.M.; BATES, J.H.T. & IRVIN, C.G. "Detrimental effects of albuterol on airway responsiveness requires airway inflammation and is independent of β -receptor affinity in murine models of asthma". *Respiratory Research*, **12** (1): 27, 2011.
103. HANIF, M.; QURESHI, J.; IJAZ, H.; MUSTAFA, M.I.; RASUL, A.; AMIR, N.; AFTAB, B. & FAYYAZ, A. "Chronic obstructive pulmonary disease, its new

drug treatments and strategies: A review". *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, **31** (3): 967, 2018.

104. LIBRETTO, S.E. "A review of the toxicology of salbutamol (albuterol)". *Archives of toxicology*, **68** (4): 213, 1994.

105. KEIR, S.; PAGE, C. & SPINA, D. "Bronchial hyperresponsiveness induced by chronic treatment with albuterol: Role of sensory nerves". *J. Allergy Clin. Immunol.*, **110** (3): 388, 2002.

106. MAHAJAN, V.K.; TOMASHEFSKI, J.F. & HUBER, G.L. "Comparative study of acute effects of albuterol and isoproterenol sulphate aerosols in bronchial asthma". *Annals of allergy*, **39** (5): 319, 1977.

107. REDDY, Y.N.V.; OBOKATA, M.; KOEPP, K.E.; EGBE, A.C.; WILEY, B. & BORLAUG, B.A. "The beta-adrenergic agonist albuterol improves pulmonary vascular reserve in heart failure with preserved ejection fraction a randomized controlled trial". *Circ.Res.*, **124** (2): 306, 2019.

108. JARVIE, D.R.; THOMPSON, A.M. & DYSON, E.H. "Laboratory and clinical features of self-poisoning with salbutamol and terbutaline". *Clinica Chimica Acta*, **168** (3): 313, 1987.

109. BARKIYA, S.M.; KUMARI, V.; VENUGOPAL, N. & ASEEZ, A. "Effects of aerosolized levosalbutamol versus salbutamol on serum potassium level and heart rate in children with acute exacerbation of asthma". *Int. J. Sci. Study*, **3** (11): 223, 2016.

110. SHAND, D.G. "Pharmacokinetics of propranolol: a review". *Postgraduate medical journal*, **52 Suppl 4**: 22, 1976.

111. TUROSS, N. & PATRICK, R.L. "Effects of propranolol on catecholamine synthesis and uptake in the central-nervous-system of the rat". *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **237** (3): 739, 1986.

112. BOSCO, F.A.P. & BRAZ, J.R.C. "Beta-bloqueadores em anestesiologia: aspectos farmacológicos e clínicos". *Revista Brasileira de Anestesiologia*, **51**: 431, 2001.

113. RAMOSKA, E.A.; HENRETIG, F.; JOFFE, M. & SPILLER, H.A. "Propranolol treatment of albuterol poisoning in two asthmatic patients". *Annals of emergency medicine*, **22** (9): 1474, 1993.

114. MINTON, N.A.; BAIRD, A.R. & HENRY, J.A. "Modulation of the effects of salbutamol by propranolol and atenolol". *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **36** (5): 449, 1989.

115. ALBOUAINI, K.; ANDRON, M.; ALAHMAR, A. & EGRED, M. "Beta-blockers use in patients with chronic obstructive pulmonary disease and

- concomitant cardiovascular conditions". *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, **2** (4): 535, 2007.
116. KÜPELI, S. "Use of propranolol for infantile hemangiomas". *Pediatric Hematology and Oncology*, **29** (3): 293, 2012.
117. TOMLINSON, C.L.; STOWE, R.; PATEL, S.; RICK, C.; GRAY, R. & CLARKE, C.E. "Systematic review of levodopa dose equivalency reporting in Parkinson's disease". *Mov. Disord.*, **25** (15): 2649, 2010.
118. NUTT, J.G. "Levodopa-induced dyskinesia - review, observations, and speculations". *Neurology*, **40** (2): 340, 1990.
119. CONNOLLY, B.S. & LANG, A.E. "Pharmacological treatment of parkinson disease a review". *JAMA-J. Am. Med. Assoc.*, **311** (16): 1670, 2014.
120. BROGDEN, R.N.; HEEL, R.C.; SPEIGHT, T.M. & AVERY, G.S. "Piroxicam - a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy". *Drugs*, **22** (3): 165, 1981.
121. LEE, C.R. & BALFOUR, J.A. "Piroxicam-beta-cyclodextrin - a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in rheumatic diseases and pain states". *Drugs*, **48** (6): 907, 1994.
122. BARNER, A. "Review of clinical trials and benefit/risk ratio of meloxicam". *Scand. J. Rheumatol.*: 29, 1996.
123. MONK, J.P. & CAMPOLIRICHARDS, D.M. "Ofloxacin - a review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use". *Drugs*, **33** (4): 346, 1987.
124. OKERI, H.A. & ARHEWOH, I.M. "Analytical profile of the fluoroquinolone antibacterials. I. Ofloxacin". *Afr. J. Biotechnol.*, **7** (6): 670, 2008.
125. TOME, A.M. & FILIPE, A. "Quinolones review of psychiatric and neurological adverse reactions". *Drug Saf.*, **34** (6): 465, 2011.
126. RICHARDS, B.L.; WHITTLE, S.L. & BUCHBINDER, R. "Muscle relaxants for pain management in rheumatoid arthritis". *Cochrane Database Syst Rev.*, (1): 58, 2012.
127. CHOU, R.; PETERSON, K. & HELFAND, M. "Comparative efficacy and safety of skeletal muscle relaxants for spasticity and musculoskeletal conditions: a systematic review". *J. Pain Symptom Manage.*, **28** (2): 140, 2004.
128. BRUCE, R.B.; TURNBULL, L.B. & NEWMAN, J.H. "Metabolism of methocarbamol in the rat, dog, and human". *J Pharm Sci*, **60** (1): 104, 1971.
129. ABRAMS, W.B.; COUTINHO, C.B.; LEON, A.S. & SPIEGEL, H.E. "Absorption and metabolism of levodopa". *Jama*, **218** (13): 1912, 1971.

130. BORRMANN, L.; TANG-LIU, D.D.; KANN, J.; NISTA, J.; LIN, E.T. & FRANK, J. "Ofloxacin in human serum, urine, and tear film after topical application". *Cornea*, **11** (3): 226, 1992.
131. ISHIZAKI, T.; NOMURA, T. & ABE, T. "Pharmacokinetics of piroxicam, a new nonsteroidal anti-inflammatory agent, under fasting and postprandial states in man". *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, **7** (4): 369, 1979.
132. LAUBE, N.; MOHR, B. & HESSE, A. "Laser-probe-based investigation of the evolution of particle size distributions of calcium oxalate particles formed in artificial urines". *J. Cryst. Growth*, **233** (1-2): 367, 2001.
133. ROUSHANI, M.; SHAMSIPUR, M. & POURMORTAZAVI, S.M. "Amperometric detection of Glycine, L-Serine, and L-Alanine using glassy carbon electrode modified by NiO nanoparticles". *J. Appl. Electrochem.*, **42** (12): 1005, 2012.
134. R.E. BRUNS; I.S. SCARMINIO & B.B. NETO, *Statistical design – chemometrics* 2006, New York. p.
135. PAULIUKAITE, R.; GHICA, M.E.; FATIBELLO-FILHO, O. & BRETT, C.M.A. "Comparative study of different cross-linking agents for the immobilization of functionalized carbon nanotubes within a chitosan film supported on a graphite–epoxy composite electrode". *Anal. Chem.*, **81** (13): 5364, 2009.
136. SAHIN, M.; KOCAK, N.; ARSLAN, G. & UCAN, H.I. "Synthesis of crosslinked chitosan with epichlorohydrin possessing two novel polymeric ligands and its use in metal removal". *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, **21** (1): 69, 2011.
137. SHAO, L.; CHANG, X.; ZHANG, Y.; HUANG, Y.; YAO, Y. & GUO, Z. "Graphene oxide cross-linked chitosan nanocomposite membrane". *Applied Surface Science*, **280**: 989, 2013.
138. HARB, S.V.; PULCINELLI, S.H.; SANTILLI, C.V.; KNOWLES, K.M. & HAMMER, P. "A comparative study on graphene oxide and carbon nanotube reinforcement of PMMA-siloxane-silica anticorrosive coatings". *ACS Applied Materials & Interfaces*, **8** (25): 16339, 2016.
139. JOHRA, F.T.; LEE, J.-W. & JUNG, W.-G. "Facile and safe graphene preparation on solution based platform". *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, **20** (5): 2883, 2014.
140. XU, C.; SHI, X.; JI, A.; SHI, L.; ZHOU, C. & CUI, Y. "Fabrication and characteristics of reduced graphene oxide produced with different green reductants". *PLOS ONE*, **10** (12): e0144842, 2015.

141. KELLICI, S.; ACORD, J.; BALL, J.; REEHAL, H.S.; MORGAN, D. & SAHA, B. "A single rapid route for the synthesis of reduced graphene oxide with antibacterial activities". *RSC Advances*, **4** (29): 14858, 2014.
142. YANG, S.; LI, G.; LIU, L.; WANG, G.; WANG, D. & QU, L. "Preparation of nickel oxide nanoparticles on N-doped reduced graphene oxide: A two-dimensional hybrid for electrocatalytic sensing of l-cysteine". *Journal of Alloys and Compounds*, **691**: 834, 2017.
143. CASTRO NETO, A.H.; GUINEA, F.; PERES, N.M.R.; NOVOSELOV, K.S. & GEIM, A.K. "The electronic properties of graphene". *Reviews of Modern Physics*, **81** (1): 109, 2009.
144. BARD, A.J. & FAULKNER, L.R., *Electrochemical methods: fundamentals and applications* 2001, John Wiley & Sons Inc: New York. p.
145. VAN BENSCHOTEN, J.J.; LEWIS, J.Y.; HEINEMAN, W.R.; ROSTON, D.A. & KISSINGER, P.T. "Cyclic voltammetry experiment". *Journal of Chemical Education*, **60** (9): 772, 1983.
146. XIE, A.J.; CHEN, Y.; LUO, S.P.; TAO, Y.W.; JIN, Y.S. & LI, W.W. "Electrochemical detection of ciprofloxacin based on graphene modified glassy carbon electrode". *Mater. Technol.*, **30** (6): 362, 2015.
147. KINGSLEY, M.P.; KALAMBATE, P.K. & SRIVASTAVA, A.K. "Simultaneous determination of ciprofloxacin and paracetamol by adsorptive stripping voltammetry using copper zinc ferrite nanoparticles modified carbon paste electrode". *RSC Advances*, **6** (18): 15101, 2016.
148. MASAWAT, P.; LIAWRUANGRATH, S.; VANEESORN, Y. & LIAWRUANGRATH, B. "Design and fabrication of a low-cost flow-through cell for the determination of acetaminophen in pharmaceutical formulations by flow injection cyclic voltammetry". *Talanta*, **58** (6): 1221, 2002.
149. BAGHERI, H.; KHOSHSAFAR, H.; AMIDI, S. & ARDAKANI, Y.H. "Fabrication of an electrochemical sensor based on magnetic multi-walled carbon nanotubes for the determination of ciprofloxacin". *Anal. Methods*, **8** (16): 3383, 2016.
150. BACCARIN, M.; JANEGITZ, B.C.; BERTE, R.; VICENTINI, F.C.; BANKS, C.E.; FATIBELLO-FILHO, O. & ZUCOLOTTO, V. "Direct electrochemistry of hemoglobin and biosensing for hydrogen peroxide using a film containing silver nanoparticles and poly(amidoamine) dendrimer". *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, **58**: 97, 2016.
151. BRETT, A.M.O. & BRETT, C.M.A., *Electroquímica: princípios, métodos e aplicações*, INC, O.U.P., Editor. 1993: New York.

152. GOYAL, R.N.; OYAMA, M. & SINGH, S.P. "Fast determination of salbutamol, abused by athletes for doping, in pharmaceuticals and human biological fluids by square wave voltammetry". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **611** (1): 140, 2007.
153. WEI, Y.; ZHANG, Q.; SHAO, C.; LI, C.; ZHANG, L. & LI, X. "Voltammetric determination of salbutamol on a glassy carbon electrode coated with a nanomaterial thin film". *Journal of Analytical Chemistry*, **65** (4): 398, 2010.
154. TALAY PINAR, P.; ALI, H.S.; ABDULLAH, A.A.; YARDIM, Y. & SENTURK, Z. "Electroanalytical determination of salbutamol in pharmaceutical formulations using cathodically pretreated boron-doped diamond electrode". *Journal of Research in Pharmacy*, **22** (3): 460, 2018.
155. SHADJOU, N.; HASANZADEH, M.; SAGHATFOROUSH, L.; MEHDIZADEH, R. & JOUYBAN, A. "Electrochemical behavior of atenolol, carvedilol and propranolol on copper-oxide nanoparticles". *Electrochim. Acta*, **58**: 336, 2011.
156. BARANOWSKA, I. & KOPER, M. "Electrochemical behavior of propranolol and its major metabolites, 4'-hydroxypropranolol and 4'-hydroxypropranolol sulfate, on glassy carbon electrode". *J. Braz. Chem. Soc.*, **22**: 1601, 2011.
157. AMARE, M. & MENKIR, G. "Differential pulse voltammetric determination of salbutamol sulfate in syrup pharmaceutical formulation using poly(4-amino-3-hydroxynaphthalene sulfonic acid) modified glassy carbon electrode". *Heliyon*, **3** (10): e00417, 2017.
158. LIN, K.-C.; HONG, C.-P. & CHEN, S.-M. "Simultaneous determination for toxic ractopamine and salbutamol in pork sample using hybrid carbon nanotubes". *Sensors and Actuators B: Chemical*, **177**: 428, 2013.
159. LI, Y.; YE, Z.; LUO, P.; LI, Y. & YE, B. "A sensitive voltammetric sensor for salbutamol based on MWNTs composite nano-Au film modified electrode". *Anal. Methods*, **6** (6): 1928, 2014.
160. RADI, A.; WASSEL, A.A. & EL RIES, M.A. "Adsorptive behaviour and voltammetric analysis of propranolol at carbon paste electrode". *Chemia Analytyczna*, **49** (1): 51, 2004.
161. SARTORI, E.R.; MEDEIROS, R.A.; ROCHA-FILHO, R.C. & FATIBELLO-FILHO, O. "Square-wave voltammetric determination of propranolol and atenolol in pharmaceuticals using a boron-doped diamond electrode". *Talanta*, **81** (4-5): 1418, 2010.
162. OLIVEIRA, G.G.; AZZI, D.C.; VICENTINI, F.C.; SARTORI, E.R. & FATIBELLO-FILHO, O. "Voltammetric determination of verapamil and

- propranolol using a glassy carbon electrode modified with functionalized multiwalled carbon nanotubes within a poly (allylamine hydrochloride) film". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **708**: 73, 2013.
163. RAYMUNDO-PEREIRA, P.A.; CAMPOS, A.M.; VICENTINI, F.C.; JANEGITZ, B.C.; MENDONCA, C.D.; FURINI, L.N.; BOAS, N.V.; CALEGARO, M.L.; CONSTANTINO, C.J.L.; MACHADO, S.A.S. & OLIVEIRA, O.N. "Sensitive detection of estriol hormone in creek water using a sensor platform based on carbon black and silver nanoparticles". *Talanta*, **174**: 652, 2017.
164. SMAJDOR, J.; PIECH, R.; LAWRYWIANIEC, M. & PACZOSA-BATOR, B. "Glassy carbon electrode modified with carbon black for sensitive estradiol determination by means of voltammetry and flow injection analysis with amperometric detection". *Anal. Biochem.*, **544**: 7, 2018.
165. PACHECO, M.R.; BARBOSA, S.C.; QUADRADO, R.F.N.; FAJARDO, A.R. & DIAS, D. "Glassy carbon electrode modified with carbon black and cross-linked alginate film: a new voltammetric electrode for paraquat determination". *Anal. Bioanal. Chem.*, **411** (15): 3269, 2019.
166. KUMAR, S.; UMAR, M.; SAIFI, A.; KUMAR, S.; AUGUSTINE, S.; SRIVASTAVA, S. & MALHOTRA, B.D. "Electrochemical paper based cancer biosensor using iron oxide nanoparticles decorated PEDOT:PSS". *Anal. Chim. Acta*, **1056**: 135, 2019.
167. DUAN, S.S.; WANG, W.; YU, C.L.; LIU, M.J. & YU, L.Y. "Development of electrochemical sensor for detection of L-tryptophan based on exfoliated graphene/PEDOT:PSS". *Nano*, **14** (5): 10, 2019.
168. WONG, A.; SANTOS, A.M. & FATIBELLO-FILHO, O. "Determination of piroxicam and nimesulide using an electrochemical sensor based on reduced graphene oxide and PEDOT:PSS". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **799**: 547, 2017.
169. SOLTANI-KORDSHULI, F.; ZABIHI, F. & ESLAMIAN, M. "Graphene-doped PEDOT:PSS nanocomposite thin films fabricated by conventional and substrate vibration-assisted spray coating (SVASC)". *Engineering Science and Technology, an International Journal*, **19** (3): 1216, 2016.
170. RASTOGI, P.K.; GANESAN, V. & KRISHNAMOORTHY, S. "A promising electrochemical sensing platform based on a silver nanoparticles decorated copolymer for sensitive nitrite determination". *Journal of Materials Chemistry A*, **2** (4): 933, 2014.
171. MIKAC, L.; IVANDA, M.; GOTIĆ, M.; MIHELJ, T. & HORVAT, L. "Synthesis and characterization of silver colloidal nanoparticles with different

- coatings for SERS application". *Journal of Nanoparticle Research*, **16** (12): 2748, 2014.
172. KHOSHSAFAR, H.; BAGHERI, H.; REZAEI, M.; SHIRZADMEHR, A.; HAJIAN, A. & SEPEHRI, Z. "Magnetic carbon paste electrode modified with a high performance composite based on molecularly imprinted carbon nanotubes for sensitive determination of levofloxacin". *Journal of The Electrochemical Society*, **163** (8): B422, 2016.
173. LI, T.; XU, J.; ZHAO, L.; SHEN, S.; YUAN, M.; LIU, W.; TU, Q.; YU, R. & WANG, J. "Au nanoparticles/poly (caffeic acid) composite modified glassy carbon electrode for voltammetric determination of acetaminophen". *Talanta*, **159**: 356, 2016.
174. ZHANG, Y.; LIU, X.; LI, L.; GUO, Z.; XUE, Z. & LU, X. "An electrochemical paracetamol sensor based on layer-by-layer covalent attachment of MWCNTs and a G4.0 PAMAM modified GCE". *Anal. Methods*, **8** (10): 2218, 2016.
175. TANG, L.; TONG, Y.; ZHENG, R.; LIU, W.; GU, Y.; LI, C.; CHEN, R. & ZHANG, Z. "Ag nanoparticles and electrospun CeO₂-Au composite nanofibers modified glassy carbon electrode for determination of levofloxacin". *Sensors and Actuators B: Chemical*, **203**: 95, 2014.
176. ABBASPOUR, A. & MIRZAJANI, R. "Electrochemical monitoring of piroxicam in different pharmaceutical forms with multi-walled carbon nanotubes paste electrode". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **44** (1): 41, 2007.
177. DEVARAJ, M.; SARAVANAN, R.; DEIVASIGAMANI, R.; GUPTA, V.K.; GRACIA, F. & JAYADEVAN, S. "Fabrication of novel shape Cu and Cu/Cu₂O nanoparticles modified electrode for the determination of dopamine and paracetamol". *J. Mol. Liq.*, **221**: 930, 2016.
178. YIĞİT, A.; YARDIM, Y.; ÇELEBI, M.; LEVENT, A. & ŞENTÜRK, Z. "Graphene/Nafion composite film modified glassy carbon electrode for simultaneous determination of paracetamol, aspirin and caffeine in pharmaceutical formulations". *Talanta*, **158**: 21, 2016.
179. CESARINO, V.; CESARINO, I.; MORAES, F.C.; MACHADO, S.A. & MASCARO, L.H. "Carbon nanotubes modified with SnO₂ rods for levofloxacin detection". *J. Braz. Chem. Soc.*, **25** (3): 502, 2014.
180. CHI, Y. & LI, J. "Determination of levofloxacin hydrochloride with multiwalled carbon nanotubes-polymeric alizarin film modified electrode". *Russian Journal of Electrochemistry*, **46** (2): 155, 2010.

181. HUANG, J.-Y.; BAO, T.; HU, T.-X.; WEN, W.; ZHANG, X.-H. & WANG, S.-F. "Voltammetric determination of levofloxacin using a glassy carbon electrode modified with poly(o-aminophenol) and graphene quantum dots". *Microchimica Acta*, **184** (1): 127, 2017.
182. WONG, A.; SILVA TIAGO, A. & FATIBELLO-FILHO, O. "Graphite oxide and gold nanoparticles as alternative materials in the design of a highly sensitive electrochemical sensor for the simultaneous determination of biological species". *Electroanalysis*, **29** (11): 2491, 2017.
183. PRABAKAR, S.J.R.; KIM, Y.; JEONG, J.; JEONG, S.; LAH, M.S. & PYO, M. "Graphite oxide as an efficient and robust support for Pt nanoparticles in electrocatalytic methanol oxidation". *Electrochim. Acta*, **188**: 472, 2016.
184. GAO, L.; HE, J.; XU, W.; ZHANG, J.; HUI, J.; GUO, Y.; LI, W. & YU, C. "Ultrasensitive electrochemical biosensor based on graphite oxide, Prussian blue, and PTC-NH₂ for the detection of α 2,6-sialylated glycans in human serum". *Biosensors and Bioelectronics*, **62**: 79, 2014.
185. WEI, M.; TIAN, D.; LIU, S.; ZHENG, X.; DUAN, S. & ZHOU, C. " β -Cyclodextrin functionalized graphene material: A novel electrochemical sensor for simultaneous determination of 2-chlorophenol and 3-chlorophenol". *Sensors and Actuators B: Chemical*, **195**: 452, 2014.
186. XU, X.; LIU, Z.; ZHANG, X.; DUAN, S.; XU, S. & ZHOU, C. " β -Cyclodextrin functionalized mesoporous silica for electrochemical selective sensor: Simultaneous determination of nitrophenol isomers". *Electrochim. Acta*, **58**: 142, 2011.
187. SONG, J.; YANG, J.; ZENG, J.; TAN, J. & ZHANG, L. "Graphite oxide film-modified electrode as an electrochemical sensor for acetaminophen". *Sensors and Actuators B: Chemical*, **155** (1): 220, 2011.
188. NICHOLSON, R.S. "Theory and application of cyclic voltammetry for measurement of electrode reaction kinetics". *Anal. Chem.*, **37** (11): 1351, 1965.
189. LAVAGNINI, I.; ANTIOCHIA, R. & MAGNO, F. "An extended method for the practical evaluation of the standard rate constant from cyclic voltammetric data". *Electroanalysis*, **16** (6): 505, 2004.
190. JOANNA, L. "cyclodextrins based electrochemical sensors for biomedical and pharmaceutical analysis". *Current Medicinal Chemistry*, **24** (22): 2359, 2017.
191. ATTA, N.F.; ELKHOLY, S.S.; AHMED, Y.M. & GALAL, A. "Host guest inclusion complex modified electrode for the sensitive determination of a muscle relaxant drug". *Journal of The Electrochemical Society*, **163** (7): B403, 2016.
192. FOULADGAR, M.; KARIMI-MALEH, H. & GUPTA, V.K. "Highly sensitive voltammetric sensor based on NiO nanoparticle room temperature ionic

- liquid modified carbon paste electrode for levodopa analysis". *J. Mol. Liq.*, **208**: 78, 2015.
193. REDDAIAH, K.; MADHUSUDANA REDDY, T. & RAGHU, P. "Electrochemical investigation of L-dopa and simultaneous resolution in the presence of uric acid and ascorbic acid at a poly (methyl orange) film coated electrode: A voltammetric study". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **682**: 164, 2012.
194. JIANG, Z.M.; LI, G.Y. & ZHANG, M.X. "A novel electrochemical sensor based on SH-beta-cyclodextrin functionalized gold nanoparticles/reduced-graphene oxide nanohybrids for ultrasensitive electrochemical sensing of acetaminophen and ofloxacin". *International Journal of Electrochemical Science*, **12** (6): 5157, 2017.
195. ABBASPOUR, A. & MIRZAJANI, R. "Electrochemical monitoring of piroxicam in different pharmaceutical forms with multi-walled carbon nanotubes paste electrode". *J Pharm Biomed Anal*, **44** (1): 41, 2007.
196. SHAIKH, T.; UDDIN, S.; TALPUR, F.N.; KHASKELI, A.R.; AGHEEM, M.H.; SHAH, M.R.; SHERAZI, T.H. & SIDDIQUI, S. "Ultrasensitive determination of piroxicam at diflunisal-derived gold nanoparticle-modified glassy carbon electrode". *Journal of Electronic Materials*, **46** (10): 5957, 2017.
197. ISAAC YVES LOPES DE, M.; MORGANA FERNANDES, A.; LUANE FERREIRA, G.; APARECIDO RIBEIRO DE, S.; WALLANS TORRES PIO DOS, S.; ERIC DE SOUZA, G.; LAURA, M.C.-A. & JOSE MARIA, P.-S. "Differential pulse voltammetric determination of piroxicam on lanthanide ferric oxide nanoparticles-carbon paste modified electrode". *Current Pharmaceutical Analysis*, **14** (3): 271, 2018.
198. WONG, A.; SANTOS, A.M.; BACCARIN, M.; CAVALHEIRO, É.T.G. & FATIBELLO-FILHO, O. "Simultaneous determination of environmental contaminants using a graphite oxide – Polyurethane composite electrode modified with cyclodextrin". *Materials Science and Engineering: C*, **99**: 1415, 2019.
199. FATIBELLO-FILHO, O., *Equilíbrio iônico: aplicações em química analítica* 2016, Edufscar: Brasil. 513 p.