

HERBERT ALEIXO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS VOLTAMÉTRICOS PARA ANÁLISE  
DE ANTIMICROBIANOS EM ÁGUA E LEITE**

Tese de doutorado apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como parte  
das exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Agroquímica, para obtenção  
do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

A366d  
2018           Aleixo, Herbert, 1986-  
                  Desenvolvimento de métodos voltamétricos para análise de  
                  antimicrobianos em água e leite / Herbert Aleixo. – Viçosa, MG,  
                  2018.

xvi, 107 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Leonardo Luiz Okumura.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Ácido oxolínico. 2. Sulfaclopiridazina. 3. Eletroquímica.  
4. Nanotubos de carbono. 5. Líquidos iônicos. I. Universidade  
Federal de Viçosa. Departamento de Química. Programa de  
Pós-Graduação em Agroquímica. II. Título.

CDD 22. ed. 547.596

HERBERT ALEIXO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS VOLTAMÉTRICOS PARA ANÁLISE  
DE ANTIMICROBIANOS EM ÁGUA E LEITE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.


APROVADA: 27 de abril de 2018.



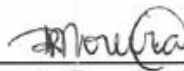
Marcelo Firmino de Oliveira



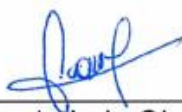
Edimar Aparecida Filomeno Fontes



Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz



Renata Pereira Lopes Moreira



Leonardo Luiz Okumura  
(Orientador)

Dedico este trabalho à minha família,  
Meu pai Sebastião e minha mãe Sônia, que sempre me acompanharam.  
Obrigado por tudo.

**“Nenhum vencedor acredita no acaso.”**

Friedrich Nietzsche

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por estar presente em todos os momentos da minha vida e por ser minha fonte de força e superação nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais Sebastião e Sônia pelo amor incondicional, pelo apoio constante, por sempre terem me dado condições de me tornar alguém melhor, tanto no sentido pessoal quanto profissional. Se hoje consegui percorrer uma pequena parte da longa caminhada que ainda tenho pela frente, devo tudo a eles, aos seus conselhos e aos seus esforços para me manter no caminho certo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Leonardo Luiz Okumura por todos os conhecimentos que me foram passados ao longo de todos estes anos de trabalho. Também agradeço a ele pela disponibilidade, sugestões e críticas, que só me fizeram aprender e melhorar cada vez mais.

A todos os meus amigos, entre eles os companheiros do Grupo de Eletroanalítica Aplicada (GEAP), com quem compartilhei muito trabalho e também vários momentos de descontração e à Beatriz pelo apoio e companheirismo.

Aos professores do Departamento de Química, que sempre contribuíram para o meu aprendizado e a todos os funcionários.

Por último, agradeço a CAPES pela bolsa que me foi concedida e também aos demais órgãos de fomento que possibilitaram a elaboração e execução deste projeto.

## SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xiv
RESUMO .....	xv
ABSTRACT .....	xvi
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1. Medicamentos Veterinários.....	2
1.2. Monitoramento de Medicamentos Veterinários.....	3
1.3. Antimicrobianos .....	4
1.4. Ácido oxolínico (AOx) e Sulfaclopiridazina (SCP) .....	9
1.5. Contaminação por antimicrobianos.....	11
1.6. Métodos eletroanalíticos .....	12
1.7. Voltametria Cíclica .....	15
1.8. Voltametria de Pulso Diferencial.....	16
1.9. Voltametria de onda quadrada .....	17
1.10. Eletrodos de trabalho.....	18
1.11. Eletrodo de Carbono Vítreo (GCE) .....	18
1.12. Eletrodo de Pasta de Carbono .....	19
1.13. Eletrodos Quimicamente Modificados (EQM) .....	20
1.14. Sensores utilizando líquidos iônicos e nanotubos de carbono .....	22
2. OBJETIVOS .....	23
2.1. Objetivo geral.....	23
2.2. Objetivos específicos.....	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	24
CAPÍTULO II - DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO OXOLÍNICO (AOX) EM ÁGUA POR VOLTAMETRIA DE VARREDURA ADSORTIVA (ADSV) .....	31
RESUMO .....	31
1. INTRODUÇÃO .....	32
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	35
2.1. Reagentes e solução estoque de ácido oxolínico.....	35
2.2. Medidas voltamétricas.....	36
2.3. Detecção eletroquímica de AOx e validação do método.....	37

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	38
3.1. Estabilidade da solução estoque de AOx .....	38
3.2. Escolha do eletrodo de trabalho .....	38
3.3. Comportamento voltamétrico do ácido oxolínico .....	39
3.4. Influência da velocidade de varredura de potencial .....	41
3.5. Otimização das condições analíticas .....	44
3.6. Escolha de parâmetros para DPV e SWV .....	46
3.7. Voltametria de varredura adsortiva (AdSV) .....	50
3.8. Validação do método eletroanalítico para detecção de AOx .....	52
3.8.1. Curvas Analíticas, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) .....	52
3.8.2. Precisão e exatidão do método para análise de AOx em água não tratada .....	55
3.9. Ensaio de aplicação do método voltamétrico para análise em leite .....	57
3.10. Ensaio de modificação do eletrodo de trabalho para análise de AOx .....	60
3.10.1. Ativação eletroquímica do eletrodo de trabalho .....	60
3.10.2. Modificações superficiais de eletrodo para análise de AOx .....	61
3.10.3. Modificações de composição do eletrodo de pasta de carbono (CPE) para análise de AOx .....	63
4. CONCLUSÕES .....	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	67
CAPÍTULO III - ARTIGO: METODOLOGIA PARA ANÁLISE VOLTAMÉTRICA DE SULFACLOPIRIDAZINA UTILIZANDO ELETRODO MODIFICADO COM NANOTUBOS DE CARBONO E LÍQUIDO IÔNICO EM ÁGUA E LEITE .....	73
RESUMO .....	73
1. INTRODUÇÃO .....	74
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	76
2.1. Reagentes .....	76
2.2. Equipamentos .....	77
2.3. Eletrodo de pasta de carbono (CPE) e eletrodos modificados .....	78
2.4. Avaliação do comportamento voltamétrico .....	78
2.5. Amostras de leite .....	79
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	79
3.1. Caracterização do processo redox para SCP .....	79
3.2. Eletrodo modificado .....	80
3.3. Ajuste do eletrólito de suporte para MCPE 1 .....	81
3.4. Influência da velocidade de varredura de potencial (v) em voltametria cíclica (CV) .....	83

3.5. Comportamento voltamétrico do SCP em MCPE1 por voltametria de onda quadrada (SWV).....	87
3.6. Proposta de mecanismo para redução de SCP em MCPE1.....	89
3.7. Otimização de parâmetros instrumentais para DPV e SWV .....	90
3.8. Validação do método eletroanalítico para detecção de SCP .....	94
3.8.1. Curvas Analíticas, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) .....	94
3.8.2. Precisão e exatidão do método para análise de SCP em leite hidrolisado .....	97
3.8.3. Análise de Interferentes.....	99
4. CONCLUSÕES.....	101
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	102
CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS FUTURAS .....	107

## LISTA DE SÍMBOLOS

- AdSV – Voltametria de varredura adsortiva
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- AOx – Ácido Oxolínico
- AP – Azul da prússia
- BMIMBF<sub>4</sub> – Tetrafluorborato de 1-butil-3metilimidazólio
- BR – Britton-Robinson
- CE – Eletroforese capilar
- CPE – Eletrodo de pasta de carbono
- CV – Voltametria cíclica
- DLLME – Microextração Líquido-Líquido dispersiva
- DPR – Desvio Padrão Relativo
- DPV – Voltametria de pulso diferencial
- ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática
- $E_{pa}$  – Potencial de pico anódico
- $E_{pc}$  – Potencial de pico catódico
- EQM – Eletrodo quimicamente modificado
- GCE – Eletrodo de carbono vítreo
- GC-MS – Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massas
- HPLC – Cromatografia Líquida de alta eficiência
- ICH – International Conference on Harmonization
- $I_{pa}$  – Corrente de pico anódica
- $I_{pc}$  – Corrente de pico catódica
- IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada
- LC – Cromatografia Líquida

LD – Limite de detecção

LD<sub>50</sub> – Dose letal média

LMR – Limite máximo de resíduos

LQ – Limite de quantificação

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

MCPE – Eletrodo modificado de pasta de carbono

MeOH – Metanol

MS - Espectrometria de massas

MSPD – Dispersão de matriz em fase sólida

MWCNT – Nanotubos de carbono de paredes múltiplas

PNCRC – Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes

SA - Sulfonamida

S<sub>b</sub> – Desvio padrão do branco

SCP – Sulfaclorpiridazina

SPE – Extração em fase sólida

SPME – Microextração em fase sólida

SWV – Voltametria de onda quadrada

T<sub>p</sub> – Tempo de pulso

UV-Vis – Ultravioleta-Visível

W<sub>1/2</sub> – Largura de pico à meia altura

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1. Estrutura do ácido nalidíxico (Ácido-1-etil-1,4-diidro-7-metil-4-oxo-1,8-naftiridino-3-carboxílico)..... 9

Figura 2. Potencial aplicado em função do tempo para varredura em voltametria cíclica [48]..... 15

Figura 3. (A) Perfil básico de variação de potencial em função do tempo em DPV. (B) Perfil de voltamograma obtido em DPV..... 17

Figura 4. (A) Perfil básico de variação de potencial em função do tempo em SWV; (B) Voltamogramas de onda quadrada para um sistema reversível. .... 18

Figura 5. Modelo estrutural e microscopia eletrônica de alta eficiência para o carbono vítreo. Fonte: [52, 53]..... 19

### CAPÍTULO II - DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO OXOLÍNICO (AOX) EM ÁGUA POR VOLTAMETRIA DE VARREDURA ADSORTIVA (ADSV)

Figura 6. Estrutura molecular do ácido oxolínico (AOx)..... 33

Figura 7. Avaliação da estabilidade da solução estoque de AOx, a partir da análise por de DPV em CPE de solução 100,0 mg L<sup>-1</sup> preparada em KOH 0,100 mol L<sup>-1</sup>. .... 38

Figura 8. (A) Voltamogramas de AOx 100,0 mg L<sup>-1</sup> em diferentes eletrodos de trabalho (GCE e CPE); (B) Densidade de corrente obtida para GCE e CPE. Eletrólito de suporte: KOH 0,100 mg L<sup>-1</sup>. .... 39

Figura 9. A) Voltamogramas cíclicos do a) branco e b) solução de AOx 1,00 mmol L<sup>-1</sup>. B) Voltamogramas em ciclos sucessivos: a) 1° ciclo; b) 2° ciclo; c) 3° ciclo; d) 5° ciclo; e) 10° ciclo. ( $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ ) em solução de KOH 0,100 mol L<sup>-1</sup> como eletrólito de suporte... 40

Figure 10. A) Variação da intensidade da corrente de pico anódico (IPA) em função da raiz quadrada da velocidade de varredura ( $v^{1/2}$ ) do potencial elétrico. B) Variação da função corrente ( $I_{pa}/v^{1/2}$ ) em relação a variação da velocidade de varredura de potencial em voltametria cíclica (VC) para AOx 1,00 mmol L<sup>-1</sup> em CPE e KOH 0,100 mol L<sup>-1</sup>. (A linha pontilhada indica um desvio de  $\pm 5,0 \%$  em relação ao valor médio da função corrente encontrada para todos os pontos. .... 41

Figura 11. Variação do logaritmo da corrente de pico anódico em função do logaritmo da velocidade de varredura em VC para AOx 100,0 mg L<sup>-1</sup>. Eletrólito de suporte: KOH 0,100 mol L<sup>-1</sup>. .... 42

Figura 12. (A) Variação do potencial de pico anódico em função da velocidade de varredura em VC para AOx 100,0 mg L <sup>-1</sup> . (B) Variação do potencial de pico anódico em função do logaritmo da velocidade de varredura em VC para AOx 100,0 mg L <sup>-1</sup> . Eletrólito de suporte: KOH 0,100 mol L <sup>-1</sup> .....	42
Figura 13. Proposta de mecanismo para oxidação eletroquímica do AOx em solução de KOH 0,100 mol L <sup>-1</sup> .....	44
Figura 14. (A) voltamogramas em pulso diferencial de AOx 1,00 mmol L <sup>-1</sup> usando a) KOH 0,100 mol L <sup>-1</sup> em pH 12; b) tampão BR pH 10; c) tampão carbonato pH 10 e (B) variação de I <sub>pa</sub> e E <sub>pa</sub> em função do pH da solução de KOH 0,100 mol L <sup>-1</sup> .....	45
Figura 15. Variação de I <sub>pa</sub> e largura de pico a meia altura (W <sub>1/2</sub> ) em função de (A) velocidade de varredura, (B) amplitude de pulso e (C) tempo de pulso por DPV para solução de AOx 100,0 mg L <sup>-1</sup> . Eletrólito de suporte: KOH 0,100 mol L <sup>-1</sup> .....	47
Figura 16. Variação de I <sub>pa</sub> e largura de pico a meia altura (W <sub>1/2</sub> ) em função de (A) frequência de varredura, (B) amplitude de pulso e (C) incremento de varredura por SWV para solução de AOx 100,0 mg L <sup>-1</sup> . Eletrólito de suporte: KOH 0,100 mol L <sup>-1</sup> .....	48
Figura 17. Voltamogramas obtidos sob as melhores condições em a) DPV e b) SWV para uma solução AOx 50,00 mg L <sup>-1</sup> em KOH 0,100 mol L <sup>-1</sup> .....	49
Figura 18. (A) Voltamogramas em DPV em diferentes potenciais de depósito a) + 1,05 V; b) +1,12 V; c) 1,18 V; d) 0,0 V. (B) Influência do tempo de depósito sobre a corrente de pico em solução de AOx 50,00 mg L <sup>-1</sup> em KOH 0,100 mol L <sup>-1</sup> (E <sub>D</sub> = + 1,05 V).....	51
Figura 19. (A) Voltamogramas em DPV para AOx em diferentes concentrações: a) 0,500; b) 2,00; c) 5,00; d) 10,00; e) 15,00; f) 20,00; g) 25,00; h) 30,00; i) 35,00; j) 40,00 mg L <sup>-1</sup> (inserção: variação de I <sub>pa</sub> em função da concentração de AOx) na ausência de matriz e (B) voltamogramas em DPV para AOx em diferentes concentrações: a) 2,00; b) 5,00; c) 10,00; d) 15,00; e) 20,00; f) 25,00; g) 30,00; h) 35,00; i) 40,00 mg L <sup>-1</sup> em água da lagoa da UFV (inserção: variação de I <sub>pa</sub> em função da concentração de AOx). .....	53
Figure 20. Comparação entre curvas analíticas obtidas em (a) água deionizada ultrapura e (b) em água da lagoa da UFV não tratada.....	54
Figura 21. Relações voltamétricas entre I <sub>pa</sub> e concentração em água de lagoa para fortificações de AOx em (A) 2,000 mg L <sup>-1</sup> ; (B) 20,00 mg L <sup>-1</sup> e (C) 40,00 mg L <sup>-1</sup> .....	56
Figure 22. Voltamogramas de AOx 100,0 mg L <sup>-1</sup> em diferentes proporções de nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) como modificador. Eletrólito de suporte: KOH 0,100 mol L <sup>-1</sup> . .....	58
Figure 23. Voltamogramas de análise de AOx 100,0 mg L <sup>-1</sup> por DPV de solução de leite livre de proteínas em CPE. Eletrólito de suporte: KOH 0,100 mol L <sup>-1</sup> . .....	59

Figure 24. A) voltamogramas para análise de AOx 50,00 mg L <sup>-1</sup> em leite sem lactose; (B) Voltamogramas para solução de AOx 50,00 mg L <sup>-1</sup> antes e após adições de lactose 1% (m/m) e glicose 1% (m/m). Eletrólito de suporte: KOH 0,100 mol L <sup>-1</sup> . .....	60
Figure 25. Voltamogramas para AOx 50,00 mg L <sup>-1</sup> antes e após ativação da superfície do CPE por tratamento voltamétrico em meio H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,500 mol L <sup>-1</sup> . Eletrólito de suporte: KOH 0,100 mol L <sup>-1</sup> . .....	61
Figura 26. Voltamogramas de AOx 50,00 mg L <sup>-1</sup> em diferentes proporções de nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) como modificador. ....	64
Figura 27. Voltamogramas de AOx 50,00 mg L <sup>-1</sup> em diferentes proporções de óxido de grafeno como modificador. Eletrólito de suporte: KOH 0,100 mol L <sup>-1</sup> . .....	64
Figura 28. Voltamogramas de AOx 50,00 mg L <sup>-1</sup> em diferentes proporções de CuCl <sub>2</sub> como modificador. Eletrólito de suporte: KOH 0,100 mol L <sup>-1</sup> . ....	65
Figura 29. Voltamogramas de AOx 50,00 mg L <sup>-1</sup> em diferentes proporções de azul da prússia (AP) como modificador. Eletrólito de suporte: KOH 0,100 mol L <sup>-1</sup> . ....	65
CAPÍTULO III - ARTIGO: METODOLOGIA PARA ANÁLISE VOLTAMÉTRICA DE SULFACLOPIRIDAZINA UTILIZANDO ELETRODO MODIFICADO COM NANOTUBOS DE CARBONO E LÍQUIDO IÔNICO EM ÁGUA E LEITE	
Figura 30. (A) Estrutura geral das sulfonamidas; (B) Estrutura molecular do antimicrobiano sulfaclopiridazina. ....	75
Figura 31. Voltametria cíclica de SCP 50,00 mg L <sup>-1</sup> em diferentes eletrólitos de suporte. ....	80
Figura 32. Voltamogramas de SCP 50,00 mg L <sup>-1</sup> obtidos por DPV em CPE e três eletrodos modificados (MCPE 1, MCPE 2 e MCPE 3). ....	81
Figura 33. (A) Voltamogramas DPV para uma solução de SCP 50,00 mg L <sup>-1</sup> em diferentes eletrólitos de suporte. (B) Influência de concentração de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> sobre I <sub>pc</sub> e E <sub>pc</sub> para solução de SCP. ....	82
Figura 34. A) Voltamogramas cíclicos em diferentes valores de (v) 10; 20; 30; 40; 50; 100; 150; 200 mV s <sup>-1</sup> ; B) Variação da intensidade da corrente de pico catódico (I <sub>pc</sub> ) em função da raiz quadrada da velocidade de varredura (v <sup>1/2</sup> ) do potencial elétrico; (C) variação do logaritmo da corrente de pico anódico em função do logaritmo da velocidade de varredura em VC. Solução SCP 50,00 mg L <sup>-1</sup> em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,300 mol L <sup>-1</sup> sobre MCPE 1. ....	84
Figura 35. (A) Variação do potencial de pico catódico em função da velocidade de varredura em CV para SCP 50,00 mg L <sup>-1</sup> . (B) Variação do potencial de pico catódico em	

função do logaritmo da velocidade de varredura em CV para SCP 50,00 mg L <sup>-1</sup> . Eletrólito de suporte: H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,300 mol L <sup>-1</sup> .....	85
Figura 36. Variação da função corrente ( $I_{pc} / v^{1/2}$ ) em relação a variação da velocidade de varredura de potencial em solução de SCP 50,00 mg L <sup>-1</sup> em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,300 mol L <sup>-1</sup> . * A faixa em destaque indica um desvio de ± 5,0 % em relação ao valor médio da função corrente encontrada para todos os pontos. ....	86
Figura 37. Voltamogramas em ciclos sucessivos: a) 1° ciclo; b) 2° ciclo; c) 3° ciclo; d) 5° ciclo; e) 10° ciclo. ( $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ ) em solução de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,300 mol L <sup>-1</sup> .....	86
Figura 38. (A) Voltamogramas (SWV) em diferentes frequências para SCP 50,00 mg L <sup>-1</sup> . (B) Relação entre $I_{pc}$ e raiz quadrada da frequência aplicada em SWV. ....	87
Figura 39. Variação do potencial de pico catódico em função do logaritmo da frequência de pulso em SWV para SCP 50,00 mg L <sup>-1</sup> em H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,300 mol L <sup>-1</sup> .....	89
Figura 40. Proposta de mecanismo para redução eletroquímica de SCP em MCPE 1... 90	
Figura 41. Variação de $I_{pc}$ e largura de pico a meia altura ( $W_{1/2}$ ) em função de (A) velocidade de varredura, (B) amplitude de pulso e (C) tempo de pulso por DPV para solução de SCP 50,00 mg L <sup>-1</sup> . Eletrólito de suporte: H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,300 mol L <sup>-1</sup> .....	92
Figura 42. Variação de $I_{pc}$ e largura de pico a meia altura ( $W_{1/2}$ ) em função de (A) frequência de varredura, (B) amplitude de pulso e (C) incremento de varredura ( $\Delta E$ ) por SWV para solução de SCP 50,00 mg L <sup>-1</sup> . Eletrólito de suporte: H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,300 mol L <sup>-1</sup> . ....	93
Figura 43. Voltamogramas em DPV para as seguintes concentrações de SCP: (a) 0,500; (b) 5,00; (c) 10,00; (d) 15,00; (e) 20,00; (f) 25,00; (g) 30,00; (h) 35,00; (i) 40,00 mg L <sup>-1</sup> , em água (inserção: variação de $I_{pc}$ em função da concentração de SCP).....	95
Figura 44. (A) Voltamogramas em DPV para SCP 50,00 mg L <sup>-1</sup> em soluções de (a) leite integral; (b) leite desnatado e (c) leite desnatado sem lactose. (B) Voltamogramas em DPV para SCP em leite desnatado sem lactose nas concentrações: (a) 5,00; (b) 10,00; (c) 15,00; (d) 20,00; (e) 25,00; (f) 30,00; (g) 35,00; (h) 40,00; (i) 45,00 mg L <sup>-1</sup> . (inserção: variação de $I_{pc}$ em função da concentração de SCP. ....	96
Figura 45. Relações voltamétricas entre $I_{pc}$ e concentração em leite hidrolisado sem lactose para fortificações de SCP em (A) 5,000 mg L <sup>-1</sup> ; (B) 25,00 mg L <sup>-1</sup> e (C) 45,00 mg L <sup>-1</sup> .....	98

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL

Tabela 1. Classificação de antimicrobianos ..... 8

Tabela 2. Plano de amostragem para AOx e SCP em diferentes produtos de origem animal publicado no PNCRC 2018. .... 11

### CAPÍTULO II - DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO OXOLÍNICO (AOX) EM ÁGUA POR VOLTAMETRIA DE VARREDURA ADSORTIVA (ADSV)

Tabela 3. Influência da proporção grafite/óleo mineral sobre a resposta voltamétrica de AOx. .... 46

Tabela 4. Parâmetros voltamétricos de DPV e SWV ajustados para análise de AOx..... 49

Tabela 5. Regressão linear, limites de detecção e quantificação para análises de AOx. 54

Tabela 6. Resultados para análise de recuperação aparente em diferentes concentrações de AOx..... 57

Tabela 7. Valores médios de intensidade de corrente de pico ( $I_{pa}$ ) e potencial de pico ( $E_{pa}$ ) obtidos nas modificações superficiais dos eletrodos de pasta de carbono (CPE) e carbono vítreo (GCE), utilizando-se dispersão em água deionizada e etanol..... 62

### CAPÍTULO III - ARTIGO: METODOLOGIA PARA ANÁLISE VOLTAMÉTRICA DE SULFACLOPIRIDAZINA UTILIZANDO ELETRODO MODIFICADO COM NANOTUBOS DE CARBONO E LÍQUIDO IÔNICO EM ÁGUA E LEITE

Tabela 8. Técnicas analíticas comuns para determinação de SCP. .... 76

Tabela 9. Descrição de reagentes utilizados. .... 77

Tabela 10. Variáveis instrumentais das técnicas DPV e SWV para análise de SCP. .... 94

Tabela 11. Regressão linear, LD e LQ para análises de SCP..... 97

Tabela 12. Resultados de recuperação aparente e precisão para análise de SCP em diferentes concentrações adicionadas em amostra de leite hidrolisado. .... 99

Tabela 13. Efeito de adição de lactose e cálcio sobre a resposta voltamétrica de SCP 50,00 mg L<sup>-1</sup> em MCPE 1..... 100

## RESUMO

ALEIXO, Herbert, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2018. **Desenvolvimento de Métodos Voltamétricos para Análise de Antimicrobianos em Água e Leite.** Orientador: Leonardo Luiz Okumura.

Este trabalho teve como objetivo propor métodos voltamétricos e a aplicação inédita destes para análise de dois antimicrobianos de uso veterinário em água e leite. Até o momento nenhum método voltamétrico havia sido proposto para análise direta do Ácido Oxolínico (AOx) e da Sulfaclopiridazina (SCP). Assim toda caracterização dos processos de oxirredução destes compostos desde a escolha do eletrólito de suporte até as otimizações das técnicas voltamétricas para cada um dos antimicrobianos foi necessária antes da aplicação do método em amostras. Para análise de AOx foi utilizado um eletrodo de pasta de carbono (CPE) e KOH 0,100 mol L<sup>-1</sup> foi usado como eletrólito de suporte. Nestas condições a caracterização por voltametria cíclica indicou um pico anódico irreversível em aproximadamente + 1,15 V (vs. Ag|AgCl, KCl<sub>3M</sub>). A quantificação foi realizada por voltametria de varredura adsortiva (AdSV), fixando-se um potencial elétrico por tempo determinado para adsorção do analito à superfície do eletrodo de trabalho seguido de uma varredura por voltametria de pulso diferencial (DPV). O método foi aplicado e validado para análise de AOx em água não potável coletada na lagoa do campus da Universidade Federal de Viçosa, sendo obtidos resultados variando de 98,4 a 109 % de exatidão nas medidas para AOx. O processo de oxirredução para SCP também foi descrito utilizando-se um eletrodo de pasta de carbono modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs) e líquido iônico tetrafluorborato de 1-butil-3-metilimidazólio (BMIMBF<sub>4</sub>). Diferentes composições de pó de grafite e dos modificadores do eletrodo foram avaliadas, assim como diferentes eletrólitos de suporte e pH para a detecção de SCP. As melhores condições de trabalho foram então obtidas em meio de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,300 mol L<sup>-1</sup> como eletrólito de suporte e 5 % (% m/m) de cada um dos modificadores, observando-se com maior evidência um processo catódico irreversível, que foi validado para aplicação em análise de SCP em leite hidrolizado obtendo-se exatidão de 94,5 a 105,7 %.

## ABSTRACT

ALEIXO, Herbert, D.Sc., Federal University of Viçosa, April, 2018. **Development of Voltammetric Methods for Analysis of Antimicrobials in Water and Milk.** Adviser: Leonardo Luiz Okumura.

This work aimed to propose voltammetric methods and the unprecedented application of these methods for the analysis of two antimicrobials for veterinary use in water and milk. To date, no voltammetric method has been proposed for direct analysis of Oxolinic Acid (AOx) and Sulphlorpyridazine (SCP). Therefore characterization of the redox processes of these compounds from the choice of the support electrolyte to the optimizations of the voltammetric techniques for each one of the antimicrobials was necessary before the application of the method in samples. For AOx analysis, a carbon paste electrode (CPE) was used as working electrode and KOH 0,100 mol L<sup>-1</sup> as support electrolyte. Under these conditions the cyclic voltammetry characterization indicated an irreversible anode peak at approximately + 1.15 V (vs. Ag | AgCl, KCl<sub>3M</sub>). The quantification was performed by adsorptive sweep voltammetry (AdSV), fixing a time-determined electrical potential for adsorption of the analyte to the surface of the working electrode followed by a differential pulse voltammetry (DPV) scan. The method was applied and validated for AOx analysis in non-potable water collected in the Campus Lagoon of the Federal University of Viçosa, obtaining results varying from 98,4 to 109% accuracy in AOx measurements. The redox process for SCP has also been described using a carbon paste electrode modified with multiple-walled carbon nanotubes (MWCNTs) and ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate (BMIMBF<sub>4</sub>). Different graphite powder and modifiers compositions were evaluated as well as different support electrolytes and pH for the detection of SCP. The best working conditions were obtained in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.300 mol L<sup>-1</sup> medium as carrier electrolyte and 5% (% w/w) of each of the modifiers, with an irreversible cathodic process that was validated for application in SCP analysis in hydrolyzed milk, obtaining an accuracy of 94.5 to 105.7%.

## CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL

---

## **CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL**

### **1.1. Medicamentos Veterinários**

Entende-se por medicamento veterinário toda substância química, biológica, ou preparação manufaturada cuja administração seja aplicada de forma individual ou coletiva, direta ou misturada aos alimentos, destinada à prevenção, ao diagnóstico, à cura ou ao tratamento das doenças dos animais, incluindo os aditivos, suprimentos promotores, melhoradores da produção animal, medicamentos, vacinas, antissépticos, desinfetantes de uso ambiental ou equipamentos, pesticidas e todos os produtos que, utilizados nos animais ou no seu habitat, protejam, restaurem ou modifiquem suas funções orgânicas e fisiológicas, bem como os produtos destinados ao embelezamento dos animais [1].

Os medicamentos veterinários estão sendo usados em grande escala devido às práticas agrícolas modernas e às necessidades econômicas de crescimento da produção, que muitas vezes por falta de planejamento podem ocasionar sérios danos ao meio ambiente, aos pequenos produtores que vivem da agricultura familiar e ao consumidor dos produtos animais. Assim, torna-se evidente a necessidade de uma política de desenvolvimento sustentável que possibilitem a diminuição de impactos da agroindústria em escala ambiental, social e econômica. O Brasil sendo um dos maiores exportadores de carne bovina, suína, frango e peixes, obtendo-se um faturamento de US\$ 2,8 bilhões e exportando cerca de 736.000 toneladas de carne bovina no período de janeiro a junho de 2016 [2].

Os resíduos de medicamentos veterinários são mais comuns em alimentos de origem animal, sobretudo quando estes animais recebem a droga por via injetável ou via oral [3]. A maioria dos medicamentos veterinários é administrada como aditivos em rações ou na água dos animais para prevenir patologias ou melhorar o crescimento destes e, também como agentes terapêuticos [4].

Os medicamentos veterinários são subdivididos em classes de acordo com suas funções terapêuticas: biológicos, antiparasitários, antimicrobianos, terapêuticos, suplementos alimentares e outros [5].

Assim como todo medicamento, os resíduos destes medicamentos utilizados em medicina veterinária podem acarretar danos ao meio ambiente, seja contaminando solos, corpos d'água e conseqüentemente, chegando a outros animais e seres humanos e se tornando um problema de saúde pública.

## **1.2. Monitoramento de Medicamentos Veterinários**

No Brasil, a fiscalização sobre o comércio, a fiscalização e o monitoramento da utilização de produtos veterinários compete ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, determinando normas que orientem produtores, veterinários e consumidores sobre o uso consciente destes produtos [6]. Dentre todos os produtos comercializados e com o aumento da produtividade agropecuária, o MAPA instituiu em 1986 o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC) que foi aprimorado em 1995. O PNCRC tem como funções principais o controle e a vigilância sobre os produtos comercializados, visando impedir a extrapolação dos limites máximos de resíduos (LMR's) de substâncias permitidas, assim como a ocorrência de outras não autorizadas pela legislação do país. O programa baseia-se na coleta de diversas amostras de animais abatidos e vivos ou produtos derivados da produção animal, destinados a alimentação humana [7].

É cada vez maior a preocupação pública em relação a estes medicamentos veterinários e os seus possíveis efeitos na saúde humana e em espécies animais importantes para o equilíbrio do ecossistema. Tais substâncias que incluem os hormônios naturais e sintéticos, fitoestrógenos, pesticidas, compostos utilizados na indústria são suspeitas de causar alteração no sistema endócrino, além de apresentar uma variedade de rotas de exposição no ambiente e estão potencialmente associadas a doenças, como o câncer de testículo, de mama e de próstata, alterações dos órgãos

reprodutivos, disfunções da tireoide e problemas relacionados ao sistema nervoso [8].

Assim como as substâncias capazes de interferir no sistema endócrino, outra grande preocupação dos cientistas é com o grupo dos antimicrobianos [9].

### **1.3. Antimicrobianos**

Antimicrobianos são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de fungos ou bactérias.

A classe dos antimicrobianos pertence a uma das categorias de medicamentos mais utilizados em medicina veterinária, utilizadas com a finalidade de reduzir a mortalidade de animais em função de agentes patogênicos, além de auxiliar o crescimento animal e a produtividade em diversas áreas da agropecuária. Entretanto, seu uso indiscriminado acarreta sérios danos ao meio ambiente e à saúde humana, podendo causar reações alérgicas por contato direto de pessoas com sensibilidade aos princípios ativos.

O uso de antimicrobianos não autorizados ou o não cumprimento das orientações de administração dos antimicrobianos autorizados pode resultar na presença de níveis elevados de resíduos de antimicrobianos nos produtos alimentares. Por este motivo, o controle de resíduos de antimicrobianos em alimentos deve constituir um programa de vigilância e o conhecimento da dimensão da exposição da população a esses compostos é de fundamental importância para nortear as ações de controle, visando à proteção do consumidor [10].

A utilização dos antimicrobianos não está restrita aos tempos recentes de desenvolvimento da medicina. Os primeiros relatos de seu uso datam de, aproximadamente, três mil anos quando os chineses utilizaram casca de soja mofada para o tratamento furúnculos, abscessos e infecções similares [11]. Resquícios de tetraciclina foram encontrados em esqueletos humanos da antiga Núbia Sudanesa, datados de 350 a 550 dC [12,13]. Também durante a Idade Média, substâncias de diferentes origens eram utilizadas como

antimicrobianos, mas, sem o conhecimento de suas propriedades químicas. Apenas a partir do século XVI, com o desenvolvimento das práticas laboratoriais, é que se tornou possível o estudo dos medicamentos usados pela medicina popular.

As bactérias foram identificadas pela primeira vez por van Leeuwenhoek por volta dos anos 1670, após a invenção do microscópio. Porém, somente no século XIX a possibilidade destes micro-organismos serem causadores de processos infecciosos começou a ser levantada. Esta hipótese surgiu após os elegantes experimentos de Louis Pasteur, que demonstrou que algumas linhagens de bactérias eram importantes para processos de fermentação e, também, que as bactérias eram de ampla distribuição pelo meio ambiente [14].

O pesquisador Paul Ehrlich foi responsável pelos conceitos primários de que uma substância química poderia interferir com a proliferação de micro-organismos, em concentrações toleráveis pelo hospedeiro. Em 1910, Ehrlich desenvolveu o primeiro antibiótico de origem sintética, o Salvarsan, usado contra sífilis [15]. Em setembro de 1928, Alexander Fleming avaliando propriedades antibacterianas conhecidas do mofo e buscando resolver problemas como a purificação e a estabilidade de substâncias ativas do mofo, isolou o *Penicillium* [16] e alguns anos depois um equipe de Oxford sendo liderados por Howard Florey e Ernest Chain publicaram um artigo descrevendo a purificação de quantidade suficiente de penicilina suficiente para testes clínicos [17].

Em 1935 Gerhard Domagk descobriu que o corante vermelho prontossil apresentava atividade in vivo contra infecções causadas por espécies de *Streptococcus*. No mesmo período, a descoberta da penicilina por Alexander Fleming ocorreu enquanto ele estudava culturas de *Staphylococcus aureus*, revolucionando o tratamento das infecções bacterianas. A atividade da penicilina era superior à das sulfas estudadas por Domagk e a demonstração de que fungos produziam substâncias capazes de controlar a proliferação bacteriana motivou uma nova frente de pesquisas na busca de antimicrobianos [18]. Sua metodologia, então levou à produção e distribuição em larga escala em 1945.

A descoberta dos três primeiros antimicrobianos, Salvarsan, Prontosil e penicilina, foi de grande importância, pois esses estudos estabeleceram os paradigmas para futuras pesquisas sobre descoberta de drogas. Após o processo de industrialização da penicilina, durante a Segunda Guerra Mundial, foi observado um rápido crescimento no desenvolvimento de novos antimicrobianos. Os caminhos, seguidos por outros pesquisadores, resultaram em uma série de novos antibióticos, alguns dos quais chegaram até o leito do paciente. O período entre as décadas de 1950 e 1970 foi de fato a era de ouro da descoberta de novas classes de antibióticos, sem novas classes descobertas desde então. Após esse período o declínio da taxa de descoberta de novos antibióticos se deu de forma natural, e o foco principal para o desenvolvimento de novos medicamentos voltou-se para o combate à resistência emergente de patógenos aos antimicrobianos já existentes [19].

Mesmo antes do uso extensivo da penicilina, algumas observações sugeriram que as bactérias poderiam destruí-la por degradação enzimática [20]. Este fato ocorre devido à exposição repetida a um antibiótico pode levar ao surgimento de subpopulações seletivas da mesma bactéria ou de bactérias relacionadas, agora resistentes ao agente terapêutico. Os Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) observam que aproximadamente 2 milhões de pessoas são infectadas com bactérias que são resistentes a antibióticos, e aproximadamente 23.000 pessoas morrem anualmente por causa dessas infecções [21]. Mecanismos de resistência microbiana incluem permeabilidade celular alterada (levando a uma concentração intracelular muito diminuída da droga), aumento do efluxo do antibiótico da célula, e elaboração de enzimas desativadoras que alteram a interação do antibiótico nos locais de ligação dentro da parede celular ou citoplasma [22].

Os mecanismos de resistência bacteriana geralmente podem variar desde a redução da permeabilidade da membrana celular nos compostos beta-lactâmicos, quinolonas e vancomicina. A resistência microbiana às tetraciclinas e quinolonas é frequentemente mediada pelo aumento do efluxo do antibiótico da célula. A desativação enzimática pelas beta-lactamases é o mecanismo comum de resistência a penicilinas e cefalosporinas. A resistência aos aminoglicosídeos pode resultar do transporte alterado da membrana

citoplasmática (influxo) ou de enzimas intracelulares (por exemplo, fosfotransferases e acetiltransferases) que desativam a droga. Estes mecanismos de resistência podem ser adquiridos através de mutações nos genes que codificam para o alvo ou proteínas de transporte afetadas. Como as células bacterianas sem as mutações adaptativas sucumbem à ação do antibiótico, a subpopulação que possui a mutação adaptativa continua a se replicar, substituindo a população original por uma resistente [23]. Além de conduzir à resistência antimicrobiana tanto em bactérias do intestino humano e animal, como em bactérias comuns do meio ambiente, que em meio aquático possibilitam a disseminação de diversas classes de bactérias resistentes [24].

Os antimicrobianos podem ser classificados segundo inúmeros critérios, dentre eles: estrutura química, ação biológica, espectro e mecanismo de ação e origem. Segundo o critério de estrutura química eles podem ser: derivados de aminoácidos, derivados de açúcares ou derivados de acetatos e proprionatos. De acordo com a origem ou processo de obtenção podem ser: naturais (obtidos por fermentação), biossintéticos (obtidos de um precursor de fermentação), sintobióticos (obtidos exclusivamente por síntese) ou semissintéticos (obtidos por fermentação e síntese) [25].

Segundo sua ação biológica podem ser: bactericidas, quando causam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos, quando promovem a inibição do crescimento microbiano.

De modo geral os antimicrobianos podem ser classificados por diversas variáveis como observa-se na Tabela 1 [26]:

**Tabela 1. Classificação de antimicrobianos**

<b>VARIÁVEL</b>	<b>CLASSIFICAÇÃO</b>	<b>EXEMPLO</b>
Mecanismos suscetíveis	Antibacterianos	Beta-lactâmico
	Antifúngicos	Griseofulvina
	Antivirais	Aciclovir
	Antiparasitários	Piremetamina
Origem do Antimicrobiano	Antibióticos produzidos por microorganismos	Aminoglicosídeo
	Quimioterápicos: sintéticos	Sulfonamidas
Atividade antibacteriana	Bactericida	Quinolonas
	Bacteriostático	Macrolídeo
Mecanismo de ação	Alteração da parede celular	Beta-lactâmico
	Alteração da membrana citoplasmática	Anfotericina B
	Interferência na replicação cromossômica	Antifúngicos/antivirais
	Inibição síntese protéica	Aminoglicosídeos
	Inibição metabólica	Sulfonamida
Espectro de ação	Gram positivas (*)	Penicilina
	Gram negativas (**)	Aminoglicosídeos
	Ampla espectro	Cloranfenicol
	Ativo sobre protozoários	Tetraciclina
	Ativo sobre fungos	Nistadina
	Ativo sobre espiroquetas	Eritromicina
	Ativo sobre riquetsias, micoplasma e clamídias	Macrolídeo
	Ativo sobre micobactérias	Estreptomicina
	Ativo sobre algas	Anfotericina B

(\*)possuem parede celular com uma única e espessa camada de peptidoglicanos. Quando este tipo bacteriano entra em contato com a coloração de Gram adquirem a cor púrpura ou azul quando fixada com cristal violeta.

(\*\*)possuem parede celular mais delgada e apresentam uma segunda membrana lipídica, diferente da membrana plasmática. Quando em contato com a coloração Gram o lipídio da membrana mais externa é dissolvido no álcool e libera o primeiro corante, o cristal violeta.

#### 1.4. Ácido oxolínico (AOx) e Sulfacorpiridazina (SCP)

O ácido oxolínico (AOx) é um composto antimicrobiano do grupo das quinolonas, derivado do ácido nalidíxico. Atua principalmente contra bactérias gram-negativas, em especial contra a bactéria *Enterobacteriaceae* [27]. Sua atuação se dá por inibição da DNA girase ou DNA topoisomerase [28]. O composto é autorizado em medicina veterinária em peixes, porcos, bovinos e aves.

Sua toxicidade é baixa em animais adultos, sendo seus valores de LD<sub>50</sub> em ratos adultos acima de 1890 mg kg<sup>-1</sup>, entretanto esse valor de LD<sub>50</sub> diminui aproximadamente 10 vezes quando avaliado em ratos recém nascidos [29].

O período de 1980-2000 marcou o mercado de antimicrobianos pela introdução da classe das fluoroquinolonas sintéticas desenvolvidas a partir do ácido nalidíxico (Figura 1).

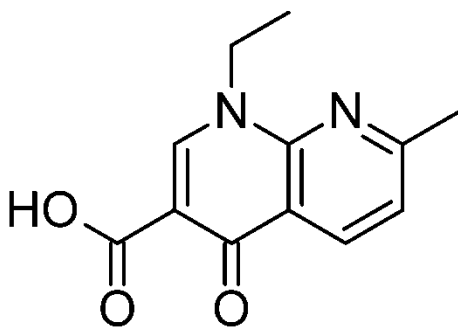


Figura 1. Estrutura do ácido nalidíxico (Ácido-1-etil-1,4-diidro-7-metil-4-oxo-1,8-naftiridino-3-carboxílico).

Na década de 70, foram introduzidos na medicina terapêutica dois outros compostos relacionados com o ácido nalidíxico, o ácido oxolínico e a cinoxacina.

Pequenas diferenças estruturais no núcleo das quinolonas permitem dividi-las em quatro grupos: naftiridinas, cinolinas, piridopirimidinas e quinolinas. Modificações estruturais dos grupos químicos ligados ao núcleo básico 4-quinolona produziram importantes alterações na atividade

antimicrobiana, nas propriedades farmacocinéticas e na toxicidade das quinolonas [29].

O principal método de análise aplicado para o AOx é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) [29, 30].

A sulfaclopiridazina (SCP) é uma sulfonamida sintética derivada da sulfanilamida. O composto é utilizado tanto para o tratamento de infecções do trato urinário quanto na medicina veterinária e em piscicultura. A SCP é um antimicrobiano de largo espectro, efetivo contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, atuando como interferente na síntese do DNA bacteriano. A SCP é particularmente resistente a métodos comuns de biorremediação, sendo assim de grande importância o desenvolvimento de métodos para detecção e remediação deste contaminante [31].

No Brasil, tanto AOx quanto a SCP são monitorados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) em diferentes matrizes de origem animal e divulgados no Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC). A amostragem realizada pelo MAPA e os valores de limite máximo de resíduo (LMR) para os dois antimicrobianos na avaliação mais recente publicada no PNCRC de 2018 está descrita na Tabela 2 [32].

**Tabela 2. Plano de amostragem para AOx e SCP em diferentes produtos de origem animal publicado no PNCRC 2018.**

PLANO DE AMOSTRAGEM DE <b>CARNES</b> – PNCRC 2018						
Substância	Matriz analisada	Limites de referência ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )				N° de amostras
		Bovinos	Equinos	Suínos	Aves	
Ác. Oxolínico	Músculo	100	100	100	100	Bovinos – 600 Equinos – 8 Suínos – 600 Aves – 600
Sulfaclopiridazina	Músculo	100*	100*	100*	100*	
PLANO DE AMOSTRAGEM DE <b>LEITE</b> – PNCRC 2018						
Substância	Matriz analisada	Limites de referência ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )				N° de amostras
Ác. Oxolínico	Leite	20				
Sulfaclopiridazina	Leite	100*				600
PLANO DE AMOSTRAGEM DE <b>PESCADOS</b> – PNCRC 2018						
Substância	Matriz analisada	Limites de referência ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )		N° de amostras		
		Peixe de Cultivo	Camarão de Cultivo			
Ác. Oxolínico	Músculo	100	---	Peixe de Cultivo – 60 Camarão – 60		
Sulfaclopiridazina	Músculo	100*	100*			
PLANO DE AMOSTRAGEM DE <b>OVOS</b> – PNCRC 2018						
Substância	Matriz analisada	Limites de referência ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )				N° de amostras
Ác. Oxolínico	Ovos	10				
Sulfaclopiridazina	Ovos	10*				300

\* LMR<sub>s</sub> para o somatório de todas as sulfonamidas presentes na amostra. Valores de LMR específicos para SCP não são definidos.

### 1.5. Contaminação por antimicrobianos

O uso de fármacos na aquicultura e no trato de criações intensivas (bovinos, suínos e aves) representa a principal via de entrada de antimicrobianos no ambiente, podendo ocasionar a contaminação de ambientes tanto aquáticos quanto terrestres [33]. Os resíduos de antimicrobianos podem contaminar o meio ambiente de forma direta por meio de excreções ou pela utilização de esterco contaminados na fertilização do solo. O consumo de água contaminada com material fecal é uma importante via de exposição. Tanto o tipo de substância quanto a dosagem utilizada ou a

espécie do animal podem alterar a quantidade de medicamento que atinge o solo ou a água [34]. Outro fator agravante é o fato de que em alguns casos até 95% dos medicamentos passa pelo trato intestinal dos animais sem sofrer qualquer processo metabólico [35], ou mesmo que degradados, alguns produtos do metabolismo não perdem sua atividade. Sem mencionar a possibilidade de que medicamentos não utilizados ou fora do prazo de validade sejam descartados diretamente no ambiente por descaso ou falta de informação. As principais vias de contaminação do ambiente podem ser, além do esterco animal, as lagoas de tratamento de resíduos construídas de maneira inadequada. Estas podem sofrer escoamento ou lixiviação dos resíduos chegando às águas superficiais e lençóis freáticos. Além disso, muitas vezes o próprio efluente ou o lodo das lagoas de tratamento é utilizado como fertilizante orgânico [36]. Além destas formas de contaminação há ainda os antimicrobianos aplicados diretamente em águas superficiais para a prática da aquicultura, podendo acumular grandes quantidades de resíduos destes compostos, alterando o ecossistema aquático da região [37].

Estudos específicos revelam diversos aspectos toxicológicos do descarte de medicamentos principalmente para fármacos em meio aquático e o impacto da mistura de diferentes fármacos no ambiente, que pode resultar em efeitos de toxicidade mais pronunciados do que aqueles causados por um único composto [38]. Outro estudo conduzido em 2005 mostra que misturas de diferentes compostos se comportam de forma imprevisível em meio aquático, e causam sérios efeitos em *Daphnia magna*, organismo aquático que funciona como biorregulador e muito utilizado em teste de laboratório para avaliar o risco de toxicidade como deformidades e aumento na mortalidade [39].

No que se refere ao tratamento de resíduos existem diferentes tipos de procedimentos, porém de forma geral, o gerenciamento de resíduos ainda é deficiente, tanto no tratamento quanto na disposição final destes medicamentos que podem se tornar tóxicos ao meio ambiente e ao homem, o que demonstra a necessidade de mais pesquisas sobre monitoramento e tratamento de efluentes [40].

## **1.6. Métodos eletroanalíticos**

Os métodos eletroquímicos de análise (eletroanalíticos) englobam uma série de técnicas nas quais são relacionadas grandezas elétricas como carga, potencial e corrente, assim como as reações químicas associadas aos fenômenos elétricos [41]. Esses métodos possuem numerosas aplicações, tais como estudos de processos de oxidação e redução em vários meios e mecanismos de transferências de elétrons [42]. Uma das particularidades dos métodos eletroanalíticos é a possibilidade, em diversos casos, de análise direta da amostra, sem necessidade de etapas de separação ou pré-tratamento da mesma, sendo possível ainda analisar amostras coloridas ou com partículas sólidas dispersas no meio, o que torna o método muito útil para aplicação nas áreas de análise ambiental, industrial e biológica [43]. Embora em algumas análises seja necessário o uso de etapas de eliminação de interferentes, estas são mais simples quando comparadas a outras metodologias de preparação para aplicação em cromatografia, que também requer a utilização de uma instrumentação mais dispendiosa [44]. Atualmente, dependendo do analito e do tipo de matriz avaliado, a sensibilidade de alguns métodos eletroanalíticos pode se aproximar ou se igualar aos valores obtidos por técnicas cromatográficas e espectroscópicas.

Outra aplicação atual das técnicas eletroanalíticas na área ambiental é possibilitar os estudos de processos de degradação de agrotóxicos e avaliação dos mecanismos de redução e/ou oxidação eletroquímica, que podem auxiliar o estudo de formação de produtos intermediários tóxicos, ao homem e ao meio ambiente [45].

Dentre as diversas técnicas eletroanalíticas existentes, a voltametria é umas das técnicas de maior aplicação em análises de resíduos. A voltametria é uma técnica de potencial controlado e dinâmica (corrente elétrica  $\neq 0$ ) em que estudam os processos de transferência de carga que ocorrem na interface eletrodo/solução. Nesta técnica o potencial elétrico é variado de forma controlada para obter-se uma reação de transferência de elétrons (redução ou oxidação) entre o analito e a superfície do eletrodo de trabalho e a corrente resultante desta reação é medida. A resposta gráfica obtida da corrente versus o potencial é denominada voltamograma e possibilita a obtenção de dados quantitativos e qualitativos das espécies envolvidas na reação [46].

A técnica precursora da voltametria foi a polarografia, desenvolvida pelo químico Jaroslav Heyrovsky em 1922 e que ainda é um ramo importante da voltametria, em que utiliza-se a superfície de uma gota de mercúrio líquido como eletrodo de trabalho [47]. Atualmente a célula eletroquímica convencionalmente utilizada é composta por três eletrodos imersos em uma solução contendo o analito e também um eletrólito de suporte que deve ser preferencialmente inerte, em concentração aproximadamente 100 vezes maior que a concentração do analito, facilitando a condutividade do sistema e garantindo uma força iônica constante, além de ser utilizado em muitos casos um tampão para controlar o pH do meio [46].

O sistema usual de três eletrodos consiste em um eletrodo de trabalho, onde ocorrem as reações de oxirredução de acordo com o potencial elétrico aplicado sobre ele, um eletrodo de referência e um contra-eletrodo ou eletrodo auxiliar. Os eletrodos de trabalho comuns podem ser sólidos metálicos como ouro e platina ou de outros materiais como carbono vítreo, pasta de carbono ou diamante dopado com boro, dentre outros. Ou ainda pode ser utilizada a gota de mercúrio em técnicas polarográficas. Todo o controle de potencial é realizado por um potenciostato/galvanostato frente a um eletrodo de referência de potencial constante, podendo este ser um eletrodo de  $\text{Hg}|\text{Hg}_2\text{Cl}_2$  (calomelano) ou mais frequentemente um eletrodo de  $\text{Ag}|\text{AgCl}$ . O terceiro eletrodo é um eletrodo auxiliar ou contra-eletrodo que atua quando é aplicada uma diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência, diminuindo sua resistência de modo que toda corrente elétrica gerada flua entre o eletrodo de trabalho e o contra-eletrodo, evitando alterações no eletrodo de referência [41].

As técnicas voltamétricas mais aplicadas são a voltametria cíclica (CV), voltametria de pulso diferencial (DPV) e voltametria de onda quadrada (SWV). Todas essas técnicas tem em comum a resposta de corrente dada em função de uma varredura de potencial e tendo como diferencial a forma como o potencial elétrico é aplicado em função do tempo, assim como a forma de obtenção da corrente medida durante o intervalo de potencial.

## 1.7. Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica (VC) é largamente utilizada como critério de diagnóstico dos processos redox que acontecem na interface entre o eletrodo de trabalho e a solução de análise. Utilizando-se como variáveis a intensidade de corrente de pico ( $I_p$ ), a velocidade de varredura de potencial ( $v$ ) e os potenciais de pico ( $E_p$ ), é possível identificar processos de oxidação, redução e de adsorção/dessorção, o número de etapas envolvidas no processo eletródico ou a reversibilidade do mesmo [41]. A voltametria cíclica, como a sua própria denominação sugere, envolve a aplicação de ciclos nos quais a variação (linear) de potencial elétrico é realizada no sentido catódico (redução) ou anódico (oxidação) em um intervalo definido e, então o sentido de varredura é invertido, geralmente, até o valor inicial da varredura de potencial. O processo é realizado a uma velocidade de varredura constante e apresenta o perfil de variação de potencial elétrico semelhante ao apresentado na Figura 2, podendo ser realizados um ou mais ciclos sucessivos.

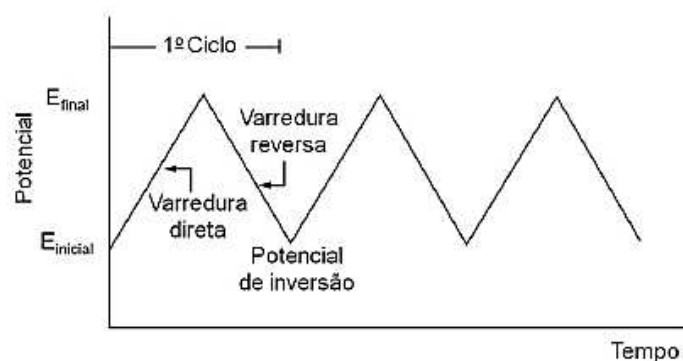


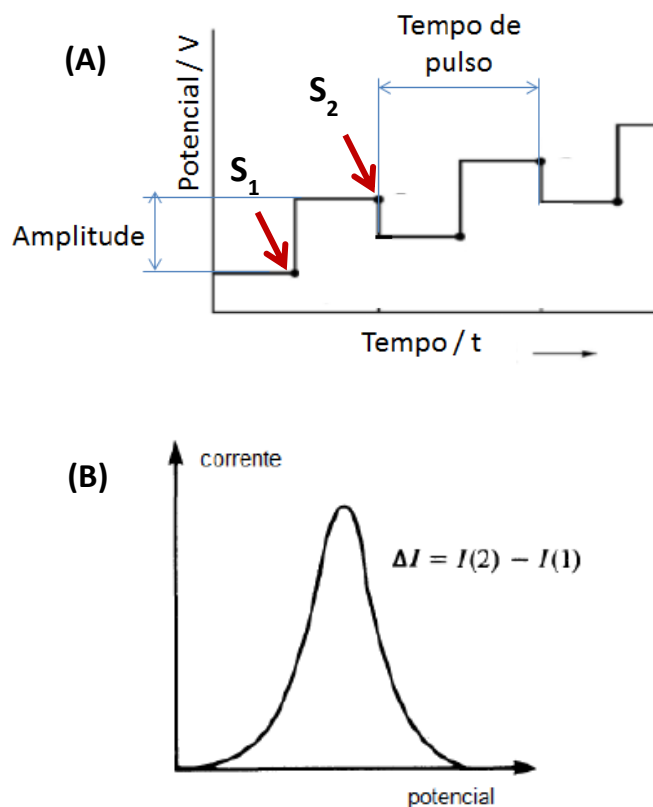
Figura 2. Potencial aplicado em função do tempo para varredura em voltametria cíclica [48].

A voltametria cíclica tem larga utilização em análises qualitativas, entretanto não é aplicada normalmente para fins de quantificação de baixas concentrações de analito, uma vez que o modo de variação linear de potencial

não permite a discriminação entre a corrente faradáica, gerada por processos de oxidação ou redução de espécies eletroativas e a corrente capacitiva, originada do processo de carregamento da dupla camada elétrica na superfície do eletrodo de trabalho [41].

### 1.8. Voltametria de Pulso Diferencial

Com a finalidade de minimizar a contribuição da corrente capacitiva nas medidas voltamétricas utilizam-se as técnicas de pulso. A primeira delas é a voltametria de pulso diferencial (DPV). Na voltametria de pulso diferencial (DPV), do inglês “differential pulse voltammetry”, pulsos de amplitude fixos sobrepostos a uma rampa de potencial crescente são aplicados ao eletrodo de trabalho [49]. A corrente é medida duas vezes, uma antes da aplicação do pulso e outra ao final do pulso, nos pontos assinalados por “S1 e S2” na Figura 3. A primeira corrente é instrumentalmente subtraída da segunda, e a diferença das correntes é plotada versus o potencial aplicado. O voltamograma resultante consiste de picos de corrente de forma gaussiana, cuja área deste pico ou a altura é diretamente proporcional à concentração do analito [49].



**Figura 3. (A) Perfil básico de variação de potencial em função do tempo em DPV. (B) Perfil de voltamograma obtido em DPV.**

O objetivo de se realizar duas leituras da corrente e de se trabalhar com a diferença entre elas, é diminuir a influência da corrente capacitiva. À medida que se aplica o pulso, ocorre um decréscimo da contribuição da corrente capacitiva e da corrente faradáica, mas a corrente capacitiva diminui exponencialmente, enquanto que a corrente faradáica diminui linearmente; assim, escolhendo-se um tempo apropriado para fazer a segunda leitura, faz-se a leitura da corrente total a um valor de corrente onde a contribuição da corrente capacitiva pode ser desconsiderada.

### **1.9. Voltametria de onda quadrada**

A voltametria de onda quadrada (SWV), do inglês “square-wave voltammetry”, tem a aplicação de pulsos de potencial de forma semelhante a DPV entretanto, a técnica utiliza uma variação de potencial na forma de onda, aliada a uma rampa de potencial na forma de escada. De modo geral, são aplicados pulsos de forma simétrica, tanto no sentido direto quanto no sentido reverso da varredura. A corrente medida é a resultante da soma dessas duas correntes, o que permite aumentar a sensibilidade da técnica. A Figura 4A mostra o esquema básico de aplicação de pulsos em onda quadrada e o perfil de um voltamograma para um sistema reversível obtido por SWV (Figura 4B). Em sistemas totalmente irreversíveis tende-se a observar uma menor amplificação da medida de corrente resultante, pois a contribuição de corrente elétrica faradáica na varredura reversa é pouco significativa.

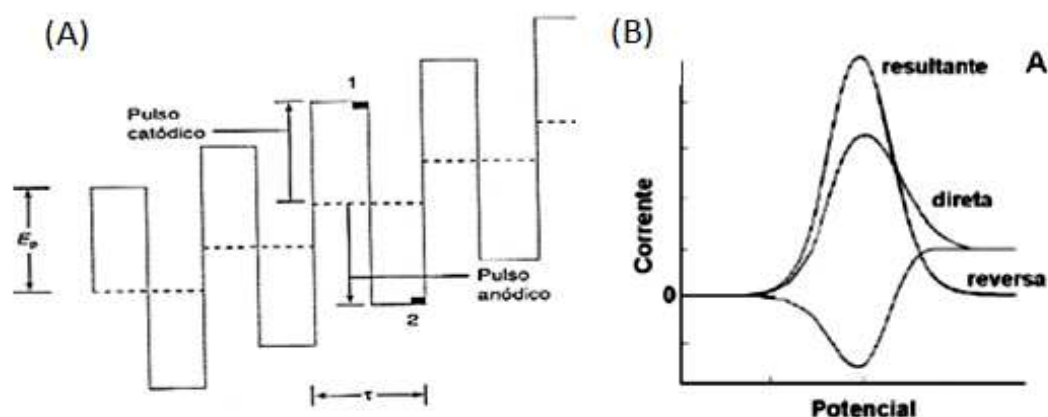


Figura 4. (A) Perfil básico de variação de potencial em função do tempo em SWV; (B) Voltamogramas de onda quadrada para um sistema reversível.

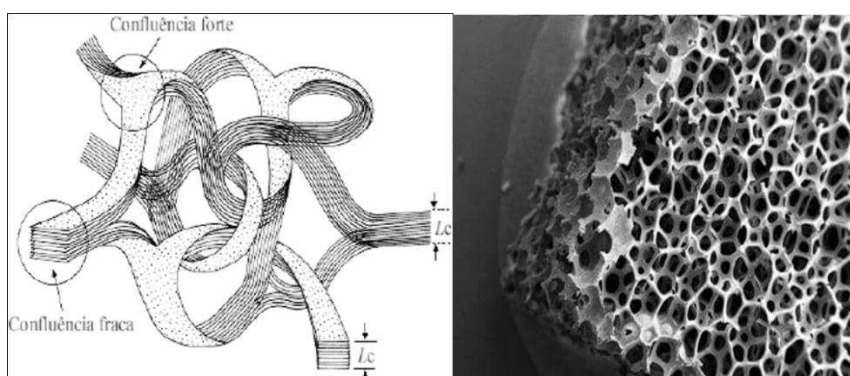
### 1.10. Eletrodos de trabalho

A base de eletroanálise é a reação na superfície do eletrodo de trabalho. O tipo de eletrodo de trabalho utilizado pode influenciar fortemente na eficiência das reações, portanto suas propriedades são essenciais para o sucesso do método proposto. O eletrodo de trabalho deve apresentar alta razão sinal-ruído e boa precisão intermediária [50]. Além disso, fatores como o intervalo de potencial, propriedades mecânicas e o custo de fabricação devem ser considerados para a escolha adequada de um eletrodo de trabalho [43]. Eletrodos a base de carbono tem sido largamente usados em eletroanalítica. Devido às propriedades do carbono estes eletrodos são muito propensos à transferência de elétrons, além de outros fatores favoráveis ao seu uso, como ampla janela de potencial de trabalho, baixa corrente de fundo, as possibilidades de funcionalização de sua superfície e seu baixo custo.

### 1.11. Eletrodo de Carbono Vítreo (GCE)

O carbono vítreo como material utilizado na confecção de eletrodos foi desenvolvido em 1962 a partir de uma resina fenólica. Os materiais de carbono vítreo podem ser formados por meio de um programa de aquecimento controlado (acima de 1200 °C) de um material de resina polimérico (fenol-formaldeído) em uma atmosfera inerte [51].

Sua estrutura apresenta propriedades físicas interessantes em comparação com outros alótropos de carbono. Primeiramente, o seu método de formação permite que os artefatos produzidos tenham diversas formas possíveis, além disso, o carbono vítreo apresenta uma taxa de oxidação muito baixa, mesmo em temperaturas elevadas, indicando uma maior resistência a ataques químicos do que outros tipos de carbono. Esta propriedade, juntamente com o tamanho extremamente pequeno dos poros do carbono vítreo faz com que ele seja um material bastante atrativo para preparação de eletrodos inertes, podendo ser utilizado inclusive em meios altamente corrosivos, como em ácido fluorídrico concentrado [51]. Na Figura 5 está representada a estrutura final obtida após tratamento térmico, juntamente com a microscopia eletrônica de alta resolução da superfície do carbono Vítreo [52,53].



**Figura 5. Modelo estrutural e microscopia eletrônica de alta eficiência para o carbono vítreo. Fonte: [52, 53].**

### **1.12. Eletrodo de Pasta de Carbono**

Este eletrodo é constituído de duas fases, uma delas é de carbono (eletroquimicamente ativa) e outra inerte (aglutinante e não condutora). E o preparo da pasta consiste na mistura física desses dois componentes. O pó de grafite deve ter alta pureza química, baixa capacidade de adsorção de oxigênio e impurezas eletroativas contidas na solução, além de apresentar uma distribuição granulométrica uniforme [54]. O aglutinante, responsável pela consistência da pasta, deve preencher os espaços entre as partículas de

grafite, deve ser eletroinativo, quimicamente inerte, imiscível com a água (ou outros solventes), possuir baixa volatilidade e não conter impurezas.

Uma das mais importantes vantagens do eletrodo de pasta de carbono sobre todos os outros eletrodos sólidos está na possibilidade de renovação da superfície do eletrodo a cada medida, se necessário. Diversas análises apresentam adsorção de produtos na superfície do eletrodo, assim essa renovação é extremamente importante nestes casos para se evitar uma passivação da superfície do eletrodo. Outra importante propriedade é a baixa corrente residual, que é menor que nos eletrodos de grafite pirolítico e de carbono vítreo. Por último, a sua maior superfície ativa para as mesmas dimensões geométricas comparado a outros eletrodos a base de grafite exibe uma maior absorvidade das substâncias em sua superfície, tornando-o mais sensível [55].

Em 1958 foi desenvolvido o primeiro eletrodo de pasta de carbono (EPC) na tentativa de preparar um eletrodo gotejante constituído de pó de grafite e tribromometano para ser utilizado em regiões de potenciais positivos (anódicos) onde o eletrodo gotejante de mercúrio (EGM) apresenta sérias limitações devido à oxidação do mercúrio metálico. O eletrodo não apresentou resultados satisfatórios, devido à alta resistência elétrica causada pelo aglutinante (componente líquido orgânico) utilizado na preparação, porém a construção do EPC foi de extrema importância no desenvolvimento de novos procedimentos eletroanalíticos [56].

### **1.13. Eletrodos Quimicamente Modificados (EQM)**

O termo eletrodo quimicamente modificado (EQM) foi introduzido no jargão eletroquímico por Murray et al. em 1975 para designar eletrodos com espécies quimicamente ativas, deliberadamente imobilizadas em suas superfícies, com o objetivo de pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo/solução [57]. A modificação deliberada da superfície do eletrodo sendo uma forma de impor e controlar sua reatividade e/ou seletividade, possibilita o desenvolvimento de eletrodos para vários propósitos e aplicações. A grande maioria das aplicações analíticas de EQMs

envolve técnicas voltamétricas ou amperométricas. Entretanto também são descritos na literatura alguns casos de aplicação de EQMs como eletrodos íon seletivos [58]. A escolha do material como eletrodo base, cuja superfície será modificada, é um aspecto muito importante na preparação de um EQM. Este substrato deve apresentar características eletroquímicas apropriadas e também ser adequado para o método de modificação escolhido.

De modo geral podemos destacar as principais funções de um eletrodo modificado:

*- acumulação ou pré-concentração*

Consiste em pré-concentrar o analito de interesse na superfície modificadora através da interação química seletiva entre a espécie a ser acumulada e o modificador, aumentando a sensibilidade do método. Os principais mecanismos de acumulação podem envolver os processos de complexação, troca iônica, ligação covalente, quimissorção e extração [59].

*- Transformação química*

Promover a reação seletiva entre um analito inicialmente eletroinativo e um reagente adequado que pode ser imobilizado ou misturado ao eletrodo promovendo a alteração físico-química das suas propriedades permitindo a transferência de elétrons entre analito e eletrodo [59].

*- eletrocatalise*

A finalidade deste processo é reduzir a energia de ativação da transferência eletrônica aumentando a velocidade da reação e, conseqüentemente favorecer a intensidade do sinal analítico medido. A eletrocatalise é caracterizada por um deslocamento do potencial de pico do processo eletródico para valores mais próximos de zero, tanto na redução quanto na oxidação. Este efeito de redução do potencial proporciona uma melhora da seletividade do método, uma vez que a aplicação de potenciais mais baixos diminui a eletrólise outras espécies presentes na amostra.

Dentre os principais métodos para modificação de eletrodos podem ser enumerados a **adsorção** que consiste na imersão do eletrodo não modificado em um solvente contendo o modificador e a interação entre ele e o eletrodo

base se dá por interações físicas [58]. Este processo pode apresentar a desvantagem da modificação se estabelecer em uma fina camada superficial do eletrodo. A modificação pode se dar por **ligação covalente** envolvendo a ligação de organossilanos à superfície do eletrodo ou modificando superfícies de carbono com grupos nitrogenados, oxigenados e outros, formando-se uma modificação bastante estável, muitas vezes utilizada para imobilização de enzimas. O **recobrimento com membranas poliméricas** condutoras ou permeáveis à espécie de interesse podendo ser utilizado o recobrimento por imersão (dip-coating), eletrodeposição, entre outros. Ou ainda pode ser feita a utilização de **materiais compósitos** formados por duas ou mais fases de naturezas diferentes que ao se combinarem apresentam propriedades diferentes das suas fases isoladas, sendo o eletrodo de pasta de carbono e suas possíveis modificações um dos principais representantes dessa classe de compostos.

#### **1.14. Sensores utilizando líquidos iônicos e nanotubos de carbono**

Líquidos iônicos (LI) são definidos como compostos formados somente por íons (normalmente um carbocátion e um ânion) e que possuem temperatura de fusão abaixo de 100 °C devido à suas fracas interações iônicas. O primeiro LI, o nitrato de etilamônio, foi relatado por Paul Walden em 1914 e tem sido alvo de inúmeros trabalhos nos últimos 20 anos [60].

Os LI apresentam diversas propriedades úteis para aplicação em eletroquímica como estabilidade, alta condutividade elétrica, baixa pressão de vapor, miscibilidade intermediária tanto em solventes aquosos quanto orgânicos e toxicidade relativamente baixa, o que torna seu uso ambientalmente favorável [61]. Devido a estas características o uso de LI em eletroquímica tem crescido no desenvolvimento de sensores e biosensores [62], podendo ser combinado com complexos metálicos, nanopartículas e polímeros [63]. Conseqüentemente, podem ser aplicados na detecção de substâncias orgânicas, farmacêuticas, agrotóxicos, íons metálicos e até explosivos [64].

A formação de compósitos de LIs aliados aos nanotubos de carbono (CNTs) e suas propriedades como grande área superficial, alta transferência eletrônica e capacidade de modificação da superfície têm sido de grande interesse na construção de sensores eletroquímicos [65,66].

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Propor uma metodologia analítica utilizando técnicas voltamétricas para detecção e quantificação de compostos antimicrobianos.

### **2.2. Objetivos específicos**

Identificar os processos de oxirredução para os compostos AOx e SCP em eletrodo de pasta de carbono;

Escolher condições ideais para análise, tais como: eletrólito de suporte, pH do sistema, composição do eletrodo de trabalho e variáveis das técnicas voltamétricas;

Avaliar o comportamento voltamétrico dos compostos quanto ao transporte de massa e reversibilidade e propor mecanismos dos processos de oxirredução;

Propor a utilização de eletrodos modificados e aplicação a para análise dos compostos em água e/ou leite;

Realizar a validação dos métodos propostos via análise de figuras de mérito para AOx e SCP.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brasil. **Lei Nº 12.689, de 19 de Julho de 2012**. Altera o Decreto-Lei nº 467, de 13 de fevereiro de 1969, para estabelecer o medicamento genérico de uso veterinário; e dispõe sobre o registro, a aquisição pelo poder público, a prescrição, a fabricação, o regime econômico-fiscal, a distribuição e a dispensação de medicamentos genéricos de uso veterinário, bem como sobre a promoção de programas de desenvolvimento técnico-científico e de incentivo à cooperação técnica para aferição da qualidade e da eficácia de produtos farmacêuticos de uso veterinário. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 20 jul. 2012. Seção 1, p. 1.
2. ABIEC. **Associação Brasileira Das Indústrias Exportadoras de Carnes**. Exportações Brasileiras De Carne Bovina. Disponível Em: <http://Abiec.Com.Br/Exportacoesporano.aspx>. Acesso em: Fevereiro, 2017.
3. Biswas, A. K., Kondaiah, N., Anjaneyulu, A. S. R., Mandal, P. K. Food Safety Concerns Of Pesticides, Veterinary Drug Residues And Mycotoxins In Meat And Meat Products. **Asian Journal Of Animal Sciences**, Korea, 2010, V. 4, N. 2, P. 46-55.
4. Aerts, M.M.L., Hogenboom, A.C., Brinkman, U.A.T. Analytical Strategies For The Screening Of Veterinary Drugs And Their Residues In Edible Products. **J. Chromatogr. B**. p. 1-40, 1995.
5. SINDAN. **Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal**. Disponível Em: <http://www.Sindan.Org.Br/Sd/Base.aspx?Controle=8>. Acesso em: Fevereiro, 2017.
6. ANVISA. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. **Programa Nacional De Análise De Resíduos De Medicamentos Veterinários Em Alimentos Expostos Ao Consumo – Pamvet**. Brasília, 2003. Disponível em: <http://www.Anvisa.Gov.Br/Alimentos/Pamvet/Pamvet.Pdf>. Acesso em Outubro, 2016.
7. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Legislação 2013**. Disponível Em: <http://www.Agricultura.Gov.Br/Animal/Produtos-Veterinarios/Legislação>>. Acesso em Fevereiro, 2017.
8. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 42, de 20 de Dezembro de 1999**. Diário Oficial Da União. Brasília, 1999.
9. Carvalho E. V., Ferreira E.; Mucini L., Santos C. Aspectos Legais E toxicológicos do Descarte e Medicamentos. **Revista Brasileira de Toxicologia**. v. 22(1): p. 1-8, 2009.

10. Pena, A. L. S.; Silveira, M. I. N.; Castillo, B.; Antimicrobianos Em Alimentos: Determinação e Quantificação Por HPLC Com Detecção Fluorimétrica. **ARS Pharmaceutica**. v.38 p. 27-37, 1997.
11. Gastalho, S. Da Silva, G.J., Ramos, F. Uso de Antimicrobianos Em Aquacultura e Resistência Bacteriana: Impacto em Saúde Pública. **Acta Farmacêutica Portuguesa**. V. 3, p. 29-45, 2014.
12. Keith M. S., Armelagos, G. J.; Martin D. L., Villanueva, A. R. Tetracycline-labeled human bone from ancient Sudanese Nubia (A.D. 350). **Bassett EJ, Ciência**. v. 209, p. 1532-1534, 1980.
13. Nelson, M. L., Dinardo, A.; Hochberg, J.; Armelagos, G. J. Mass spectroscopic characterization of tetracycline in the skeletal remains of an ancient population from Sudanese Nubia 350-550 CE. **American Journal of Physical Anthropology**. v. 143, p. 151-154, 2010.
14. Walsh, C. **Antibiotics: Actions, Origins, Resistance**. Asm Press: Washington, 2003.
15. Patrick, G. L., **An Introduction To Medicinal Chemistry**, Oxford University Press: New York. 1995.
16. Fleming, A. On antibacterial action of culture of *Penicillium*, with special reference to their use in isolation of *B. influenzae*. **Br. J. Exp. Pathol**. V. 10, p. 226–236, 1929.
17. Chain, E., Florey, H. W., Gardner, A. D., Heatley, N.G., Jennings, M.A., Orr-Ewing, J., Sanders, A. G. THE CLASSIC: penicillin as a chemotherapeutic agent. 1940. **Clinical Orthopaedics and Related Research**. v. 439, p. 23-26, 2005.
18. Nicolaou, K. C.; Montagnon, T.; **Molecules That Changed The World**, Wiley-Vch: Weinheim. Cap. 13, 2008.
19. Chopra, I.; Hesse, L., O'Neill, A. Discovery and development of new antibacterial drugs. **Pharmacochemistry Library**. V. 32, p.213–225, 2002.
20. Abraham, E. P.; Chain, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. **Reviews of Infectious Diseases**. v. 10, p. 677-678, 1988.
21. Centers for Disease Control and Prevention. **Antibiotic/Antimicrobial Resistance**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/index.html>. Acesso em: janeiro, 2018.
22. Wolfson, J. S.; Hooper, D. C. The Fluoroquinolones: Structures, Mechanisms Of Action And Resistance, And Spectra Of Activity In Vitro. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 28. p. 581-586, 1985.

23. Normark, B. H.; Normark, S. Evolution and spread of antibiotic resistance. **Journal of Internal Medicine**. v. 252, p. 91-106, 2002.
24. Souza, C. P. F. A.; Falqueto, E. Descarte de Medicamentos no Meio Ambiente no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacologia**. v. 96 (2): p. 1142 – 1158, 2015.
25. Neu, H. C.; Overview of mechanisms of bacterial resistance. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 12(4 suppl): S109-S116.
26. MELO, V. V.; DUARTE, I. P.; SOARES, A. Q. **Guia Antimicrobianos 1ª ed.**, HC–UFG. Goiânia, 2012.
27. Kreuzer, K. N.; Cozzarelli, N. R., Formation and resolution of DNA catenanes by DNA gyrase. **Cell**. v. 20, p. 245-254, 1980.
28. EMA. **The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products**. Disponível em: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Maximum\\_Residue\\_Limits\\_-\\_Report/2009/11/WC500015338.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500015338.pdf). Acesso em: janeiro, 2018.
29. Pouliquen, H.; Gouelo, D.; Larhantec, M.; Pilet, N.; Pinault, L. Rapid and simple determination of oxolinic acid and oxytetracycline in the shell of the blue mussel (*Mytilus edulis*) by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Science and Applications**. v. 702, p. 157-162, 1997.
30. Yorke, J. C.; Froc, P. Quantitation of nine quinolones in chicken tissues by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**. v. 882, p. 63-77, 2000.
31. Schmitt, H.; Van Beelen, P.; Tolls, J.; Van Leeuwen, C. L. Pollution-induced community tolerance of soil microbial communities caused by the antibiotic sulfachloropyridazine. **Environmental Science & Technology**. v. 38, p. 1148–1153, 2004.
32. INSTRUÇÃO NORMATIVA nº 20, de 26 de julho de 2018. **Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal**. Brasília, Publicado no Diário Oficial da União em: 31/07/2018.
33. Boxall, A .B. A.; Fogg, L.; Blackwell, P. A.; Kay, P. & Pemberton, E. J. Review Of Veterinary Medicines In The Environment. **R&D Technical Report**. p. 251, 2002.
34. Kemper, N. Veterinary Antibiotics In The Aquatic And Terrestrial Environment. **Ecological Indicators**. v. 8, p. 1-13, 2008.
35. Sarmah, A. K.; Meyer, M. T. & Boxall, A. B. A. A Global Perspective On The Use, Sales, Exposure Pathways, Ocurrence, Fate And Effects Of

- Veterinary Antibiotics (VAs) In The Environment. **Chemosphere**. V. 65, p. 725-759, 2006,
36. Regitano, J. B.; Leal, R. M. P. Comportamento E Impacto Ambiental De Antimicrobianos Usados Na Produção Animal Brasileira. **Revista Brasileira De Ciência Do Solo**. v. 34, p. 601-616, 2010.
  37. Alexy, R.; Schöll, A.; Kumpel, T. & Kümmerer, K. **What Do We Know About Antibiotics In The Environment** In: Kümmerer, K., Ed. Pharmaceuticals In The Environment, 2.Ed. Berlin, Springer-Verlag, p.209-221, 2004.
  38. Flaherty C. M.; Dodson S. I. Effects Of Pharmaceuticals On Daphnia Survival, Growth And Reproduction. **Chemosphere**. v. 61, p. 200-207, 2005.
  39. Falqueto E, Kligerman Dc, Assumpção Rf. Como Realizar O Correto Descarte De Resíduos De Medicamentos. **Ciência e Saúde Coletiva**. v. 15 (Supl.2), p. 3283-3293, 2010.
  40. Bard, A. J.; Faulkner, L. R.; **Electrochemical Methods: Fundamentals And Applications**, 2 Ed. New York, 2001.
  41. Souza, D. De; Machado, S. A. S.; Avaca, L. A. Voltametria De Onda Quadrada. Primeira Parte: Aspectos Teóricos. **Química Nova**. v. 26, N. 1, p. 81-89, 2003.
  42. Wang, J. **Analytical Electrochemistry**. 2 Ed. New York: John Wiley & Sons, 2001.
  43. Pacheco, L. C. M. **Desenvolvimento De Metodologia Eletroanalítica Para A Determinação De Resíduos De Pesticidas Em Amostras De Alimentos E De Águas Naturais**. Tese (Doutorado Em Química), 173p. Universidade Federal Do Ceará, Fortaleza, 2010.
  44. De Souza, D.; Codognoto, L.; Malagutti, A. R.; Toledo, R. A.; Pedrosa, V. A.; Oliveira, R. T. S.; Mazo, L. H.; Avaca, L. A.; Machado, S. A. S. Voltametria de Onda Quadrada. Segunda Parte: Aplicações. **Química Nova**. v. 27, p. 790-797, 2004.
  45. Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. **Fundamentos De Química Analítica**. Thomson. 8ª Ed. São Paulo, 2006.
  46. Pacheco, W. F.; Semaan, F. S.; Almeida, V. G. K.; Ritta, A. G. S. L.; Aucélio, R. Q. Voltametrias: Uma Breve Revisão Sobre Os Conceitos. **Revista Virtual De Química**. v. 5, p. 516-537, 2013.
  47. Kounaves, S. P. Voltammetric Techniques. In: Settle, F. A. (Ed.). **Handbook Of Instrumental Techniques For Analytical Chemistry**. Englewood Cliffs: Prentice Hall. P. 719-720, 1997.

48. FONSECA, I.; PROENCA, L.; CAPELO, S.. A voltametria cíclica e de varrimento linear unidirecional: suas potencialidades na caracterização de processos de corrosão. **Corros. Prot. Mater.** v. 34, n. 1, p. 12-21, 2015 .
49. Li, G.; Miao, P. **Electrochemical Analysis Of Proteins And Cells, Springerbriefs In Molecular Science.** New York, 2013.
50. Bokros, J. C. **Carbon.** v. 15, P. 355-371, 1977.
51. Holland, P. T. **Pure Applied Chemistry.** v. 68, p. 1167-1193, 1996.
52. Van der Linden, W. E.; Dieker, J. W. **Analytica Chimica Acta.** v. 119, p. 1-24, 1980.
53. Adams, J. A. S.; Barreto, P. M.; Clarck, R. B.; Jun, J. S. D. **Nature,** v. 231, p. 175-176, 1971.
54. Ulakhovich, N. A.; Medyantseva, E. P.; Budnikov, G. K., Carbon-Paste Electrode As A Sensor In Voltammetric Analysis. **Journal of Analytical Chemistry.** v. 48, p. 682-688, 1993.
55. Lindquist. J, Study Of 7 Different Carbon Paste Electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry.** v. 52, 37-46, 1974.
56. Adams, R. N., Carbon Paste Electrodes. **Analytical Chemistry.** v. 30, p. 1576-1576, 1958.
57. Murray, R. W.; Moses, P. R.; Wier, P. **Analytical Chemistry.** v. 47, p. 1882-1886, 1975.
58. Souza, M. F. B. Eletrodos Quimicamente Modificados Aplicados à Eletroanálise: Uma Breve Abordagem. **Química Nova.** V. 20, p. 191-195.
59. Marcolino, L. H. J. **Eletrodos Voltamétricos e Amperométricos para a Determinação de Espécies de Interesse Farmacêutico.** Tese (Doutorado Em Química), 166p. Universidade Federal De São Carlos, 2007.
60. Zhigang L., Chen B., Koo Y., MacFarlane D. R. Introduction: Ionic Liquids. **Chemical Reviews.** v. 117, p. 6633–6635, 2017.
61. Rivas, G. A.; Rubianes, M. D.; Rodriguez, M. C.; Ferreyra, N. F.; Luque, G.L.; Pedano, M. L.; Miscoria, S. A.; Parrado, C. Carbon nanotubes for electrochemical biosensing, **Talanta.** v. 74 p. 291–307, 2007.
62. Maleki, N.; Safavi, A.; Tajabadi, F. High-performance carbon composite electrode based on an ionic liquid as a binder. **Analytical Chemistry.** v. 78 p. 3820–3826, 2006.
63. Safavi, A.; Farjami, F. Electrodeposition of gold-platinum alloy nanoparticles on ionic liquid-chitosan composite film and its application in fabricating an amperometric cholesterol biosensor, **Biosensors Bioelectronics.** v. 26, p. 2547–2552, 2011.

64. Silvester, D. S. Recent advances in the use of ionic liquids for electrochemical sensing, **Analyst**. v. 136, p. 4871-4882, 2011.
65. Zhu, Z.; Qu, L. L.; Li, X.; Zeng, Y.; Sun, W.; Huang, X. Direct electrochemistry and electrocatalysis of hemoglobin with carbon nanotube-ionic liquid-chitosan composite materials modified carbon ionic liquid electrode, **Electrochimica. Acta**. v. 55 p. 5959–5965, 2010.
66. Reynolds, J. E. F. **Martindale The Extra Pharmacopoeia**, 31st ed. Royal Pharmaceutical Society. London, UK, pp. 252-259, 1996.

**CAPÍTULO II – ARTIGO: DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO OXOLÍNICO EM  
ÁGUA POR VOLTAMETRIA DE VARREDURA ADSORTIVA**

---

## **CAPÍTULO II - DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO OXOLÍNICO (AOX) EM ÁGUA POR VOLTAMETRIA DE VARREDURA ADSORTIVA (ADSV)**

### **RESUMO**

Os antibióticos usados em larga escala podem contaminar o meio ambiente aquático e serem ingeridos por seres humanos causando danos à saúde e resistência ao fármaco em longo prazo. Os métodos voltamétricos surgem como alternativa rápida e relativamente mais barata para a análise destes compostos. Um método baseado na voltametria de varredura adsortiva em eletrodo de pasta de carbono (CPE) foi desenvolvida e aplicada para determinação do ácido oxolínico (AOx) em amostra de água não tratada coletada na lagoa do campus da Universidade Federal de Viçosa (UFV). A voltametria cíclica indicou a presença de um processo anódico irreversível em aproximadamente +1,15 V (vs. Ag|AgCl,  $\text{KCl}_{3\text{molL}^{-1}}$ ) em uma solução de KOH  $0,100 \text{ mol L}^{-1}$  como eletrólito de suporte. A quantificação do composto foi realizada por voltametria de varredura adsortiva, fixando-se um potencial elétrico de +1,05 V por 45 segundos para adsorção do AOx na superfície do eletrodo de trabalho seguido da varredura de potencial por voltametria de pulso diferencial (DPV). Curvas analíticas foram construídas, obtendo-se limites de detecção (LD)  $0,0570$  e  $0,512 \text{ mg L}^{-1}$  e os limites de quantificação (LQ) de  $0,192$  e  $1,707 \text{ mg L}^{-1}$  na ausência de matriz e em água da lagoa da UFV, respectivamente. A taxa de recuperação aparente obtida para três concentrações de AOx na matriz de água da lagoa variou entre 98,4% e 109%.

*Palavras chave: Antimicrobiano; quinolona; Voltametria de pulso diferencial; eletrodo de pasta de carbono.*

## 1. INTRODUÇÃO

A produção animal é uma das atividades mais expressivas do agronegócio brasileiro. A fim de assegurar a produtividade e a competitividade do setor, a utilização de medicamentos com fins terapêuticos e de profilaxia é uma prática bastante comum e que comprovadamente tem resultado em maior produtividade e melhor qualidade dos alimentos [1]. A maioria dos medicamentos veterinários é administrada como aditivo alimentar ou adicionada à água para prevenir doenças ou melhorar o crescimento do animal [2]. A utilização destas substâncias no tratamento de intensivo de animais (bovinos, suínos e avícolas) e na aquicultura representa a principal via de entrada de antimicrobianos no meio ambiente e pode levar à contaminação de ambientes aquáticos e terrestres [3]. Eles podem entrar no meio ambiente como compostos ou metabólitos isolados ou conjugados [4].

A contaminação do meio ambiente pode ocorrer pelo uso de esterco animal e lodo de tratamento de efluentes contendo resíduos de medicamentos veterinários como fertilizante. Outras fontes de contaminação incluem a construção inadequada de lagoas de tratamento de resíduos, cujo conteúdo pode vazar ou ser lixiviado em águas superficiais e subterrâneas. Além disso, os medicamentos veterinários podem ser aplicados diretamente nas águas superficiais para controle e prevenção de doenças em piscicultura e podendo se acumular grandes quantidades de resíduos desses compostos, alterando o ecossistema aquático [5].

Entre os medicamentos veterinários utilizados, os antimicrobianos são os mais prescritos [6]. Seu uso indiscriminado acarreta sérios danos ao meio ambiente e à saúde humana, como reações alérgicas aos princípios ativos e pode levar à resistência antimicrobiana de bactérias intestinais tanto em humanos quanto em animais, ou de bactérias ambientais comuns [7].

Quinolonas e fluoroquinolonas são compostos antimicrobianos heterocíclicos com alta atividade biológica e farmacológica [8]. Esses agentes antimicrobianos são razoavelmente toleráveis por seres humanos e podem ser amplamente utilizados contra organismos micobacterianos e anaeróbios, atuando pela inibição das enzimas bacterianas DNA girase e topoisomerase IV

[9]. O primeiro agente antimicrobiano da classe das quinolonas foi sintetizado em laboratório na década de 1960 pela obtenção do ácido nalidíxico como subproduto da síntese de compostos antimaláricos [10]. Desde então, diversas modificações estruturais do ácido nalidíxico resultaram na segunda, terceira e quarta gerações de quinolonas e fluoroquinolonas, que são eficazes contra bactérias gram-negativas e gram-positivas, gerando antibióticos mais efetivos e com amplo espectro de atividade [11]. Alguns destes compostos tem sido utilizados com sucesso no tratamento de algumas doenças em humanos [12,13] e amplamente empregados na composição de medicamentos veterinários [14-16].

O ácido oxolínico (AOx), i.e. ácido 5-etil-5,8-dihidro-8-oxo-1,3-dioxolo[4,5-g]quinolina-7-carboxílico (Figura 6) é uma droga antibiótica de largo espectro da segunda geração de quinolonas, e amplamente utilizado no tratamento de doenças causadas por bactérias Gram-negativas [17]. Embora seu uso tenha sido descontinuado em alguns países e substituído por outras fluoroquinolonas mais eficientes, o AOx ainda é utilizado no tratamento de infecções dos sistemas intestinal e urinário causadas por bactérias como a *Salmonella* [18]. O composto também é de amplo uso veterinário, sendo monitorado no Brasil em bovinos, suínos, equinos, aves, leite, ovos e peixes [19].

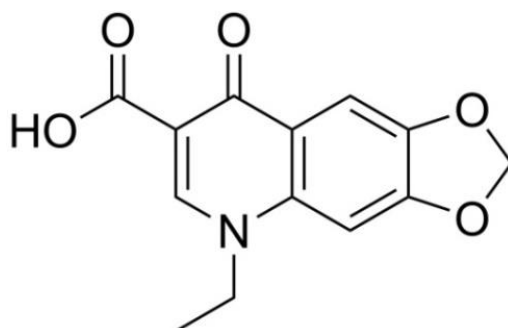


Figura 6. Estrutura molecular do ácido oxolínico (AOx).

Diversos métodos analíticos tem sido desenvolvidos para a determinação de AOx em diferentes matrizes. Dentre todos os métodos, aqueles que aplicam cromatografia são os mais utilizados, sendo a cromatografia gasosa, uma das técnicas inicialmente abordadas para quantificação de quinolonas como o AOx em peixes [20,21]. Outros trabalhos descrevem derivatização do analito em análise por cromatografia líquida e detecção por luminescência [22,23].

A cromatografia líquida de ultra-alta eficiência também foi utilizada para detecção de AOx juntamente a outras quinolonas em amostras de carne [24] e peixes [25]. A técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas foi empregada para determinação de quinolonas em músculo e rins de aves [26]. Além das diversas pesquisas envolvendo análises de amostras de origem animal, a cromatografia líquida também foi usada no monitoramento da presença de antibióticos em amostras de água [27,28]. Outros métodos não cromatográficos, baseados em técnicas eletroforéticas [29,30] e espectrofluorimétricas [31] tem sido utilizadas como alternativas para análise destes compostos. Embora exista um número considerável de trabalhos e diferentes metodologias empregadas na detecção do AOx, até o presente ano não se encontra nas fontes de pesquisa nenhum trabalho para determinação deste composto por técnicas voltamétricas.

Recentemente, as técnicas voltamétricas têm sido tratadas como alternativas viáveis à cromatografia para análises de diversos contaminantes, devido ao seu baixo custo e à possibilidade da utilização de instrumentos portáteis para análises *in loco*. Além disso, realizam medidas em soluções coloridas ou na presença de material particulado disperso em solução, permitindo análises diretamente na matriz, o que se torna inviável em técnicas cromatográficas. Desta forma muitos trabalhos têm desenvolvido métodos voltamétricos rápidos, sensíveis, precisos e reprodutivos aliados a um baixo consumo de reagentes e normalmente, sem a necessidade de etapas complexas de extração ou pré-tratamento das amostras [32]. Em virtude do uso ou descarte inadequado de diversos medicamentos veterinários e da necessidade da avaliação da qualidade das fontes naturais de água a um custo mais baixo e em menor tempo, o objetivo deste trabalho foi desenvolver uma

nova metodologia voltamétrica para detecção e quantificação do antibiótico AOx em água.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Reagentes e solução estoque de ácido oxolínico**

Neste trabalho foram utilizados reagentes de grau analítico e sem nenhuma etapa prévia de purificação. Ácido oxolínico (Ácido 5-etil-8-oxo-5,8-dihidro[1,3]dioxole[4,5-g]quinolina-7-carboxílico) e KOH foram obtidos da Sigma-Aldrich (FLUKA, padrão analítico, Bélgica). Em alguns experimentos iniciais foram necessários álcool etílico absoluto (padrão analítico) e duas soluções tamponantes, preparadas com ácido acético glacial (99,7%), ácido bórico (99,5%), ácido fosfórico (>85%) e carbonato de potássio (99,0%), todos obtidos da Vetec (Brasil).

Antes do preparo da solução estoque, foram realizados testes de solubilidade de AOx em dois tubos de Eppendorf nos quais comparou-se visualmente a solubilidade de 1,000 mg de AOx em 1,00 mL de etanol e solução aquosa de KOH 0,100 mol L<sup>-1</sup>, respectivamente. Com base nesta observação e visando-se uma melhor solubilização do composto, a solução estoque do antimicrobiano foi preparada pela dissolução do mesmo em 50,00 mL de KOH 0,100 mol L<sup>-1</sup>, resultando em uma solução final com concentração 1,000 g L<sup>-1</sup> (38,30 mmol L<sup>-1</sup>). A solução estoque de AOx foi preparada previamente e mantida sob refrigeração (abaixo de 10 °C). As soluções diluídas contendo o analito foram sempre preparadas no mesmo dia das análises, pela transferência quantitativa de alíquotas da solução estoque para uma célula voltamétrica convencional e posterior diluição para um volume final de 10,00 mL, utilizando-se água deionizada com resistividade menor que 18,2 MΩ cm<sup>-1</sup> (Milli-Q System, Millipore, USA).

## 2.2. Medidas voltamétricas

Todas as medidas voltamétricas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato PGSTAT 128 N Autolab potentiostat (Eco-Chemie, Utrecht, The Netherlands) interfaciado a um computador pelo software GPES (versão 4.9). Foi utilizada uma célula eletroquímica convencional de 50 mL equipada com arranjo de três eletrodos, um eletrodo de referência Ag|AgCl,  $\text{KCl}_{3\text{mol/L}}$ , um eletrodo auxiliar de platina e um eletrodo para compactação de pasta de carbono (CPE) como eletrodo de trabalho de área geométrica superficial igual a  $0,283 \text{ cm}^2$ . Todos os eletrodos foram adquiridos da Metrohm® (Switzerland). A pasta de carbono foi preparada pela mistura de grafite em pó (Merck®) e óleo mineral (Acros Organic®) em proporções adequadas. A mistura resultante de cada proporção foi dispersa em hexano (Sigma-Aldrich®) e agitada por aproximadamente 2 horas por um agitador magnético (CORNING, PC-420D) até a evaporação completa do solvente. Posteriormente, a pasta de carbono preparada foi seca em temperatura ambiente. Para realização das medidas voltamétricas a pasta de carbono foi inserida no eletrodo, evitando-se a formação de espaços vazios no seu interior e de forma a obter-se uma superfície homogênea. Após cada medida voltamétrica foi realizada a renovação da superfície eletródica retirando-se uma camada superficial de pasta do eletrodo, compactando-se novamente uma pequena quantidade de pasta de carbono.

Para aplicação do método foi utilizada uma amostra autêntica de água doce não potável, classe 3, que pode ser destinada ao abastecimento para consumo humano após tratamento convencional ou avançado e à irrigação de culturas [33]. Esta amostra de água foi coletada na lagoa do campus da Universidade Federal de Viçosa (UFV). A lagoa funciona como um reservatório do Ribeirão São Bartolomeu e fornece abastecimento de água para o campus da UFV e para grande parte do município de Viçosa-MG. A amostra foi coletada próximo à Divisão de Tratamento de Água (ETA) da UFV a uma profundidade de aproximadamente 30 cm da superfície e não foi submetida a nenhum processo de purificação antes das análises.

### 2.3. Detecção eletroquímica de AOx e validação do método

Foram aplicadas três técnicas voltamétricas para detecção de AOx: voltametria cíclica (CV), voltametria de pulso diferencial (DPV) e voltametria de onda quadrada (SWV). A técnica CV foi utilizada para caracterização dos processos eletródicos do antibiótico, enquanto as duas técnicas de pulso, DPV e SWV foram aplicadas visando à quantificação mais sensível e precisa do analito. Todas as medidas foram realizadas a temperatura ambiente e no mínimo, em triplicatas.

Devido a ausência de trabalhos anteriores envolvendo detecção voltamétrica do AOx, inicialmente foi feita uma investigação sobre a eletroatividade do composto bem como o eletrólito de suporte e o pH em que o processo redox seria favorecido. Após a escolha dos melhores parâmetros instrumentais e da técnica eletroanalítica mais sensível, uma curva analítica foi construída pela adição de alíquotas da solução estoque de AOx (intervalo de concentração final de AOx entre 0,500 – 40,00 mg L<sup>-1</sup>) à célula eletroquímica contendo a solução de eletrólito de suporte. A partir das intensidades de correntes de pico em função da variação de concentração de AOx, foi obtida uma regressão linear pelo método de mínimos quadrados. O método foi aplicado em diferentes situações: (i) adição de solução padrão em água deionizada e (ii) adição de solução padrão na presença de uma matriz de água não potável.

O método ainda foi validado por ensaios de repetibilidade, precisão intermediária e exatidão, realizada diretamente na amostra de água da lagoa. As soluções para este estudo foram preparadas pela adição de volumes adequados de solução estoque de AOx e de eletrólito de suporte a 9,00 mL de amostra de água de lagoa, obtendo-se um volume final de 10,00 mL para a solução de análise.

A exatidão do método foi determinada por método de adição de padrão de AOx à amostra de água em três níveis diferentes de concentração do analito. Por outro lado, a precisão foi avaliada por ensaios de repetibilidade

sendo realizadas sete repetições das análises em soluções diferentes, de uma mesma amostra, para cada nível de concentração de AOx no mesmo dia de trabalho. Enquanto a precisão intermediária por comparação das medidas realizadas em soluções diferentes preparadas em cinco dias diferentes de trabalho, para cada nível de concentração do analito.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Estabilidade da solução estoque de AOx

A avaliação da estabilidade da solução estoque de AOx foi realizada, retirando-se a cada semana uma alíquota desta solução e preparando-se uma solução  $100,0 \text{ mg L}^{-1}$  para análise em triplicata. Na Figura 7 pode observar a variação de  $I_{pa}$  ao longo das semanas e verificou-se que a partir da oitava semana após o preparo da solução estoque, a intensidade de corrente apresentou queda superior a 10%. Dessa forma evitou-se utilizar grandes quantidades de uma mesma solução estoque durante períodos de tempo prolongados.

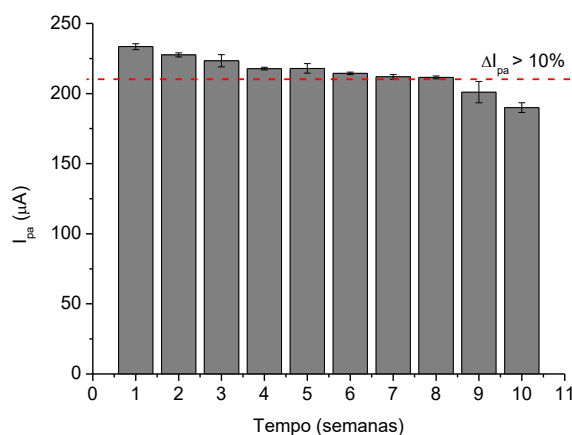
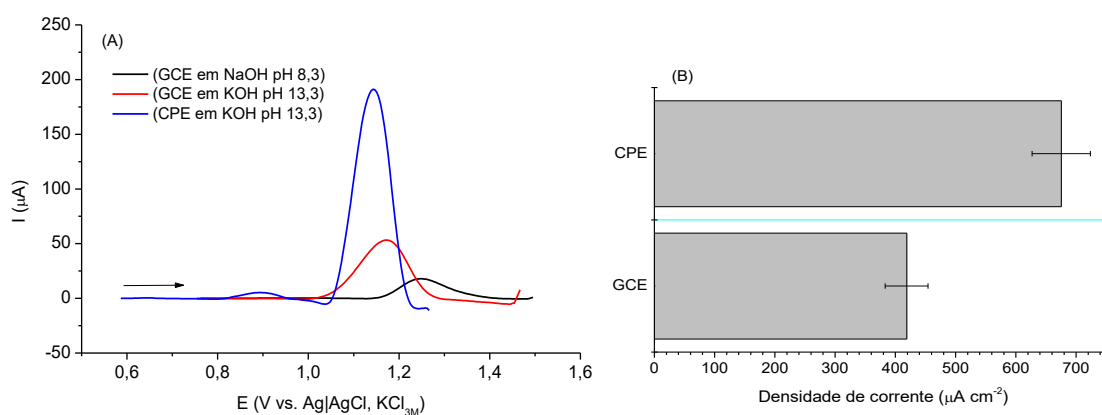


Figura 7. Avaliação da estabilidade da solução estoque de AOx, a partir da análise por de DPV em CPE de solução  $100,0 \text{ mg L}^{-1}$  preparada em KOH  $0,100 \text{ mol L}^{-1}$ .

#### 3.2. Escolha do eletrodo de trabalho

Como parte de escolha das melhores condições para análise de AOx foram avaliados dois eletrodos de trabalho: um eletrodo de carbono vítreo (GCE) com área geométrica de  $0,127 \text{ cm}^2$  e um eletrodo de pasta de carbono (CPE) de composição 70:30 % (m/m) grafite/óleo mineral, com área geométrica

de  $0,283 \text{ cm}^2$ . A Figura 8A apresenta os voltamogramas obtidos para análise de AOx nos dois eletrodos, podendo ser observado um maior valor de  $I_{pa}$  e menor  $E_{pa}$  para o CPE. Entretanto a maior área geométrica deste eletrodo favorece este ganho de corrente em relação ao GCE. Assim foi calculado como mostra a Figura 8B a densidade de corrente para cada um dos eletrodos, permitindo a comparação de suas eficiências em função apenas da interação entre o analito e o material de sua superfície, sem a influência das áreas geométricas de cada um. Ainda assim, o CPE possui maior densidade de corrente, o que favorece as condições de análise do AOx.

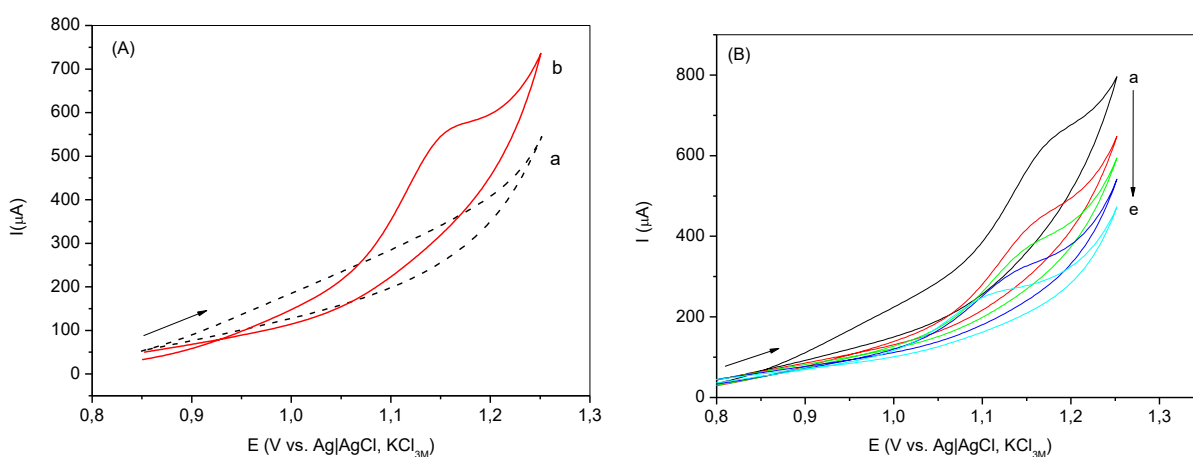


**Figura 8. (A) Voltamogramas de AOx  $100,0 \text{ mg L}^{-1}$  em diferentes eletrodos de trabalho (GCE e CPE); (B) Densidade de corrente obtida para GCE e CPE. Eletrólito de suporte: KOH  $0,100 \text{ mg L}^{-1}$ .**

### 3.3. Comportamento voltamétrico do ácido oxolínico

A voltametria cíclica (CV) foi utilizada para caracterizar os possíveis processos de oxirredução do analito. O primeiro estudo voltamétrico do AOx foi realizado na faixa de potencial elétrico positivo entre  $0,0 \text{ V}$  e  $+ 1,7 \text{ V}$  vs  $\text{Ag}|\text{AgCl}, \text{KCl}_{3M}$  em solução de eletrólito de suporte KOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e CPE como eletrodo de trabalho composto por pó de grafite/óleo mineral na proporção 70:30 (% m/m). Como observado na Figura 9A um pico anódico em aproximadamente  $+ 1,15 \text{ V}$  vs  $\text{Ag}|\text{AgCl}, \text{KCl}_{3M}$  ( $E_{pa}$ ) a uma taxa de velocidade de varredura igual a  $100 \text{ mV s}^{-1}$ . A ausência de pico catódico durante a varredura inversa sugere a ocorrência de um processo oxidação irreversível ou a existência de reações químicas acopladas na sequência do processo eletródico. A voltametria cíclica realizada em um intervalo de potencial negativo

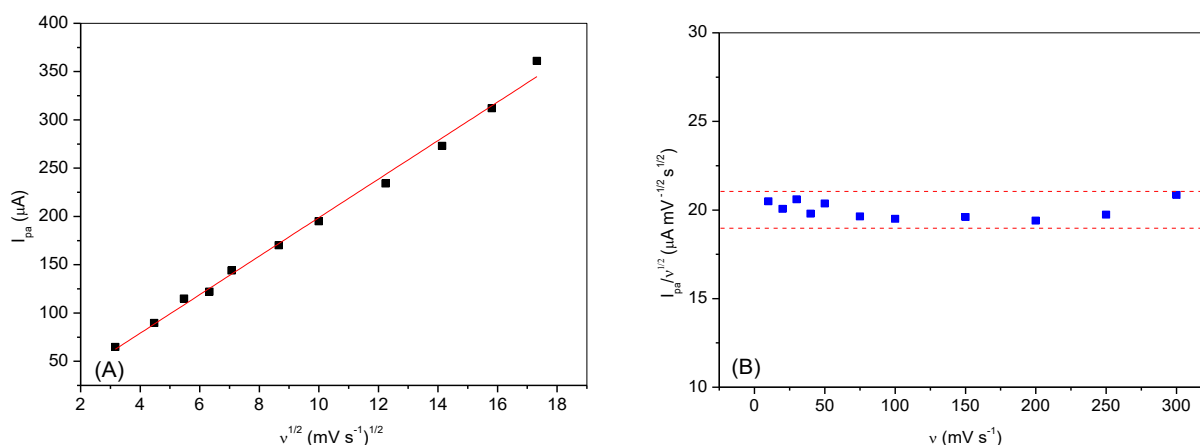
não evidenciou nenhum pico de redução ou oxidação nestas condições experimentais. O ensaio aplicando-se varreduras sucessivas em CV sem a renovação da superfície do eletrodo de trabalho evidencia uma diminuição gradativa da intensidade da corrente de pico anódico ( $I_{pa}$ ) após cada ciclo (aproximadamente 56% entre o primeiro e o décimo ciclo), como pode ser observado na Figura 9B. Este resultado ocorre devido a uma adsorção do produto de oxidação do AOx sobre a superfície do eletrodo de trabalho diminuindo a intensidade de corrente a cada ciclo sucessivo. A adsorção deste produto inviabiliza a limpeza eletroquímica da superfície do eletrodo de trabalho. Dessa forma a renovação da superfície da pasta de carbono foi realizada manualmente antes de cada medida voltamétrica.



**Figura 9. A) Voltamogramas cíclicos do a) branco e b) solução de AOx  $1,00 \text{ mmol L}^{-1}$ . B) Voltamogramas em ciclos sucessivos: a) 1º ciclo; b) 2º ciclo; c) 3º ciclo; d) 5º ciclo; e) 10º ciclo. ( $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ ) em solução de KOH  $0,100 \text{ mol L}^{-1}$  como eletrólito de suporte.**

O comportamento voltamétrico do AOx em função da variação da velocidade do potencial ( $v$ ) de varredura da CV foi avaliado em um intervalo de potencial de + 0,5 V até + 1,25 V, utilizando-se uma solução de KOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  como eletrólito de suporte. Para o processo de oxidação do AOx, observou-se uma relação linear ( $r^2 = 0,993$ ) entre a intensidade da corrente de pico ( $I_{pa}$ ) e a raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial ( $v^{1/2}$ ) como pode ser observado na Figura 10A. Este comportamento indica que o processo anódico de transferência de massa é controlado pela difusão do composto para a

superfície do eletrodo de trabalho. Com o objetivo de ratificar a irreversibilidade da oxidação do AOx, foi determinada a função corrente para o processo anódico. Esta função é dada pela relação entre o parâmetro ( $I_{pa}/v^{1/2}$ ) e a velocidade de varredura de potencial ( $v$ ) [34]. Pela Figura 10B observa-se que esta função permanece aproximadamente constante em relação à ( $v$ ), confirmando a ocorrência de um processo anódico irreversível e sem a existência de qualquer reação química acoplada ao sistema redox [35], que poderia consumir qualquer espécie formada na superfície do eletrodo e produziria uma falsa indicação de um processo irreversível.

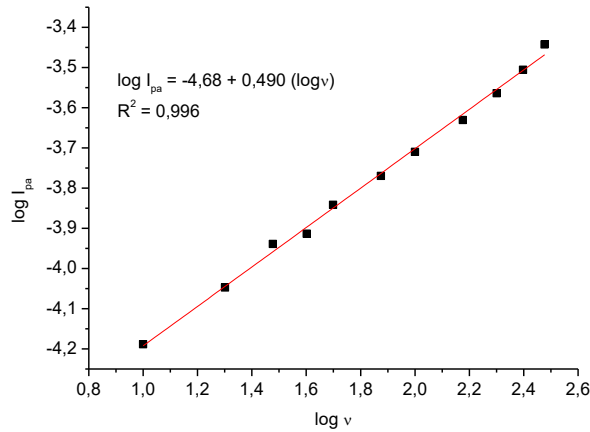


**Figure 10. A) Variação da intensidade da corrente de pico anódico (IPA) em função da raiz quadrada da velocidade de varredura ( $v^{1/2}$ ) do potencial elétrico. B) Variação da função corrente ( $I_{pa}/v^{1/2}$ ) em relação a variação da velocidade de varredura de potencial em voltametria cíclica (VC) para AOx 1,00 mmol L<sup>-1</sup> em CPE e KOH 0,100 mol L<sup>-1</sup>. (A linha pontilhada indica um desvio de  $\pm 5,0$  % em relação ao valor médio da função corrente encontrada para todos os pontos.**

### 3.4. Influência da velocidade de varredura de potencial

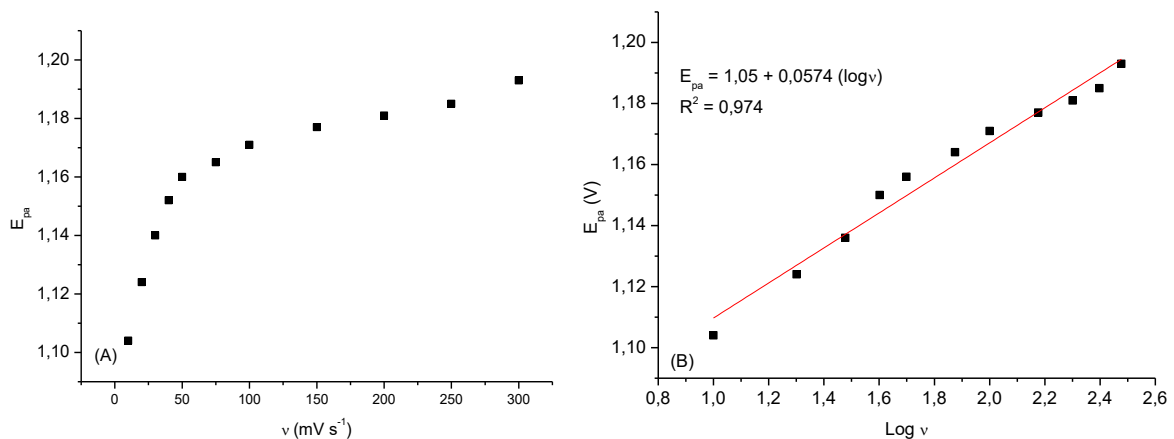
Assim como a variação de  $I_{pa}$  vs.  $(v)^{1/2}$  e a função corrente já citadas no Capítulo II, outras relações que fornecem informações sobre o comportamento voltamétrico do analito, como reversibilidade e mecanismo de transporte de massa, podem ser obtidas por voltametria cíclica em diferentes velocidades de varredura de potencial ( $E_{pa}$ ). A Figura 11 apresenta a relação linear obtida entre ( $\log I_{pa}$  vs.  $\log v$ ) com inclinação próxima a 0,5 indicando assim um processo de transferência de massa controlado majoritariamente por difusão [36],

reafirmando a indicação obtida pela relação linear entre  $I_{pa}$  e  $(v)^{1/2}$ . Apesar disso, o coeficiente linear diferente de zero indica, mesmo que de forma secundária, a existência de um processo de adsorção na superfície do eletrodo de trabalho.



**Figura 11. Variação do logaritmo da corrente de pico anódico em função do logaritmo da velocidade de varredura em VC para AOx 100,0 mg L<sup>-1</sup>. Eletrólito de suporte: KOH 0,100 mol L<sup>-1</sup>.**

Avaliando-se a variação de  $E_{pa}$  em função da velocidade de varredura de potencial, o deslocamento de  $E_{pa}$  para valores mais positivos e a relação linear entre  $E_{pa}$  e  $\log v$  mostrados nas Figuras 12.A e 12.B, ratificam os resultados mostrados no Capítulo II para a oxidação do AOx como um processo irreversível [35].



**Figura 12. (A) Variação do potencial de pico anódico em função da velocidade de varredura em VC para AOx 100,0 mg L<sup>-1</sup>. (B) Variação do potencial de pico anódico em função do logaritmo da velocidade de varredura em VC para AOx 100,0 mg L<sup>-1</sup>. Eletrólito de suporte: KOH 0,100 mol L<sup>-1</sup>.**

Utilizando-se dados experimentais obtidos em DPV foi determinado o número de elétrons transferidos no processo redox do AOx na superfície do eletrodo de trabalho pela Equação 1:

$$W_{1/2} = \frac{3.52 RT}{nF} \quad (1) \quad [34]$$

Na qual  $W_{1/2}$  é a largura do pico redox a meia altura,  $R$  é a constante dos gases ideais ( $8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ),  $T$  é a temperatura do sistema (298 K),  $F$  é a constante de Faraday ( $96.485 \text{ C mol}^{-1}$ ) e  $n$  é o número de elétrons transferidos por molécula oxidada. Substituindo na Equação 1 os valores destas constantes e o  $W_{1/2}$  obtido experimentalmente por DPV, obteve-se o valor de  $n$  igual 0,87, indicando assim a transferência de apenas um elétron no processo de oxidação do AOx.

A partir das avaliações do comportamento voltamétrico do AOX e considerando que, nas condições de análise o grupo carboxílico do AOX encontra-se desprotonado (AOX  $pK_a = 6,3$ ) [37], o mecanismo de oxidação ocorre primeiro pela transferência de 1 elétron do grupo carboxila, seguido pela eliminação deste grupo ( $-\text{COO}^-$ ), formando um radical neutro. A combinação de dois radicais formados em solução forma um dímero estável, em um processo semelhante à reação de Kolbe [38]. Uma vez que a estrutura formada possui elétrons deslocalizados, diferentes estruturas de ressonância podem ser geradas, não sendo possível afirmar precisamente a estrutura do dímero formado somente pelos ensaios realizados neste trabalho. A Figura 13 representa o mecanismo proposto, que é similar ao comportamento de oxidação do metilenodioximetanfetamina (MDMA), devido às semelhanças estruturais entre este composto e o AOx [39].

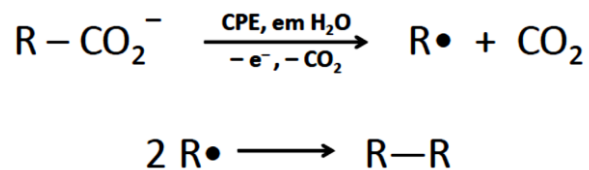
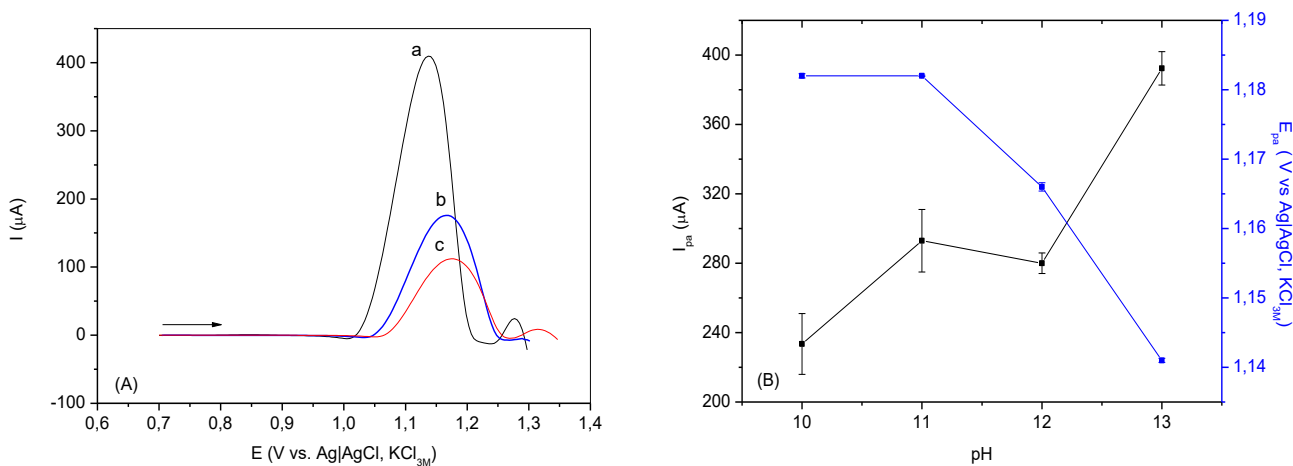


Figura 13. Proposta de mecanismo para oxidação eletroquímica do AOx em solução de KOH 0,100 mol L<sup>-1</sup>.

### 3.5. Otimização das condições analíticas

A resposta voltamétrica de AOx foi testada em diferentes soluções aquosas de eletrólito de suporte pela técnica de voltametria de pulso diferencial (DPV). A diminuição da solubilidade do AOx em soluções aquosas com valores de pH menores que 9 impossibilitou a observação do seu comportamento eletródico em soluções neutras ou ácidas. O estudo foi então realizado com soluções de tampão Britton-Robinson (BR) e tampão carbonato como eletrólito de suporte, ambas em pH 10. A comparação entre os voltamogramas para oxidação de AOx em KOH e nos dois tampões pode ser observada na Figura 14..A, em que se observa menor potencial de pico ( $E_{pa}$ ) e largura de pico a meia altura ( $w_{1/2}$ ) em solução de KOH, além de um aumento significativo na intensidade de corrente de pico ( $I_{pa}$ ), que pode ser melhor visualizado na Figura 14.B.



**Figura 14. (A) voltamogramas em pulso diferencial de AOx 1,00 mmol L<sup>-1</sup> usando a) KOH 0,100 mol L<sup>-1</sup> em pH 12; b) tampão BR pH 10; c) tampão carbonato pH 10 e (B) variação de I<sub>pa</sub> e E<sub>pa</sub> em função do pH da solução de KOH 0,100 mol L<sup>-1</sup>.**

A melhor composição da pasta de carbono também foi avaliada para três proporções entre grafite e aglutinante, com a massa de grafite variando entre 70 e 80% em relação à massa total de pasta produzida. A Tabela 3 apresenta os resultados para I<sub>pa</sub>, E<sub>pa</sub> e W<sub>1/2</sub> obtidos para cada proporção grafite/óleo mineral avaliada. Observa-se que uma maior quantidade de óleo mineral gera uma diminuição na intensidade da corrente de pico (I<sub>pa</sub>) pelo aumento da resistividade da pasta. Por outro lado, a composição com uma quantidade de apenas 20% de óleo mineral também prejudicou a intensidade de I<sub>pa</sub>, devido a uma diminuição excessiva na quantidade de aglutinante que leva a um empacotamento irregular da pasta de carbono no interior do eletrodo de trabalho. Assim, a composição de pasta de carbono 75:25 (%m/m) grafite/óleo mineral foi utilizada durante o restante do trabalho.

Não foi observado nenhuma tendência de variação de E<sub>pa</sub> ou W<sub>1/2</sub> em relação à mudança de composição da pasta de grafite, sendo considerado, portanto, somente os valores de I<sub>pa</sub> obtidos como critério de escolha do eletrodo de trabalho.

**Tabela 3. Influência da proporção grafite/óleo mineral sobre a resposta voltamétrica de AOx.**

<b>Proporção (%m/m)</b>	<b>70:30</b>	<b>75:25</b>	<b>80:20</b>
<b><math>I_{pa}</math> (<math>\mu\text{A}</math>)</b>	294,4 $\pm$ 8,7	343,1 $\pm$ 7,9	288,5 $\pm$ 9,1
<b><math>E_{pa}</math> (V vs Ag AgCl, KCl<sub>3M</sub>)</b>	1,140 $\pm$ 0,002	1,136 $\pm$ 0,001	1,137 $\pm$ 0,001
<b><math>W_{(1/2)}</math> (V)</b>	0,110 $\pm$ 0,006	0,113 $\pm$ 0,005	0,112 $\pm$ 0,006

### 3.6. Escolha de parâmetros para DPV e SWV

A escolha das condições ideais de análise é de extrema importância na tentativa de se obter maior sensibilidade e detectar quantidades menores do analito. A voltametria de pulso diferencial (DPV) e a voltametria de onda quadrada (SWV) são técnicas voltamétricas de pulso, que pela diminuição da corrente capacitiva medida, geram picos com maior intensidade de corrente e bem mais definidos que a CV, possibilitando assim um grande aumento da sensibilidade das análises. Três parâmetros instrumentais da DPV (velocidade de varredura, amplitude de pulso e tempo de pulso), assim como da SWV (Frequência de pulso, amplitude de pulso e incremento de varredura) foram avaliados de forma univariada. Os critérios definidos para escolha dos melhores valores foram: maior intensidade de corrente de pico, menores desvios de  $I_{pa}$  entre as repetições e menores valores de  $W_{1/2}$ .

As variáveis instrumentais da DPV (velocidade de varredura, amplitude de pulso e tempo de pulso), assim como da SWV (Frequência de pulso, amplitude de pulso e incremento de varredura) foram otimizadas de forma univariada para análise de AOx no eletrodo de pasta de carbono. Para escolha das condições instrumentais de análise, os maiores valores de  $I_{pa}$  juntamente com os menores valores de largura de pico a meia altura e desvio entre medidas foram os parâmetros considerados ideais para as análises seguintes. Nas Figuras 15.A, 15.B e 15.C observam-se os resultados obtidos em DPV

para a variação de  $I_{pa}$  e  $W_{1/2}$  em função da variação da amplitude de pulso, velocidade de varredura e do tempo de pulso, respectivamente.

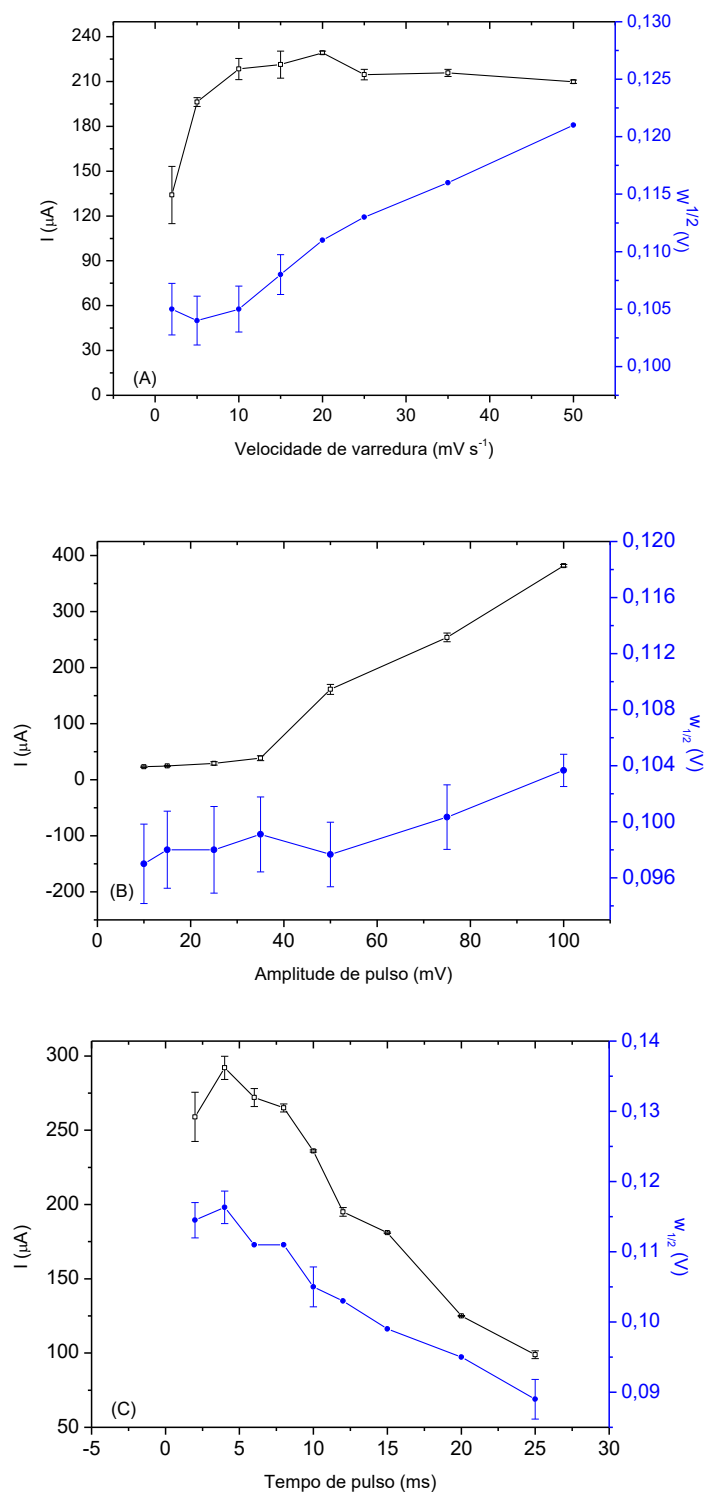


Figura 15. Variação de  $I_{pa}$  e largura de pico a meia altura ( $W_{1/2}$ ) em função de (A) velocidade de varredura, (B) amplitude de pulso e (C) tempo de pulso por DPV para solução de AOx  $100,0 \text{ mg L}^{-1}$ . Eletrólito de suporte: KOH  $0,100 \text{ mol L}^{-1}$ .

Nas Figuras 16.A, 16.B e 16.C são mostrados os resultados obtidos para  $I_{pa}$  e  $W_{1/2}$  para análises de AOX em função da variação de frequência, amplitude e incremento de varredura na SWV.

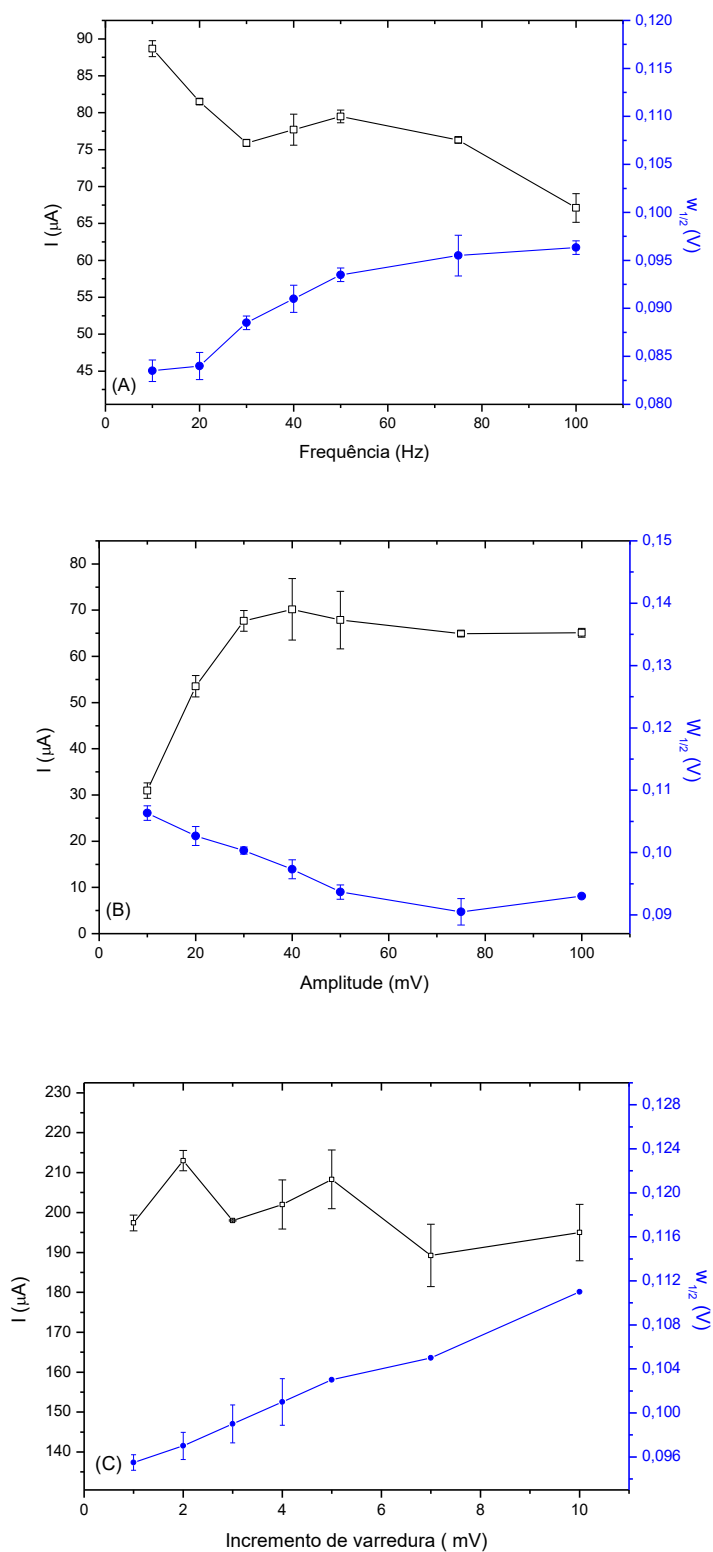
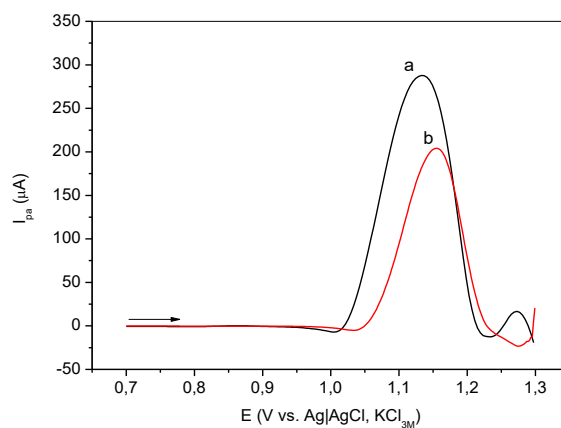


Figura 16. Variação de  $I_{pa}$  e largura de pico a meia altura ( $W_{1/2}$ ) em função de (A) frequência de varredura, (B) amplitude de pulso e (C) incremento de varredura por SWV para solução de AOX 100,0 mg L<sup>-1</sup>. Eletrólito de suporte: KOH 0,100 mol L<sup>-1</sup>.

A Tabela 4 mostra o intervalo de avaliação e o valor escolhido para cada parâmetro das duas técnicas voltamétricas. A partir dos resultados obtidos, foi realizada uma comparação entre análises de uma mesma solução de AOx 50,00 mg L<sup>-1</sup> em KOH 0,100 mol L<sup>-1</sup> por DPV e SWV, que pode ser observada na Figura 17. Assim haveria a possibilidade de avaliar os resultados de cada técnica antes da sequencia do trabalho. A DPV se mostrou a técnica mais adequada, com um aumento de  $I_{pa}$  de aproximadamente 83  $\mu$ A e um pequeno deslocamento de  $E_{pa}$  para valores menos positivos, que acarreta em menor gasto energético e maior seletividade na análise em relação à SWV.

**Tabela 4. Parâmetros voltamétricos de DPV e SWV ajustados para análise de AOx.**

<b>DPV</b>		
<b>Parâmetro</b>	<b>Faixa de avaliação</b>	<b>Valor escolhido</b>
<b>Velocidade de varredura</b>	2 – 50 mV s <sup>-1</sup>	20 mV s <sup>-1</sup>
<b>Amplitude de pulso</b>	5 – 100 mV	100 mV
<b>Tempo de pulso</b>	2 – 25 ms	4 ms
<b>SWV</b>		
<b>Parâmetro</b>	<b>Faixa de avaliação</b>	<b>Valor escolhido</b>
<b>Amplitude de pulso</b>	10 – 100 mV	10 mV
<b>Frequência de pulso</b>	10 – 100 Hz	75 Hz
<b>Incremento de varredura</b>	1 – 10 mV	2 mV



**Figura 17. Voltamogramas obtidos sob as melhores condições em a) DPV e b) SWV para uma solução AOx 50,00 mg L<sup>-1</sup> em KOH 0,100 mol L<sup>-1</sup>.**

### 3.7. Voltametria de varredura adsortiva (AdSV)

A possibilidade de pré-concentração eletroquímica do AOx e melhoria da sensibilidade da análise foi realizada por voltametria de varredura adsortiva. O método parte do princípio de que muitos compostos orgânicos exibem interações físico-químicas que permitem a sua adsorção em uma fase sólida, possibilitando que a espécie a ser determinada seja acumulada na superfície do eletrodo de trabalho em contato com a solução [40].

O processo consistiu de duas etapas: primeiro na aplicação de um potencial elétrico próximo ao valor de  $E_{pa}$  registrado pelo AOx por um determinado intervalo de tempo. Esta é a etapa de depósito do analito, realizada sob agitação magnética a 300 RPM, na qual o composto de interesse é acumulado eletroquimicamente próximo à dupla camada elétrica na superfície do eletrodo de trabalho. Na etapa seguinte, foi realizada a varredura por DPV na faixa de potencial elétrico do processo de oxidação do AOx.

Neste teste foi avaliado primeiramente o melhor potencial elétrico ( $E_D$ ) a ser aplicado na etapa de depósito. Considerando o pico característico da oxidação do AOx sem nenhuma pré-concentração, foram avaliados valores de  $E_D$  antes, durante e após (+1,05, +1,12 e +1,18 V vsAg|AgCl,KCl<sub>3M</sub>) a ocorrência do pico anódico de oxidação do antimicrobiano. A Figura 18.A mostra a comparação entre voltamogramas obtidos para diferentes valores de  $E_D$  e observa-se um deslocamento de  $E_{pa}$  para valores menos energéticos em todos os potenciais de depósito avaliados, fato que pode ser atribuído ao processo de deposição eletroquímica facilitar a transferência de massa do AOx para a superfície do eletrodo de trabalho. Ainda pode-se observar em todos os potenciais de depósito aplicados um aumento de  $I_{pa}$ , embora este incremento tenha sido menos significativo nos dois potenciais mais altos. Este comportamento sugere que a aplicação de potenciais elétricos mais elevados gera uma passivação da superfície eletródica e assim, uma menor intensidade da corrente de pico. Com o valor de  $E_D$  fixado em +1,05 V, o tempo da etapa de depósito ( $t_D$ ) foi avaliado e os valores de  $I_{pa}$  obtidos pela variação do  $t_D$  entre 30 e 120 segundos são observados na Figura 18B. Nesta avaliação ocorreu um aumento de  $I_{pa}$  até 45 segundos de aplicação do  $E_D$  e para maiores intervalos

tempo houve uma queda acentuada da corrente de pico anódica. A partir destes resultados a etapa de pré-concentração eletroquímica foi aplicada para todas as análises seguintes, utilizando-se um  $E_D$  de +1,05 V por um intervalo de tempo de 45 segundos, logo antes de cada varredura voltamétrica.

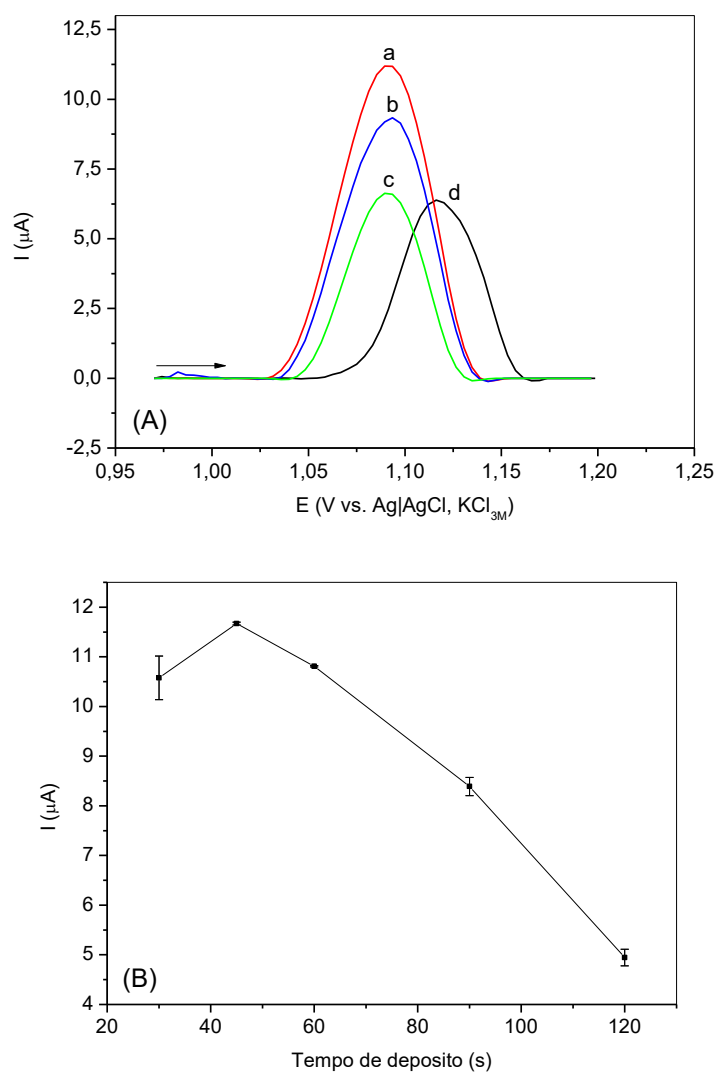


Figura 18. (A) Voltamogramas em DPV em diferentes potenciais de depósito a) + 1,05 V; b) +1,12 V; c) 1,18 V; d) 0,0 V. (B) Influência do tempo de depósito sobre a corrente de pico em solução de  $\text{AOx } 50,00 \text{ mg L}^{-1}$  em  $\text{KOH } 0,100 \text{ mol L}^{-1}$  ( $E_D = + 1,05 \text{ V}$ ).

### 3.8. Validação do método eletroanalítico para detecção de AOx

#### 3.8.1. Curvas Analíticas, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Como mencionado, a técnica DPV sob condições ideais escolhidas proporcionou voltamogramas com maior intensidade de corrente de pico, menor potencial de pico anódico e melhor repetibilidade que a SWV para a análise de uma solução de AOx 50,00 mg L<sup>-1</sup>. Aplicando-se o método AdSV proposto neste trabalho, desenvolveu-se a análise de AOx em diferentes soluções de concentrações no intervalo de 0,500 – 40,00 mg L<sup>-1</sup>, preparadas a partir da solução estoque do analito.

A curva analítica foi construída pelo método de mínimos quadrados, a partir do ajuste linear da relação entre os valores de  $I_{pa}$  versus concentração de AOx. A Figura 19A mostra a curva analítica obtida cuja equação de ajuste é dada por  $I_{pa} (\mu A) = - 0,987 + 8,03 C (mg L^{-1})$  e um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) 0,998, já a inserção na mesma figura, apresenta os valores de corrente de pico anódico ( $I_{pa}$ ) obtidos para cada concentração de AOx. Uma segunda curva analítica foi construída para avaliar o efeito da matriz de água da lagoa da UFV. Para cada solução de análise, 9,00 mL de água da lagoa foram adicionados a uma quantidade adequada de solução estoque de AOx, juntamente ao eletrólito de suporte (KOH 0,100 mol L<sup>-1</sup>), obtendo-se uma curva analítica no intervalo de concentração de 2,00 – 40,00 mg L<sup>-1</sup> de AOx. A Figura 19B apresenta os voltamogramas e a variação da intensidade de corrente de pico  $I_{pa}$  (inserção) para cada uma das concentrações de AOx em água da lagoa da UFV.

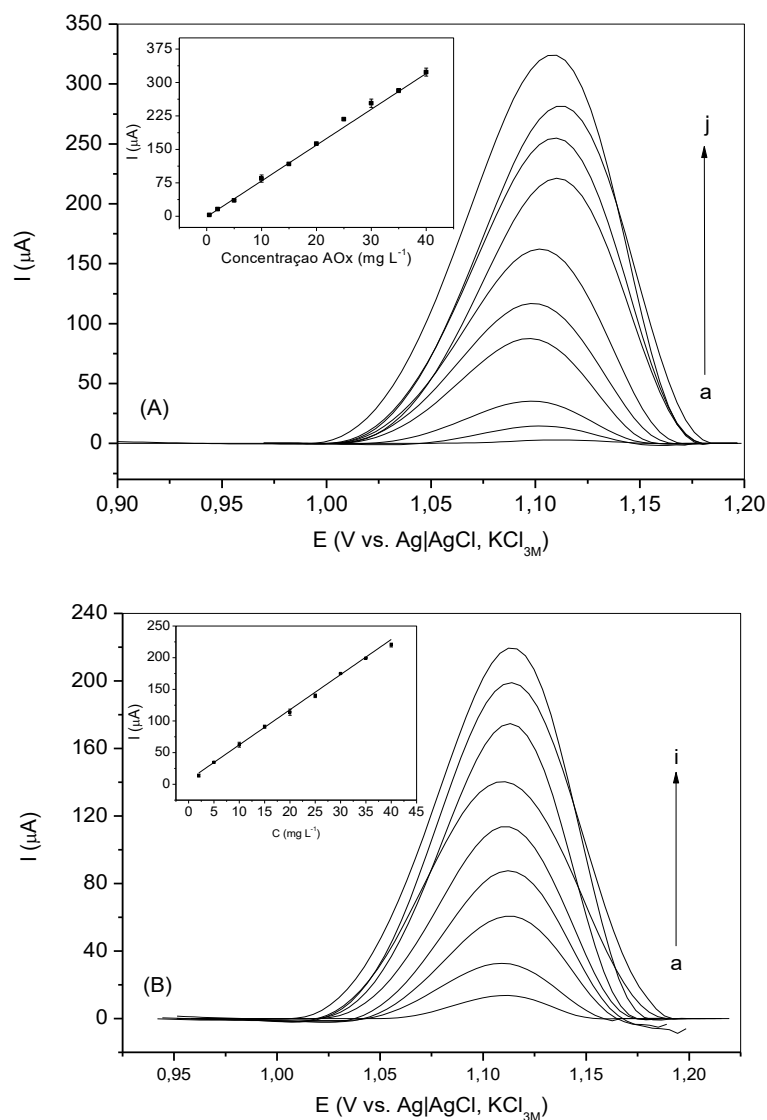


Figura 19. (A) Voltamogramas em DPV para AOx em diferentes concentrações: a) 0,50; b) 2,00; c) 5,00; d) 10,00; e) 15,00; f) 20,00; g) 25,00; h) 30,00; i) 35,00; j) 40,00 mg L<sup>-1</sup> (inserção: variação de  $I_{pa}$  em função da concentração de AOx) na ausência de matriz e (B) voltamogramas em DPV para AOx em diferentes concentrações: a) 2,00; b) 5,00; c) 10,00; d) 15,00; e) 20,00; f) 25,00; g) 30,00; h) 35,00; i) 40,00 mg L<sup>-1</sup> em água da lagoa da UFV (inserção: variação de  $I_{pa}$  em função da concentração de AOx).

Na Tabela 5 encontram-se as equações de reta para as duas curvas analíticas, assim como os limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) calculados na ausência e na presença da matriz. Os valores de LD e LQ para AOx foram calculados pelas Equações 2 e 3 [41], em que  $S_b$  é o desvio padrão absoluto da corrente elétrica medida exatamente no  $E_{pa}$  do analito em 12 varreduras realizadas no “branco” e  $b$  é a inclinação da curva analítica do AOx [42].

$$LOD = \frac{3.S_b}{b} \quad (2) \quad LOQ = \frac{10.S_b}{b} \quad (3)$$

Uma comparação entre as curvas analíticas obtidas para análise de AOx na ausência de matriz e em água de lagoa da UFV (Tabela 5) indica um efeito de matriz, evidenciado pela diminuição da sensibilidade (inclinação) da curva analítica em água de lagoa em relação aos ensaios em água deionizada. A menor sensibilidade ocasionou a diminuição da faixa de concentração trabalhada, uma vez que as medidas de  $I_{pa}$  para valores de concentração abaixo de  $2,00 \text{ mg L}^{-1}$  apresentaram uma diminuição da repetibilidade das medidas. Graficamente esta diminuição da sensibilidade (inclinação) da curva analítica construída para análises na água coletada na lagoa da UFV pode ser observada na Figura 20 pela comparação entre as duas curvas analíticas em água deionizada ultrapura e água não tratada.

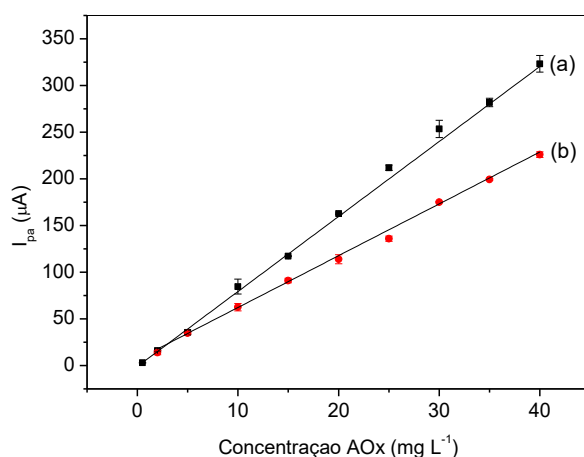


Figure 20. Comparação entre curvas analíticas obtidas em (a) água deionizada ultrapura e (b) em água da lagoa da UFV não tratada.

Tabela 5. Regressão linear, limites de detecção e quantificação para análises de AOx.

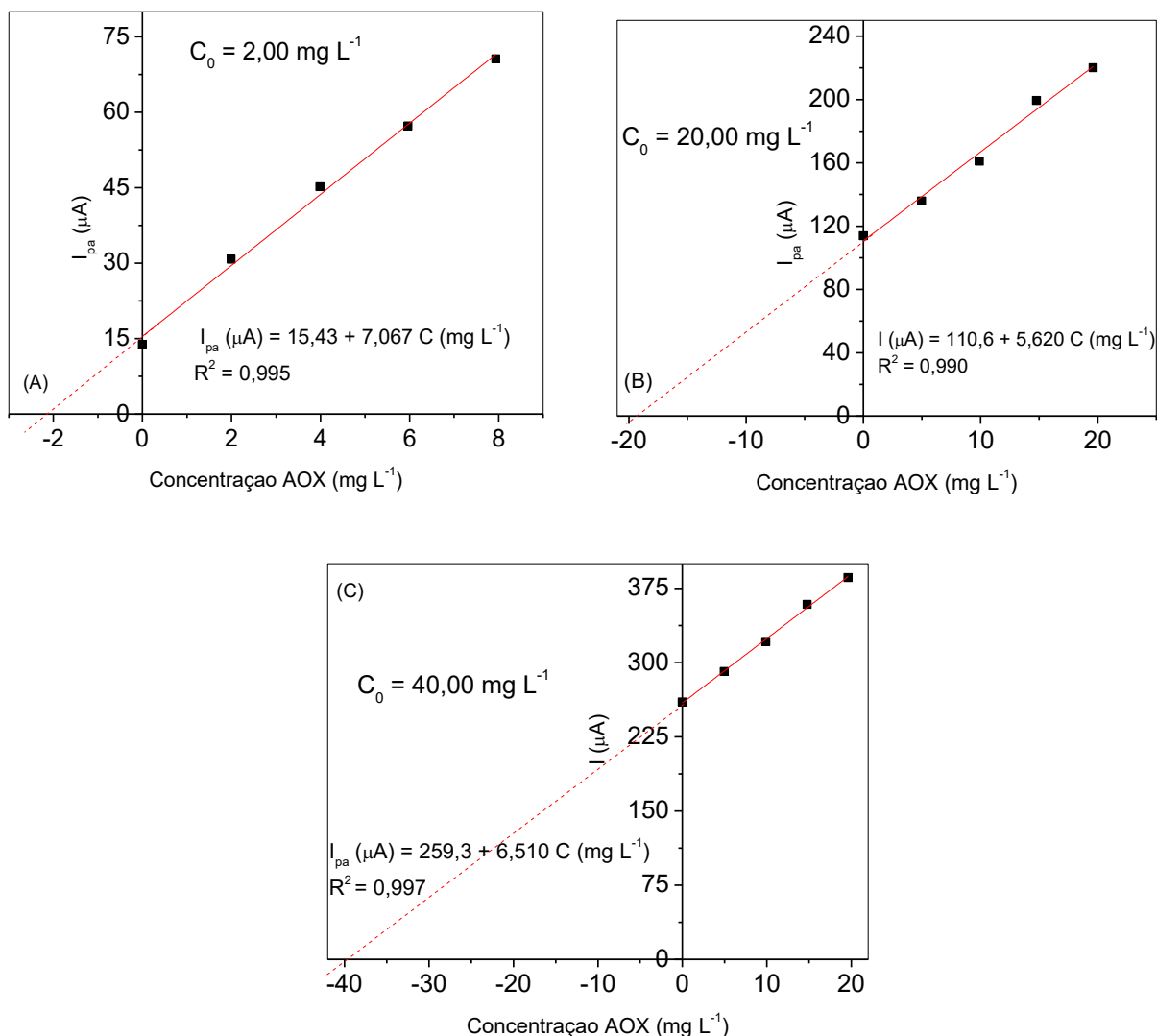
Matriz	Equação de reta	R <sup>2</sup>	LD		LQ	
			mg L <sup>-1</sup>	μmol L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>	μmol L <sup>-1</sup>
Ausente	$I_{pa} (\mu A) = -0,987 + 8,03 C (\text{mg L}^{-1})$	0,998	0,0570	0,218	0,192	0,735
Água de lagoa	$I_{pa} (\mu A) = 6,76 + 5,55 C (\text{mg L}^{-1})$	0,998	0,386	1,48	1,29	4,94

### **3.8.2. Precisão e exatidão do método para análise de AOx em água não tratada**

A determinação da exatidão e precisão do método foram realizadas na amostra de água da lagoa da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Varreduras por DPV realizadas em soluções contendo apenas amostra de água e KOH 0,100 mol L<sup>-1</sup> não apresentaram nenhum pico anódico na faixa de oxidação de AOx, indicando a ausência do antibiótico na amostra coletada.

Foram realizados ensaios por adição de padrão de AOx, nos quais alíquotas da amostra de água foram intencionalmente contaminadas com diferentes concentrações de AOx (2,00; 20,00 e 40,00 mg L<sup>-1</sup>), todas dentro da faixa de trabalho da curva analítica construída na presença da matriz. A cada solução contaminada foram feitas quatro adições de padrão de 50 µL de solução estoque de AOx. Os valores de  $I_{pa}$  foram obtidos após cada uma das quatro adições de AOx.

A partir destas medidas foi construída a relação  $I_{pa}$  em função da concentração de analito e pelas equações de retas obtidas foi possível determinar a concentração inicial de cada amostra fortificada. As Figuras 21.A, 21.B e 21.C apresentam, os gráficos e a regressão linear obtida para AOx em cada uma concentrações adicionadas às soluções.



**Figura 21. Relações voltamétricas entre  $I_{pa}$  e concentração em água de lagoa para fortificações de AOX em (A)  $2,000 \text{ mg L}^{-1}$ ; (B)  $20,00 \text{ mg L}^{-1}$  e (C)  $40,00 \text{ mg L}^{-1}$ .**

A exatidão do método foi determinada para cada contaminação pela relação percentual entre a concentração estimada e a concentração real de AOX na amostra. A Tabela 6 mostra as concentrações avaliadas e estimadas pela adição de padrão, além dos valores percentuais estimados para cada um dos três níveis de concentração avaliados. Os valores obtidos variaram entre 98,4 e 109%, que são valores aceitáveis (entre 70 e 120%) para aplicação do método em amostras de água nos níveis de concentração adicionados. [43].

Outros parâmetros de validação para determinação da precisão do método proposto, como repetibilidade e precisão intermediária foram avaliados,

sendo estes quesitos determinados pelo cálculo do desvio padrão relativo (%DPR) entre as repetições das medidas voltamétricas. A repetibilidade relaciona as medidas de uma mesma amostra em diferentes soluções (n=7) preparadas no mesmo dia e a precisão intermediária aplica-se para repetições entre soluções (n=5) preparadas em dias diferentes. O método desenvolvido apresentou DPR máximo de 4,68 e 7,85% para repetibilidade e precisão intermediária, respectivamente, valores que se encontram em acordo com as recomendações do Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento [43].

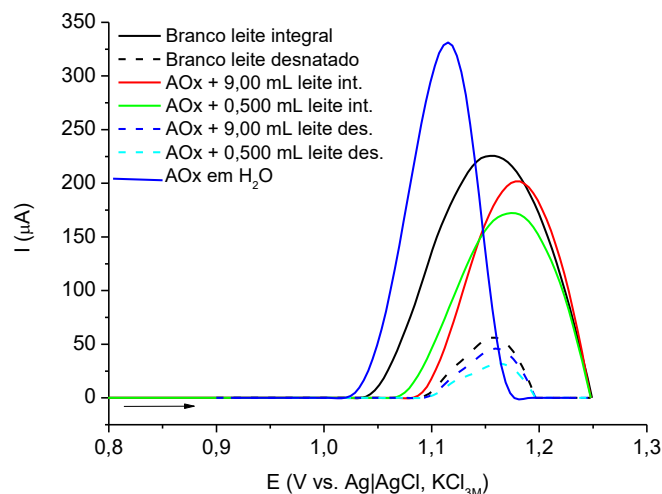
**Tabela 6. Resultados para análise de recuperação aparente em diferentes concentrações de AOx.**

Conc. adicionada (mg L <sup>-1</sup> )	Conc. obtida (mg L <sup>-1</sup> )	Exatidão (%)	Repetibilidade (DPR%)	Reprodutibilidade (DPR%)
2,00	2,18	109	4,685	7,851
20,00	19,67	98,4	4,462	6,440
40,00	39,83	99,6	1,197	4,380

### 3.9. Ensaios de aplicação do método voltamétrico para análise em leite

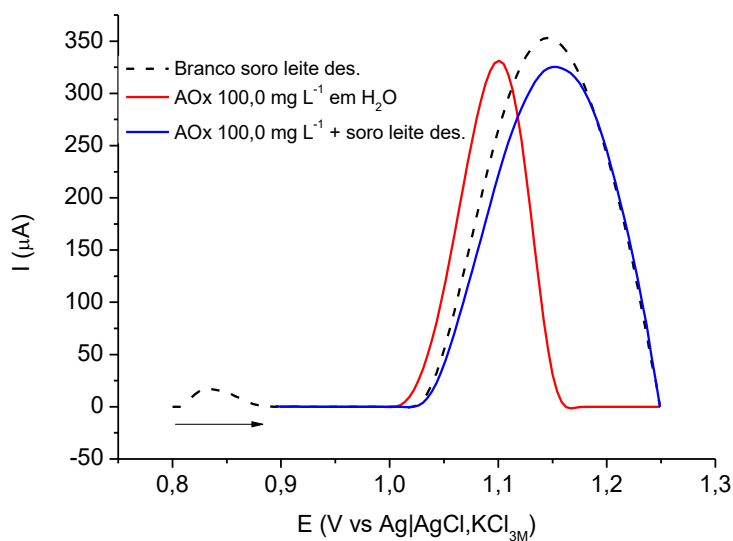
O MAPA analisa anualmente vários compostos de uso veterinário em matrizes de origem animal pelo PNCRC como forma de garantir a qualidade dos produtos consumidos e a segurança da população contra agentes nocivos à saúde humana. De acordo com o último relatório do PNCRC divulgado em 2017, o ácido oxolínico foi analisado em várias amostras de leite, carne bovina, peixes e ovos. Dessa forma, foi proposto aplicação do método voltamétrico desenvolvido para análise do AOx em diferentes tipos de amostra de leite de vaca. Foram realizadas contaminações de AOx 100,0 mg L<sup>-1</sup> em leite integral e desnatado. Não foi realizado nenhum tratamento prévio das amostras antes das análises, que foram conduzidas adicionando-se diretamente à célula voltamétrica 9,00 mL da amostra já contaminada com AOx e em seguida foi

adicionado 1,00 mL de KOH como eletrólito de suporte, totalizando-se 10,00 mL de solução para análise. Nos resultados apresentados na Figura 22, observa-se a presença de uma banda larga no mesmo potencial do processo anódico para o AOx. Inclusive a diminuição do volume de matriz adicionado à célula para 0,500 mL não auxiliou na observação do processo redox de interesse.



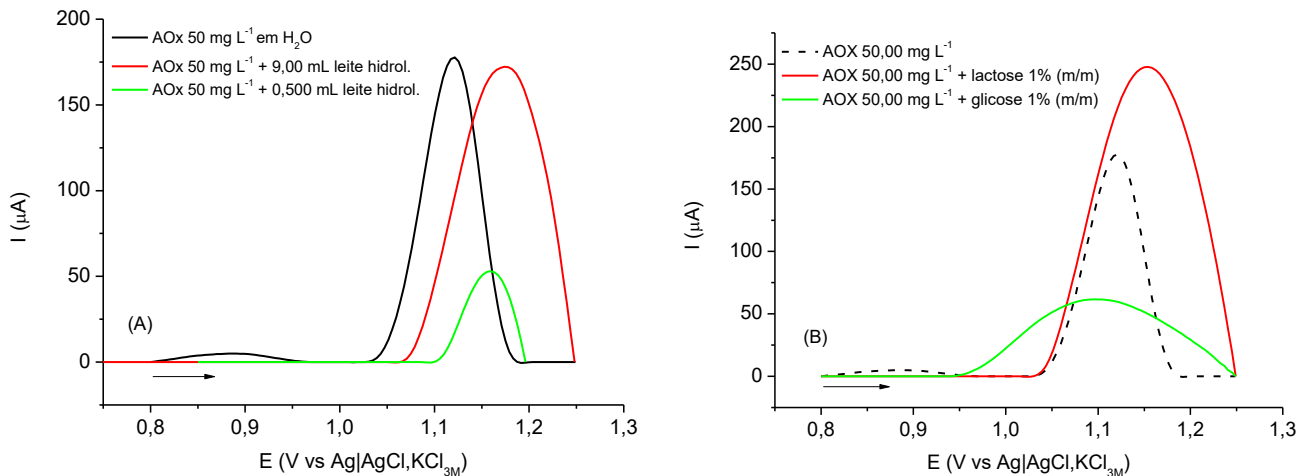
**Figure 22. Voltamogramas de AOx 100,0 mg L<sup>-1</sup> em diferentes proporções de nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) como modificador. Eletrólito de suporte: KOH 0,100 mol L<sup>-1</sup>.**

O leite apresenta em sua composição cerca de 3 a 4% de proteínas dependendo da raça do gado [44], que podem ser consideradas possíveis interferentes à análise voltamétrica de AOx, mascarando o processo de oxidação do antimicrobiano. Com o objetivo de eliminar as possíveis interferências que possam ser causadas por proteínas existentes no leite, foi realizado um pré-tratamento da amostra. Este consiste em precipitar suas proteínas existentes utilizando soluções de sulfato de zinco (ZnSO<sub>4</sub>) e K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] como descrito por [45]. As proteínas precipitadas foram separadas por filtração simples e a solução resultante foi avaliada por DPV. Observando-se o voltamograma obtido da análise desta solução (Figura 23), mesmo após o processo de separação das proteínas não há evidência do processo de oxidação do AOx característico, indicando que as proteínas não são o fator determinante para a interferência no pico anódico do AOx.



**Figure 23. Voltamogramas de análise de AOx 100,0 mg L<sup>-1</sup> por DPV de solução de leite livre de proteínas em CPE. Eletrólito de suporte: KOH 0,100 mol L<sup>-1</sup>.**

A aplicação do método foi avaliada ainda em amostra de leite comercial desnatado sem lactose (outro possível interferente), um dissacarídeo encontrado em uma proporção de 4,7 a 5,2 % (m/m) no leite comum [44]. Pode ser visto na Figura 24.A, a análise de AOx também não foi satisfatória no leite sem lactose, não havendo evidência do pico de oxidação do composto. Como esperado, a utilização do leite sem lactose não apresentou melhores resultados, uma vez que este tipo de leite possui os monossacarídeos constituintes (glicose e galactose), como produtos da reação entre a lactose e a enzima lactase. A Figura 24.B mostra os resultados de análises voltamétricas para soluções de AOx preparadas somente em eletrólito de suporte na presença de padrões de lactose e glicose. A adição de qualquer um destes monossacarídeos em concentração 1,0 (% m/m), que é ainda mais baixa que as encontradas nas amostras, apresenta o mesmo efeito nos voltamogramas obtidos das amostras de leite, ratificando a presença de lactose e/ou outros açúcares presentes no leite como a principal fonte de interferência para análises voltamétricas de AOx nesta matriz.



**Figure 24. A) voltamogramas para análise de AOx 50,00 mg L<sup>-1</sup> em leite sem lactose; (B) Voltamogramas para solução de AOx 50,00 mg L<sup>-1</sup> antes e após adições de lactose 1% (m/m) e glicose 1% (m/m). Eletrólito de suporte: KOH 0,100 mol L<sup>-1</sup>.**

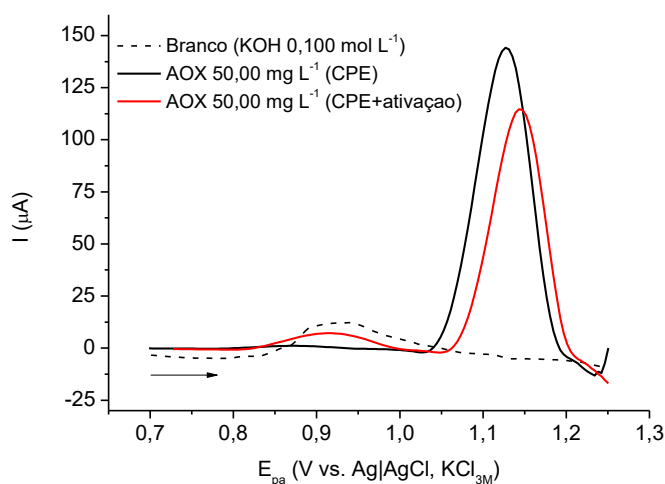
### 3.10. Ensaios de modificação do eletrodo de trabalho para análise de AOx

A modificação de eletrodos de trabalho é uma ferramenta muito utilizada no desenvolvimento de novas metodologias voltamétricas de análise de resíduos e aplicação em matrizes diversas. Visando melhorar a sensibilidade e conseqüentemente a diminuição dos limites de detecção e quantificação do método ou ainda, a diminuição do E<sub>pa</sub> (eletrocatalise) para análise do AOx, avaliou-se diferentes possibilidades de modificação do eletrodo de trabalho. Foram realizados processos de modificação superficial em eletrodo de carbono vítreo, assim como modificações na composição da pasta de carbono com diferentes modificadores, comparando-se com resultados já obtidos neste trabalho para o eletrodo de pasta de carbono não modificado.

#### 3.10.1. Ativação eletroquímica do eletrodo de trabalho

A ativação eletroquímica consiste na modificação da superfície do eletrodo para aumentar a condutividade e controlar sua reatividade e seletividade. Na funcionalização e na ativação, ocorre a ativação de grupos

funcionais presentes na superfície da macromolécula, como ácidos carboxílicos e hidroxilas, através de reações de oxidação [46]. A ativação eletroquímica foi realizada, utilizando 10 ciclos de VC em uma solução de  $0,500 \text{ mol L}^{-1}$  de ácido sulfúrico na região anódica de potencial (0 a + 1,3 V) a uma velocidade de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ . Embora a ativação eletroquímica possa ser utilizada para aumento de intensidade de corrente de pico [47,48], o método não apresentou resultados satisfatórios para ativação do CPE para detecção de AOx, como pode ser visto na Figura 25, em que observa-se diminuição de  $I_{pa}$  e aumento do  $E_{pa}$  após este tratamento da superfície do eletrodo de trabalho.



**Figure 25. Voltamogramas para AOx  $50,00 \text{ mg L}^{-1}$  antes e após ativação da superfície do CPE por tratamento voltamétrico em meio  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,500 \text{ mol L}^{-1}$ . Eletrólito de suporte:  $\text{KOH } 0,100 \text{ mol L}^{-1}$ .**

### 3.10.2. Modificações superficiais de eletrodo para análise de AOx

Foram realizadas modificações superficiais nos eletrodos de carbono vítreo e pasta de carbono pelo método adsorção e evaporação de solvente. Em função da diferença de áreas geométricas entre os eletrodos de trabalho, foram aplicados  $10,00 \text{ µL}$  e  $20,00 \text{ µL}$  de suspensão dos modificadores sobre o GCE e CPE, respectivamente. Todas as suspensões foram preparadas em água deionizada e etanol na concentração de  $1,00 \text{ mg mL}^{-1}$  e mantidas em banho

ultrassônico por 30 minutos antes da aplicação para aumentar a homogeneidade das mesmas. Foram avaliadas as seguintes modificações:

- Modificação 1 – dispersão de MWCNT 1,00 mg mL<sup>-1</sup> em água e etanol.
- Modificação 2 – dispersão de óxido de grafeno 1,00 mg mL<sup>-1</sup> em água e etanol.
- Modificação 3 – dispersão de carbono vítreo em pó 1,00 mg mL<sup>-1</sup> em água e etanol.

A Tabela 7 apresenta os valores médios de  $I_{pa}$  e  $E_{pa}$  para cada uma das modificações superficiais avaliadas tanto em eletrodo base de GCE quanto em CPE, sendo realizadas 3 repetições de cada medida voltamétrica.

**Tabela 7. Valores médios de intensidade de corrente de pico ( $I_{pa}$ ) e potencial de pico ( $E_{pa}$ ) obtidos nas modificações superficiais dos eletrodos de pasta de carbono (CPE) e carbono vítreo (GCE), utilizando-se dispersão em água deionizada e etanol.**

<b>Eletrodo base: CPE</b>				
<b>Dispersão</b>	<b>Água</b>		<b>Etanol</b>	
	<b><math>I_{pa}</math> (<math>\mu</math>A)</b>	<b><math>E_{pa}</math> (V)</b>	<b><math>I_{pa}</math> (<math>\mu</math>A)</b>	<b><math>E_{pa}</math> (V)</b>
<b>Sem modificação</b>	175,6	+ 1,14	175,6	+ 1,14
<b>Modificação 1</b>	148,7	+ 1,14	156,7	+ 1,14
<b>Modificação 2</b>	168,2	+ 1,15	169,1	+ 1,15
<b>Modificação 3</b>	101,2	+ 1,14	134,0	+ 1,14
<b>Eletrodo base: GCE</b>				
<b>Dispersão</b>	<b>Água</b>		<b>Etanol</b>	
	<b><math>I_{pa}</math> (<math>\mu</math>A)</b>	<b><math>E_{pa}</math> (V)</b>	<b><math>I_{pa}</math> (<math>\mu</math>A)</b>	<b><math>E_{pa}</math> (V)</b>
<b>Sem modificação</b>	81,7	+ 1,16	81,7	+ 1,16
<b>Modificação 1</b>	-----	-----	-----	-----
<b>Modificação 2</b>	71,2	+ 1,17	75,3	+ 1,16
<b>Modificação 3</b>	44,0	+ 1,18	53,2	+ 1,17

\* Para imobilização do modificador foram aplicados 10,00  $\mu$ L e 20,00  $\mu$ L de suspensão em GCE e CPE, respectivamente.

### **3.10.3. Modificações de composição do eletrodo de pasta de carbono (CPE) para análise de AOx**

Uma das formas utilizadas para modificação de eletrodos a base de carbono é a formação de compósitos, que são formados pela combinação de duas ou mais fases distintas que ao se misturarem apresentam novas propriedades físico-químicas [49]. Foram misturados diferentes compostos à composição da pasta de carbono, dentre eles MWCNT, óxido de grafeno,  $\text{CuCl}_2$  e o complexo ferrocianeto de ferro (III) também conhecido como azul da prússia (AP) em diferentes proporções.

Os nanotubos de carbono de paredes múltiplas foram obtidos da Merck, possuindo dimensões 20-30 nm de diâmetro, 1-2 nm de espessura de parede e 0,5 – 2,0  $\mu\text{m}$  de comprimento, com 95% de pureza. O óxido de grafeno foi obtido em laboratório através do procedimento descrito em literatura [50]. O AP foi preparado pela mistura equimolar de soluções de  $\text{FeCl}_3$  e  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  em meio ácido e o precipitado formado foi separado por filtração simples [51].

Nas Figuras 26, 27, 28 e 29 pode-se observar que não houve ganho significativo em valores de  $I_{pa}$  para oxidação do AOx em relação ao eletrodo de pasta de carbono não modificado, bem como não foi observado nenhum processo de eletrocatalise que justifique a utilização das modificações avaliadas nestas condições.

Nos casos de modificação utilizando óxido de grafeno e azul da prússia (AP) não foram utilizadas maiores proporções do modificador devido a dificuldade de compactação da pasta. Na utilização de  $\text{CuCl}_2$ , a sua solubilidade em meio aquoso impossibilitou maior quantidade do sal na composição do eletrodo.

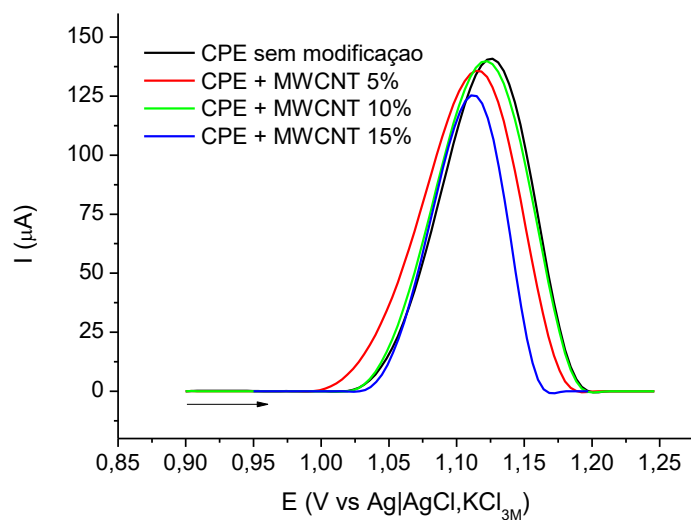


Figura 26. Voltamogramas de AOx 50,00 mg L<sup>-1</sup> em diferentes proporções de nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) como modificador.

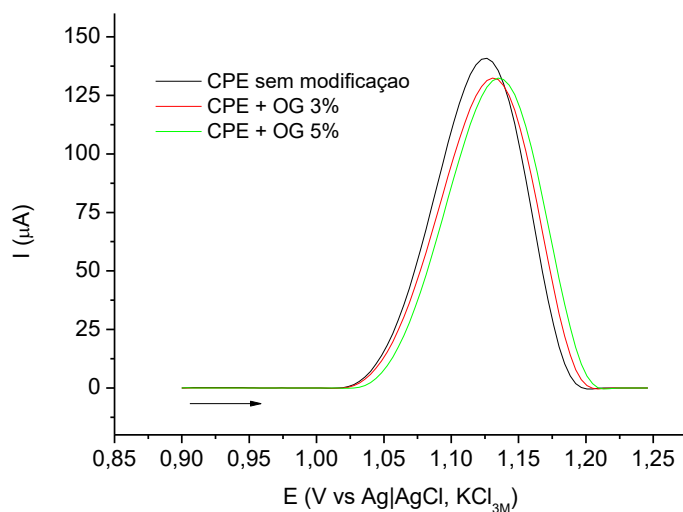
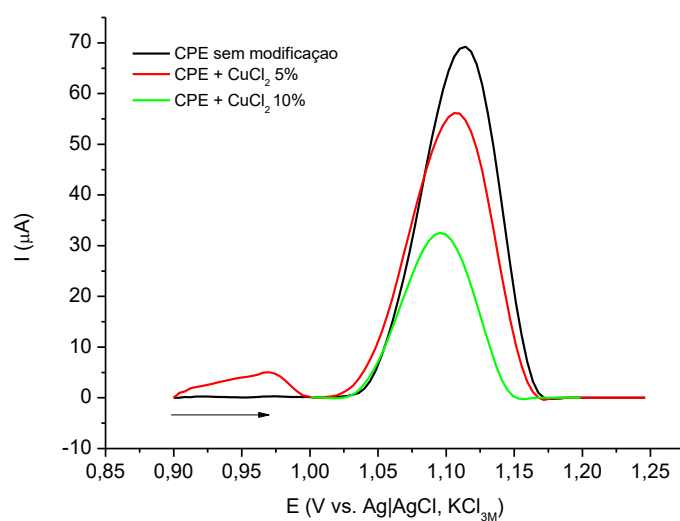
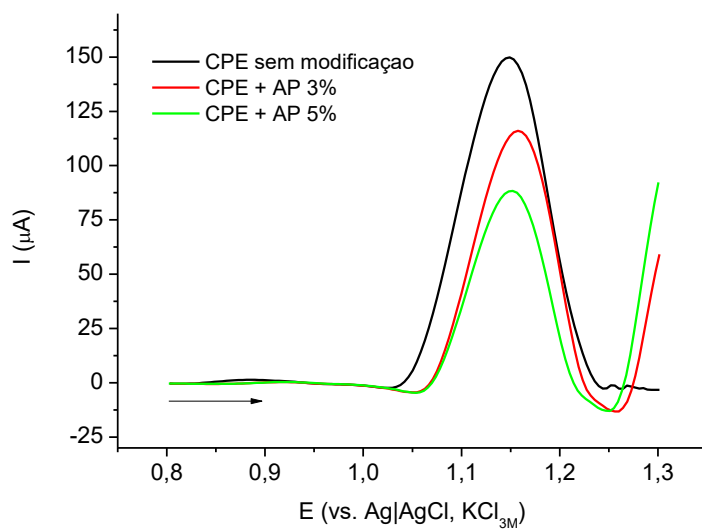


Figura 27. Voltamogramas de AOx 50,00 mg L<sup>-1</sup> em diferentes proporções de óxido de grafeno como modificador. Eletrólito de suporte: KOH 0,100 mol L<sup>-1</sup>.



**Figura 28. Voltamogramas de AOx  $50,00 \text{ mg L}^{-1}$  em diferentes proporções de  $\text{CuCl}_2$  como modificador. Eletrólito de suporte:  $\text{KOH } 0,100 \text{ mol L}^{-1}$ .**



**Figura 29. Voltamogramas de AOx  $50,00 \text{ mg L}^{-1}$  em diferentes proporções de azul da prússia (AP) como modificador. Eletrólito de suporte:  $\text{KOH } 0,100 \text{ mol L}^{-1}$ .**

#### 4. CONCLUSÕES

Um novo método eletroquímico rápido, barato e eficaz para análise do antibiótico ácido oxolínico foi desenvolvido com sucesso na determinação do composto em água. A caracterização eletroquímica do AOx foi realizada por voltametria cíclica em meio básico que favoreceu a solubilidade do composto e a obtenção de um processo anódico, difusional e irreversível em + 1,15 V (vs Ag|AgCl, KCl<sub>3M</sub>), na superfície de um eletrodo de pasta de carbono. A otimização da proporção carbono/aglutinante na confecção da pasta para o eletrodo foi capaz de amplificar a resposta voltamétrica, juntamente com a escolha das variáveis instrumentais da técnica adequadas. A voltametria de pulso diferencial aliada a um processo de pré-concentração adsortiva, mostrou-se a técnica mais sensível para detecção de AOx, com boa linearidade, repetibilidade e precisão. O método foi aplicado para quantificação de AOx em uma amostra de água de lagoa localizada no campus da UFV, demonstrando boa exatidão pelo método de recuperação aparente em amostra intencionalmente contaminada com o analito, confirmando assim, sua aplicabilidade para análises em amostras reais. Como perspectivas futuras a esta etapa do trabalho, visualiza-se o desenvolvimento de um eletrodo quimicamente modificado com o objetivo de diminuir os LD e LQ, bem como o estudo e aplicação deste sensor como alternativa viável para quantificação de AOx em outras matrizes de interesse.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Regitano, J. B.; Leal, R. M. P. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v. 34, p. 601-616, 2010.
2. Aerts, M. M. L.; Hogenboom, A. C.; Brinkman, U. A. T. Analytical strategies for the screening of veterinary drugs and their residues in edible products. **Journal of Chromatography B**. v. 667, p. 1-40, 1995.
3. Boxall, A. B. A.; Fogg, L.; Blackwell, P. A.; Kay, P.; Pemberton, E. J. Review Of Veterinary Medicines In The Environment. **Environment Agency**, Bristol, UK, 2002. Disponível em: [https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/290328/sp6-012-8-tr-e-e.pdf](https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/290328/sp6-012-8-tr-e-e.pdf), acesso em: Dezembro, 2017.
4. Cardoso, L. V.; Tomasini, D.; Sampaio, M. R. F.; Caldas, S. S.; Kleemann, N.; Primel, E. G.; Gonçalves, F. F. Determination of Pharmaceuticals in Surface and Public Supply Water. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 22, p. 1944-1952, 2011.
5. Alexy, R.; Schöll, A.; Kümpel, T.; Kümmerer, K.; **Pharmaceuticals in the Environment, 2nd ed.** (Ed.: K. Kümmerer), Springer-Verlag, Berlim, 2004, pp. 209.
6. Thiele-Bruhn, S. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils – a review. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**. v. 166, p. 145-167, 2003.
7. Gastalho, S.; Da Silva, G. J.; Ramos, F. Uso de antibióticos em aquacultura e resistência bacteriana: impacto em saúde pública. **Acta Farmacêutica Portuguesa**. v. 3, p. 29-45, 2014.
8. Prola, L. D. T.; Buriol, L.; Frizzo, C. P.; Caleffi, G. S.; Marzari, M. R. B.; Moreira, D. N.; Bonacorso, H. G.; Zanatta, N.; Martins, M. A. P. Synthesis of novel quinolines using TsOH/ionic liquid under microwave. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 23, p. 1663-1668, 2012.
9. Faria, A. F.; Souza, M. V. N.; Oliveira, M. A. L. Validation of a Capillary Zone Electrophoresis Method for the Determination of Ciprofloxacin, Gatifloxacin, Moxifloxacin and Ofloxacin in Pharmaceutical Formulations. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 19, p. 389-396, 2008.
10. Andriole, V. T. The Quinolones: past, present and future. **Clinical Infectious Diseases**. v. 41, Supplement 2, S113-9, 2005.
11. Oliphant, C. M.; Green, G. M. Quinolones: a comprehensive review. **American Family Physician**. v. 65, p.455-464, 2002.
12. Ziganshina, L. E.; Titarenko, A. F.; Davies, G. R. Fluoroquinolones for treating tuberculosis (presumed drug-sensitive). **Cochrane Database Of Systematic Reviews**. v. 6, p. 1-83.

13. Vree, T. B.; Van Ewijk-Beneken Kolmer, E. W. J.; Nouws, J. F. M. Direct-Gradient High-Performance Liquid Chromatographic Analysis And Preliminary Pharmacokinetics of Flumequine and Flumequine Acyl Glucuronide in Humans: Effect of Probenecid. **Journal Of Chromatography B: Biomedical Science And Applications**. V. 579, P. 131-141, 1992.
14. Guyonnet, J.; Pacoud, M.; Richard, M.; Doisi, A.; Spavone, F.; Hellings, Ph. Routine Determination of flumequine in kidney tissue of pig using automated liquid chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Science and Applications**. v. 679, p. 177-184.
15. Da Silva, J. M. B.; Hollenbach, C. B. Fluoroquinolonas x Resistência Bacteriana na Medicina Veterinária. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 77, p. 363-369, 2010.
16. Silva, E. N.; Duarte. A. *Salmonella* Enteritidis em Aves: Retrospectiva no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**. v. 4, p. 85-100, 2002.
17. Bjiirklund, H. V.; Rpbbergh, C. M. I.; Bylund, G. Residues of oxolinic acid and oxytetracycline in fish sediments of fish farms. **Aquaculture**. v. 97, p. 85-96, 1991.
18. Capitán-Vallvey, L. F.; Al-Barbarawi, O. M. A.; Fernández-Ramos, M. D.; Avidad, R. Determination of oxolinic acid in cow's milk and human urine by means of a single-use phosphorimetric sensor. **Talanta**. v. 60, p. 247-255, 2003.
19. M.A.P.A. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 09**, Brasília, 2017. Disponível em: [www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes/documentos-da-pncrc/pncrc-2017.pdf](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/plano-de-nacional-de-controle-de-residuos-e-contaminantes/documentos-da-pncrc/pncrc-2017.pdf). acesso em Agosto, 2017.
20. Takatsuki, K. Gas-chromatographic-mass spectrometric determination of oxolinic acid in fish selected ion monitoring. **Journal of Chromatography A**. v. 538, p. 259-267.
21. Pfenning, A. P.; Munns, R. K.; Turnipseed, S. B.; Roybal, J. E.; Holland, D. G.; Long, A. R. Determination and Confirmation of Identities of Flumequine and Nalidixic, Oxolinic, and Piromidic Acids in Salmon and Shrimp. **Journal of Aoac International**. V. 79, p. 1227-1235, 1996.
22. Yánez-Jácome, G. S.; Aguilar-Caballos, M. P.; Gómez-Hens, A. Luminescent Determination of quinolones in milk samples by liquid chromatography/post-column derivatization with terbium oxide nanoparticles. **Journal of Chromatography A**. v. 1405, p. 126-132, 2015.

23. Díaz, R. C. R.; Romero, J. M. F.; Caballos, M. P. A.; Hens, A. G. Determination Of Fluoroquinolones In Milk Samples By Postcolumn Derivatization Liquid Chromatography With Luminescence Detection. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**. V. 54, P. 9670-9676, 2006.
24. Castillo-García, M. L.; Aguilar-Caballos, M. P.; Gómez-Hens, A.; A europium- and terbium-coated magnetic nanocomposite as sorbent in dispersive solid phase extraction coupled with ultra-high performance liquid chromatography for antibiotic determination in meat samples. **Journal of Chromatography A**. v. 1425, p. 73, 2015.
25. Agüí, M. L.; Campaña, A. M. G.; Blanco, C. C.; Gracia, L. G. Determination of quinolones in fish by ultra-high performance liquid chromatography with fluorescence detection using QuEChERS as sample treatment. **Food Control**. v. 50, p. 864-868, 2015.
26. Rocha, D. G.; Santos, F. A.; Da Silva, J. C. C.; Augusti, R.; Faria, A. F. Multiresidue determination of fluoroquinolones in poultry muscle and kidney according to the regulation 2002/657/EC. A systematic comparison of two different approaches: Liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry or tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. v. 1379, p. 83-91, 2015.
27. Herrera-Herrera, A. V.; Hernández-Borges, J.; Borges-Miquel, T. M.; Rodríguez-Delgado, M. A. Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Combined With Ultra-High Performance Liquid Chromatography for the Simultaneous Determination of 25 Sulfonamide And Quinolone Antibiotics in Water Samples. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**. V. 75, P. 130-137, 2013.
28. Prat, M. D.; Benito, R. Compañó, J.; Hernández-Arteseros, J. A.; Granados, M. Determination of quinolones in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography with fluorimetric detection. **Journal of Chromatography A**. v. 1041, p. 27-33, 2004.
29. Herrera-Herrera, A. V.; Ravelo-Pérez, L. M.; Hernández-Borges, J.; Afonso, M. M.; Palenzuela, J. A.; Rodríguez-Delgado, M. A. Oxidized multi-walled carbon nanotubes for the dispersive solid-phase extraction of quinolone antibiotics from water samples using capillary electrophoresis and large volume sample stacking with polarity switching. **Journal of Chromatography A**. v. 1218, p. 5352-5361.
30. Barrón, D.; Jiménez-Lozano, E.; Bailac, S.; Barbosa, J. Simultaneous determination of flumequine and oxolinic acid in chicken tissues by solid phase extraction and capillary electrophoresis **Analytica Chimica Acta**. v. 477, p. 21-27, 2003.

31. Merás, I. D.; De La Peña, A. M.; López, F. S.; Cáceres, M. I. R. Complexation of Antibacterial Quinolonic Acid and Cinolonic Derivatives with Zn(II) and Al(III): Application To Their Determination In Human Urine. **Analyst**. v. 125, p. 1471-1476, 2000.
32. Galli, A.; De Souza, D.; Garbelini, G. S.; Coutinho, C. F. B.; Mazo, L. H.; Avaca, L. A. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Química Nova**, v. 29, p. 105-112, 2006.
33. Brasil. Ministério do Meio Ambiente (MMA). Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). **Resolução N° 357, de 17/03/2005**. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências, 2005.
34. Nicholson, R. S.; Shain, I. Theory of Stationary Electrode Polarography. Single Scan and Cyclic Methods Applied to Reversible, Irreversible, and Kinetic Systems. **Analytical Chemistry**. v. 36, p. 706-723, 1964.
35. Brett, C. M. A.; Brett, A. M. O. **Electrochemistry: Principles, Methods And Applications**. New York: Oxford University Press, New York, p. 444, 1993.
36. Bard, A. J.; Faulkner, L. R. **Electrochemical Methods: Fundamentals And Applications**, JOHN WILEY & SONS, New York, 2001.
37. **Veterinary Substances DataBase**, University of Hertfordshire, UK, <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/vsdb/Reports/1879.htm>, acesso em: outubro, 2017.
38. Tanaka, H; Kuroboshi, M.; Tori, S. In **Organic Electrochemistry, Revised and Expanded**, 5<sup>th</sup> ed.; Hammerich, O.; Speiser, B.; eds.; CRC Press, London, UK, p. 1268, 2016.
39. Garrido, E. M. P. J.; Garrido, J. M. P. J; Milhazes, N.; Borges, F.; Oliveira-Brett, A. M. Electrochemical oxidation of amphetamine-like drugs and application to electroanalysis of ecstasy in human serum **Bioelectrochemistry**. v. 79, p. 77-83, 2010.
40. Kalvoda, R.; Kopanica, M. Adsorptive stripping voltammetry in trace analysis. **Pure & Applied Chemistry**. v. 61, p. 97-112, 1989.
41. International Union of Pure Applied Chemistry (IUPAC). **Spectrochimica Acta**. v. 33B, p. 241, 1978.
42. Miller, J. C.; Miller, J. N. **Statistics for Analytical Chemistry**, 2<sup>nd</sup> ed. Ellis Horwood Limited Publication: Chichester. p. 233, 1984.
43. M.A.P.A. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Manual de Garantia da Qualidade Analítica**. Brasília, p. 40, 2011.

44. EMBRAPA. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01\\_128\\_21720039243.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_128_21720039243.html)>. Acesso em: novembro, 2017.
45. Capitán-Vallvey, L. F.; Osama M. A.; Al-Barbarawi, M. D.; Fernández-Ramos, R. Avidad. Determination of oxolinic acid in cow's milk and human urine by means of a single-use phosphorimetric sensor. **Talanta**. v. 60, p. 247-255, 2003.
46. FEITOSA, J. P. M.; **Funcionalização covalente e não covalente de nanotubos de carbono** (Dissertação de mestrado em química). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.
47. ALVES, T. S., Arruda, G. J. Ativação Eletroquímica em Eletrodos de Pasta de Carbono para Detecção Simultânea de TBHQ e BHA. **Orbital: Electron. J. Chem.** V. 8, p. 276-281, 2016.
48. SOUZA, M. F. B.; Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise: uma breve abordagem. **Química Nova**, v. 20, n. 2, p. 191-195, 1997.
49. Pereira, A. C.; Santos, A. S.; Kubota, L. T. Tendências em Modificação de Eletrodos Amperométricos. **Química Nova**, V. 25, p. 1012-1021, 2002.
50. Jeyapragasam, T.; Saraswathi, R.; Chen, S. M.; Lou, B. S. Detection of Methyl Parathion at an Electrochemically Reduced Graphene Oxide (ERGO) Modified Electrode. **International Journal of Electrochemical Science.**, v. 8 p. 12353 – 12366, 2013.
51. Maryann P. O'Halloran, Miloslav Pravda, George G. Guilbault. Prussian Blue bulk modified screen-printed electrodes for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detection and for biosensors. **Talanta**. v. 55 p. 605–611, 2011.

**CAPÍTULO III – ARTIGO: METODOLOGIA PARA ANÁLISE VOLTAMÉTRICA  
DE SULFACLOROPIRIDAZINA UTILIZANDO ELETRODO MODIFICADO COM  
NANOTUBOS DE CARBONO E LÍQUIDO IÔNICO EM ÁGUA E LEITE**

---

### **CAPÍTULO III - ARTIGO: METODOLOGIA PARA ANÁLISE VOLTAMÉTRICA DE SULFACLOROPIRIDAZINA UTILIZANDO ELETRODO MODIFICADO COM NANOTUBOS DE CARBONO E LÍQUIDO IÔNICO EM ÁGUA E LEITE**

#### **RESUMO**

Uma metodologia eletroanalítica desenvolvida utilizando um eletrodo contendo um material compósito de pasta de carbono modificada com nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) e tetrafluorborato de 1-butil-3-metilimidazolio (BMIMBF<sub>4</sub>) foi aplicada para análise rápida de resíduos de Sulfaclopiridazina (SCP) em leite por voltametria de pulso diferencial (DPV). A investigação do comportamento eletroquímico e a caracterização do processo redox do composto foram realizadas por voltametria cíclica (CV) e voltametria de onda quadrada (SWV). As condições experimentais para o processo catódico irreversível observado em – 0,655 V vs. Ag|AgCl, KCl<sub>3M</sub> foram otimizadas, permitindo análises com limites de quantificação (LQ) de 0,0854 mg L<sup>-1</sup> de SCP em água e 4,65 mg L<sup>-1</sup> em leite desnatado. Além disso, os valores de recuperação para diferentes níveis de concentração da faixa de trabalho foram obtidos entre 94,5 e 105,7 %. Todas as análises realizadas em leite não necessitaram de qualquer processo de extração ou pré-concentração do SCP, conferindo ao método desenvolvido rapidez, simplicidade e baixo custo relativo.

*Palavras chave: Antimicrobiano; sulfonamida; Voltametria de pulso diferencial; tetrafluorborato de 1-butil-3-metilimidazolio (BMIMBF<sub>4</sub>).*

## 1. INTRODUÇÃO

O uso de medicamentos veterinários como os antimicrobianos pode causar problemas à saúde humana como riscos de envenenamento ou reações alérgicas, além de permitir a contaminação do meio ambiente e inserir resíduos destes compostos na cadeia alimentar, que são as principais preocupações dos consumidores e órgãos reguladores [1]. Além destes problemas, o uso indiscriminado de medicamentos na produção animal pode causar aumento da resistência bacteriana, e conseqüentemente a diminuição da eficiência destes compostos no tratamento de doenças tanto em seres humanos como em animais [2]. Fluoroquinolonas, sulfonamidas (SAs),  $\beta$ -lactamas e tetraciclinas são alguns dos antimicrobianos cujo uso é permitido para prevenir e tratar doenças animais em medicina veterinária [3].

Na produção do leite, um dos produtos de origem animal largamente consumido, a presença de antimicrobianos pode afetar também o processo de fermentação, o que torna a regulamentação de contaminantes sobre este produto ainda mais rigorosa [4,5].

As sulfonamidas (SAs) são compostos quimioterapêuticos amplamente utilizados em medicina veterinária para o tratamento de infecções bacterianas na forma de aditivos para alimentação animal [6]. A contaminação por alimentos contendo resíduos de SAs podem causar a formação tumores foliculares tireoidianos [7], além de efeitos comuns a outros antimicrobianos como, reações alérgicas [8] e resistência bacteriana [9]. As sulfonamidas apresentam-se como derivados N-substituídos da sulfanilamida como mostrado na Figura 30.A, assim como a sulfaclorpiridazina (SCP), alvo deste trabalho (Figura 30.B). Estes compostos são capazes de prejudicar a reprodução bacteriana, atuando como inibidores competitivos do ácido p-aminobenzóico e dificultando o metabolismo bacteriano [10].

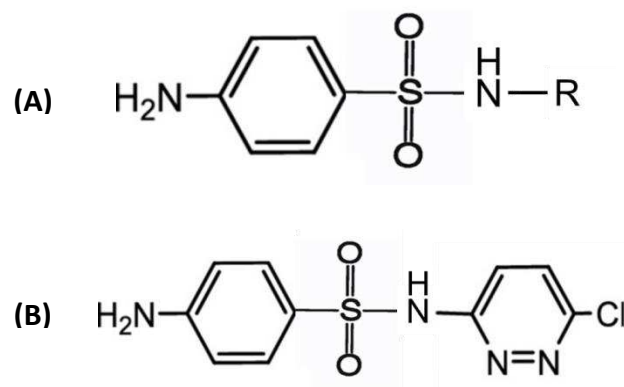


Figura 30. (A) Estrutura geral das sulfonamidas; (B) Estrutura molecular do antimicrobiano sulfaclopiridazina.

Diversas técnicas vêm sendo empregadas para análises de SAs em diferentes matrizes, dos quais os métodos mais empregados incluem bioensaios, cromatografia líquida (LC) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) e métodos espectrofotométricos [11]. Juntamente as diferentes técnicas de análise são descritos vários procedimentos de pré-tratamento de amostras e extração como: extração em fase sólida (SPE) [12], micro extração em fase sólida (SPME) [13], microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) [14] e dispersão de matriz em fase sólida (MSPD) [15]. A Tabela 8 lista algumas outras metodologias descritas na literatura, bem como as matrizes avaliadas e os limites de detecção (LD) obtidos por cada método. Até o momento não se encontra descrito em literatura nenhum método voltamétrico para análise direta de SCP. Dentre os métodos eletroquímicos, são encontrados alguns métodos eletroforéticos determinação de SCP, assim como outras sulfonamidas [16-20].

Tabela 8. Técnicas analíticas comuns para determinação de SCP.

Técnica analítica*	Matriz	LD	Referência
HPLC	Fígado suíno	3,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[10]
ELISA	Carne suína	< 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$	[11]
CE-MS/MS	Carne suína	3,12 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[21]
LC	Solos	Não definido	[22]
HPLC	Água	0,003 $\mu\text{g mL}^{-1}$	[23]
Espectrofotometria UV	Água	0,11 $\mu\text{g mL}^{-1}$	[24]
LC	Leite	0,004 $\mu\text{g g}^{-1}$	[25]
HPLC	Água e leite	0,00021 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (água) / 2.0 ng $\text{mL}^{-1}$ (leite)	[26]
Espectroscopia de fluorescência	Leite	5,3 – 37,5 $\mu\text{g L}^{-1}$	[27]
HPLC-UV-Vis	Solos	50 – 60 $\mu\text{g L}^{-1}$	[28]

Assim como as demais sulfonamidas, a sulfaclopiridazina (SCP) é uma das quais ainda não foi reportado nenhum método voltamétrico de análise. Assim, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de uma metodologia voltamétrica para determinação de SCP em leite, desde o estudo do seu comportamento voltamétrico até a aplicação em amostra.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Reagentes

Os reagentes utilizados neste trabalho foram todos de grau analítico e não passaram por nenhuma etapa prévia de purificação. O padrão analítico de SCP (4-amino-N-(6-clorpiridazin-3-il)benzenosulfonamida) foi obtido da Sigma-

Aldrich (FLUKA, padrão analítico, Bélgica). Água ultrapura obtida em um sistema Millipore Milli-Q (USA) foi usada em todos os ensaios eletroquímicos.

Devido à sua baixa solubilidade em meio puramente aquoso, a solução estoque de SCP foi preparada em metanol (grau HPLC) a uma concentração de 1,000 mg L<sup>-1</sup> e armazenada sob refrigeração (abaixo de 10° C) e as soluções diluídas foram preparadas sempre no mesmo dia de cada análise. Todos os outros reagentes utilizados, bem como sua procedência estão listados na Tabela 9.

**Tabela 9. Descrição de reagentes utilizados.**

<b>Reagente</b>	<b>Pureza</b>	<b>Procedência</b>	<b>País</b>
Metanol	HPLC grade	Fisher	EUA
BMIMBF <sub>4</sub>	100%	Sigma-Aldrich	EUA
HCl; HNO <sub>3</sub> ; H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; HClO <sub>4</sub> ; KCl	36,5 %; 65 %; 95 %; 70 %; 97%	Vetec	Brasil
Tampão BR (CH <sub>3</sub> COOH; H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ; H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	99,7%; 99,5%; > 85%	Vetec	Brasil
Grafite em pó	99,9%	Merck	Alemanha
Óleo mineral	100 %	Acrós Organics	Belgica

## 2.2. Equipamentos

A instrumentação eletroquímica utilizada neste trabalho foi um potenciostato/galvanostato PGSTAT 128 N Autolab potentiostat (Eco-Chemie, Utrecht, The Netherlands). O equipamento foi interfaciado a um computador pelo software GPES (versão 4.9) e para todas as medidas foi utilizada uma célula eletroquímica convencional de 50 mL equipada com arranjo de três eletrodos, cujas funcionalidades foram descritas com maiores detalhes anteriormente [29]. Todos os eletrodos foram adquiridos da Metrohm® (Switzerland).

### **2.3. Eletrodo de pasta de carbono (CPE) e eletrodos modificados**

Todos os diferentes eletrodos de pasta de carbono avaliados foram preparados de modo similar: a pasta de carbono foi preparada pela mistura de grafite em pó (Merck, Alemanha), juntamente dos possíveis modificadores e do óleo mineral (Acros Organic, Bélgica) em proporções adequadas. A mistura resultante de cada proporção foi dispersa em n-hexano (Sigma-Aldrich) e agitada por aproximadamente 2 horas por um agitador magnético (CORNING, PC-420D) até a evaporação completa do solvente. Posteriormente, a pasta de carbono foi seca em temperatura ambiente ( $25 \pm 1^\circ \text{C}$ ) por 24 horas antes da utilização. Para realização das medidas voltamétricas a pasta de carbono foi inserida no eletrodo, evitando-se a formação de espaços vazios no seu interior e de forma a obter-se uma superfície homogênea. Após cada medida voltamétrica foi realizada a renovação da superfície eletródica pela remoção e substituição de uma camada superficial de pasta no eletrodo de trabalho. Nos ensaios para escolha do eletrodo de trabalho a ser aplicado nas análises de SCP, foi utilizada a voltametria de pulso diferencial (DPV), levando-se em consideração a precisão e sensibilidade da técnica.

### **2.4. Avaliação do comportamento voltamétrico**

Para o estudo mais detalhado do comportamento voltamétrico da SCP foram obtidas informações de diferentes técnicas voltamétricas, como a voltametria cíclica (CV) que permitiu avaliar a reversibilidade do processo eletroquímico em diferentes eletrólitos de suporte avaliados. Por outro lado, o estudo da influência da frequência de aplicação de pulsos da voltametria de onda quadrada (SWV) que permite elucidar as características do processo de transferência de massa existente na superfície do eletrodo de trabalho. E associado a isso, as informações necessárias para determinação do número de elétrons transferido no processo foram obtidas a partir de voltamogramas em pulso diferencial (DPV).

## 2.5. Amostras de leite

Foi avaliada a aplicação do método desenvolvido para análise de SCP em leite UHT comercializado em embalagens cartonadas TetraPak®. Uma marca de leite escolhida aleatoriamente foi adquirida no comércio da cidade de Viçosa, levada ao laboratório e armazenada sob refrigeração ( $5 \pm 1^\circ\text{C}$ ) até o dia de análise. Em todos os processos não foi realizada nenhuma etapa de extração, pré-concentração ou preparo das amostras. Especificamente para análises em amostra de leite, a solução foi deixada em repouso por 5 minutos antes das medidas para decantação do precipitado formado da reação entre o eletrólito de suporte e a matriz.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Caracterização do processo redox para SCP

No primeiro passo do trabalho, procurou-se estabelecer as condições do eletrólito de suporte mais favoráveis à observação dos processos redox da SCP. Levando-se em consideração que a solução estoque do analito foi preparada em metanol, foi padronizada a utilização de 10 % (V/V) de metanol em todas as soluções de análise. Esta quantidade foi suficiente para garantir a solubilidade do SCP em todas as concentrações utilizadas nesta pesquisa.

Inicialmente, foram realizadas varreduras do analito em voltametria cíclica (CV) a uma velocidade de varredura ( $v$ ) de  $100 \text{ mV s}^{-1}$  na faixa de potencial entre + 1,4 V e - 1,5 V vs. Ag|AgCl, KCl<sub>3M</sub>, utilizando-se soluções de HCl, KCl, KOH e tampão Britton-Robinson (BR), em concentração  $0,100 \text{ mol L}^{-1}$ . Todos os testes foram realizados mantendo-se uma concentração de metanol em solução de 10 % (% v/v) para evitar qualquer precipitação do SCP devido à sua baixa solubilidade em meio puramente aquoso.

Observa-se na Figura 31 a presença de um pico bem definido de um processo de redução em - 0,702 V mais evidente em HCl. Avaliando-se o intervalo de potencial positivo observa-se a presença de um pico anódico não definido na região de potencial entre + 1,0 e 1,3 V. Em nenhum dos diferentes

eletrólitos utilizados foi possível obter-se uma boa reprodutibilidade do pico de oxidação do composto. Desta forma, o pico proveniente do processo catódico teve seu comportamento avaliado para quantificação do composto de interesse.

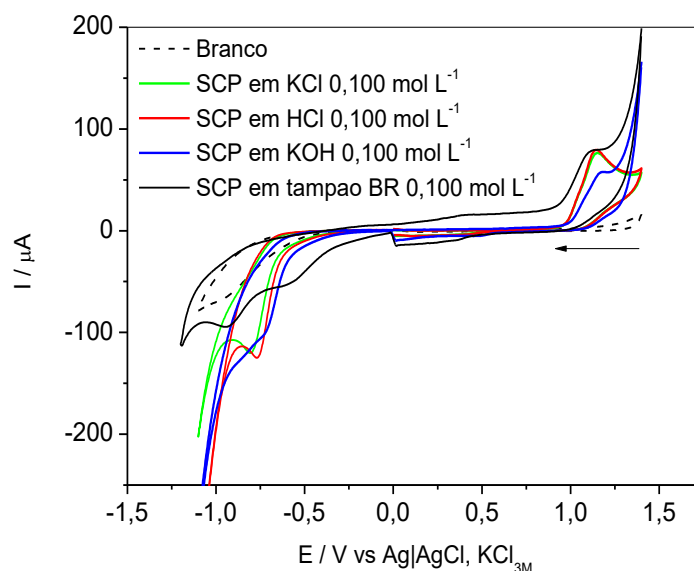
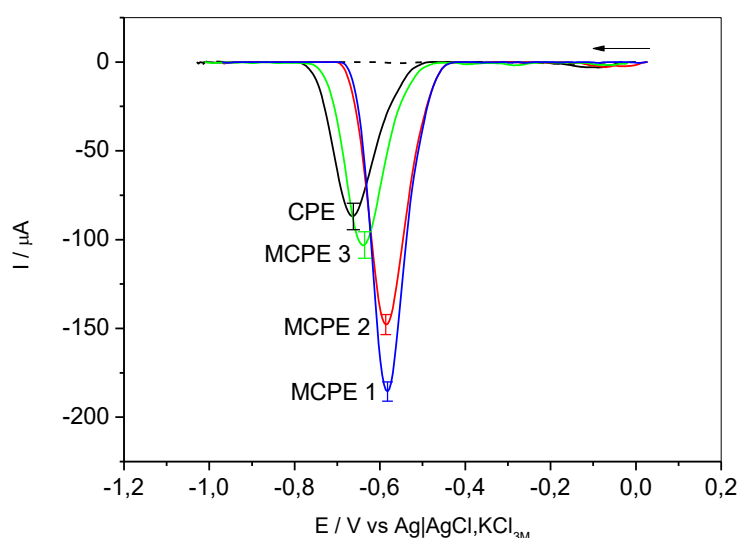


Figura 31. Voltametria cíclica de SCP 50,00 mg L<sup>-1</sup> em diferentes eletrólitos de suporte.

### 3.2. Eletrodo modificado

A utilização de um eletrodo modificado a base de grafite em pó com a inclusão de nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs) e tetrafluoroborato de 1-butil3-metilimidazolio (BMIMBF<sub>4</sub>) foi avaliada pela resposta voltamétrica de uma solução de SCP 50,00 mg L<sup>-1</sup> em eletrodos contendo diferentes quantidades de modificadores MWCNTs e BMIMBF<sub>4</sub> em comparação com um eletrodo de pasta de carbono não modificado (CPE). A resposta voltamétrica obtida deste eletrodo foi comparada aos seguintes eletrodos modificados: um eletrodo de pasta de carbono contendo os dois modificadores (MCPE1); outro eletrodo contendo apenas grafite em pó e nanotubos de carbono (MCPE2) e um terceiro eletrodo contendo apenas grafite em pó e o líquido iônico (BMIMBF<sub>4</sub>) adicionado à composição da pasta de carbono (MCPE3). Em todos os eletrodos avaliados a proporção de cada modificador adicionado foi mantida em 5 % (% m/m), assim o eletrodo MCPE 1 contém 5 % de MWCNT e 5 % (% m/m) de líquido iônico em sua composição.

Os voltamogramas em DPV obtidos em cada um dos eletrodos avaliados são mostrados na Figura 32, juntamente com o desvio da  $I_{pc}$  obtido entre as medidas (N = 5). Como pode se visto, o MCPE 1 foi aquele que obteve melhores resultados de  $I_{pc}$  acompanhados do menor desvio entre as medidas realizadas. O eletrodo modificado foi aplicado em testes subsequentes com a proporção de componentes [grafite : MWCNT : BMIMBF<sub>4</sub> : óleo mineral] distribuída em [60 : 5 : 5 : 30] % (% m/m). Porções maiores de qualquer um dos modificadores não favorecem o processo de compactação e homogeneização da pasta no interior do eletrodo, causando aumento dos ruídos da linha de base dos voltamogramas e reduzindo a repetibilidade das medidas. A diminuição da proporção dos modificadores abaixo de 5 % não causa alterações efetivas em relação ao eletrodo não modificado.



**Figura 32. Voltamogramas de SCP 50,00 mg L<sup>-1</sup> obtidos por DPV em CPE e três eletrodos modificados (MCPE 1, MCPE 2 e MCPE 3).**

### **3.3. Ajuste do eletrólito de suporte para MCPE 1**

Pelos voltamogramas cíclicos fica evidente o favorecimento do processo catódico em meio ácido, sendo assim foi avaliada a influência da alteração da espécie utilizada como eletrólito de suporte, em que foram testados os ácidos HCl, HNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, HClO<sub>4</sub> e tampão BR (pH 1). Observa-se na Figura 33.A que o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> apresentou voltamogramas com maior intensidade de

corrente catódica ( $I_{pc}$ ) e menor potencial de pico ( $E_{pc}$ ) das medidas por voltametria de pulso diferencial (DPV). Adicionalmente, o efeito da concentração do  $H_2SO_4$  sobre a análise do SCP foi estudada até uma concentração de  $0,300 \text{ mol L}^{-1}$ . A partir do aumento de concentração do eletrólito de suporte pode-se observar o favorecimento do processo de transferência de massa, evidenciado pelo aumento da corrente de pico e pela diminuição do potencial de pico catódico ( $E_{pc}$ ) dos voltamogramas mostrados na Figura 33.B. A utilização de concentrações acima de  $0,300 \text{ mol L}^{-1}$  não se mostraram viáveis devido ao aumento acentuado da largura de pico a meia altura ( $W_{1/2}$ ), que poderia dificultar a análise do SCP em amostras de origem animal.

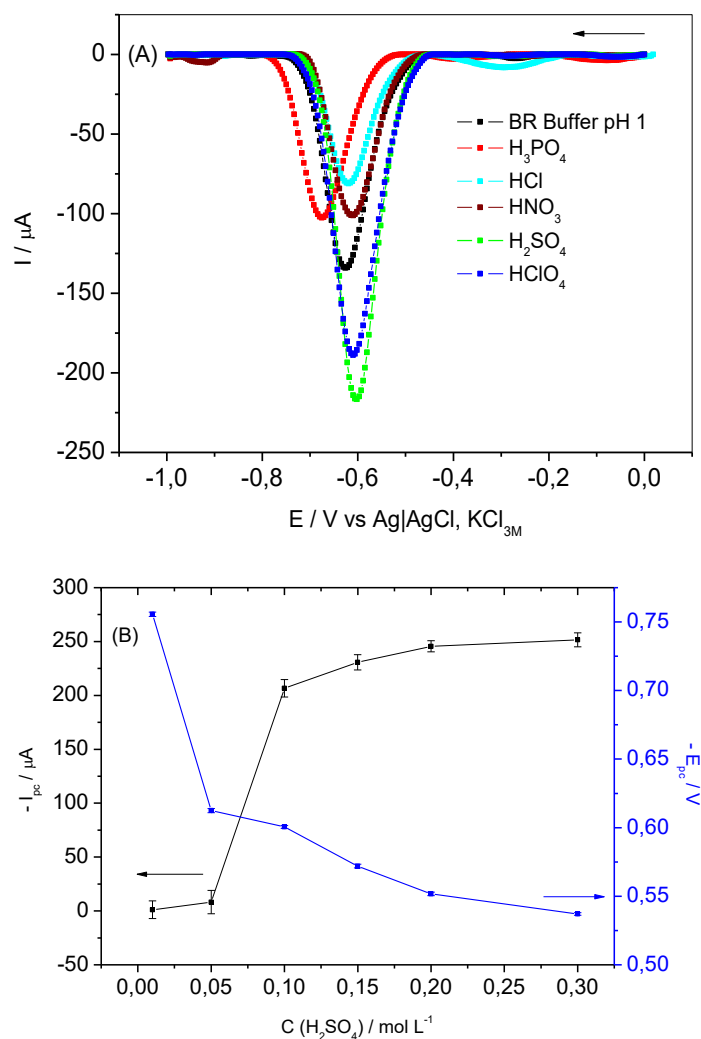
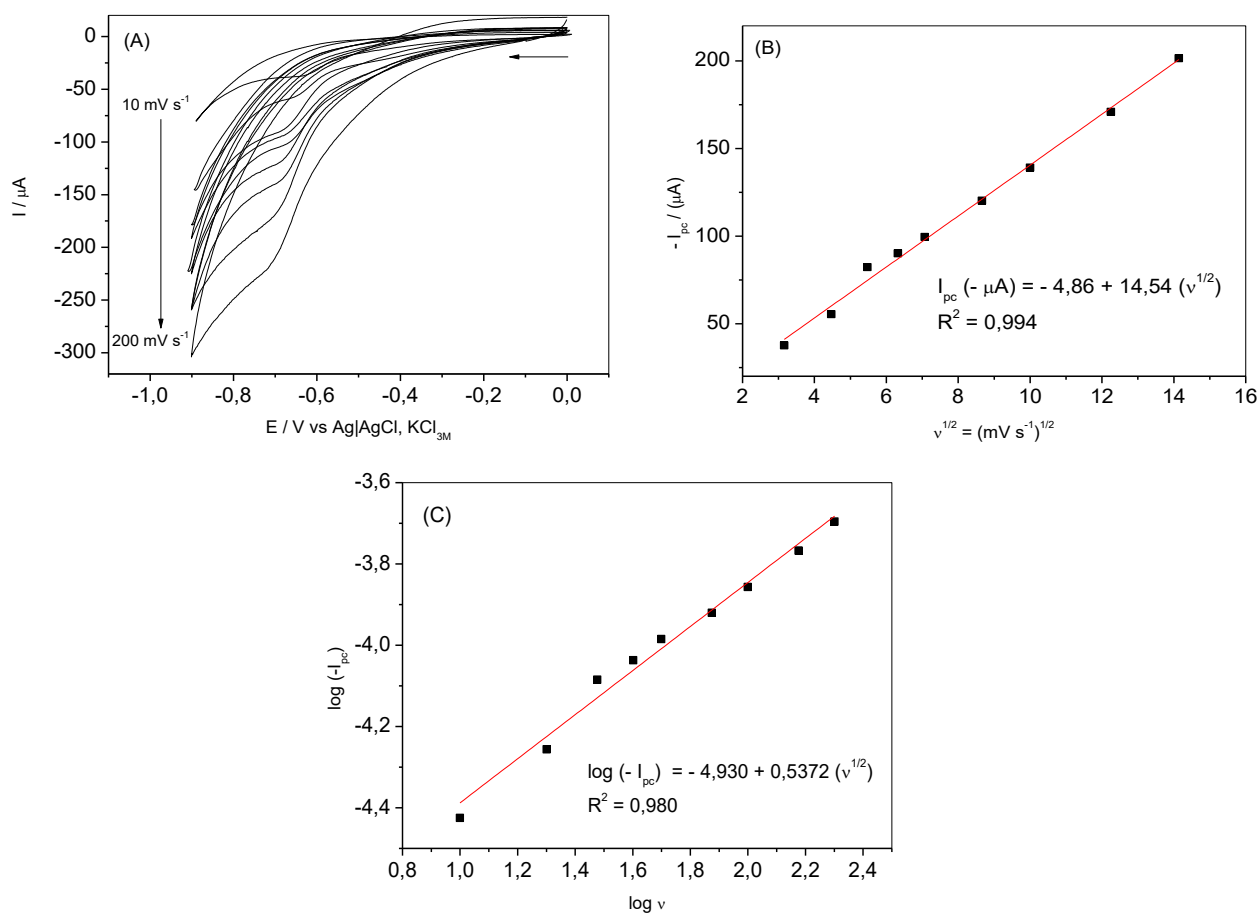


Figura 33. (A) Voltamogramas DPV para uma solução de SCP  $50,00 \text{ mg L}^{-1}$  em diferentes eletrólitos de suporte. (B) Influência de concentração de  $H_2SO_4$  sobre  $I_{pc}$  e  $E_{pc}$  para solução de SCP.

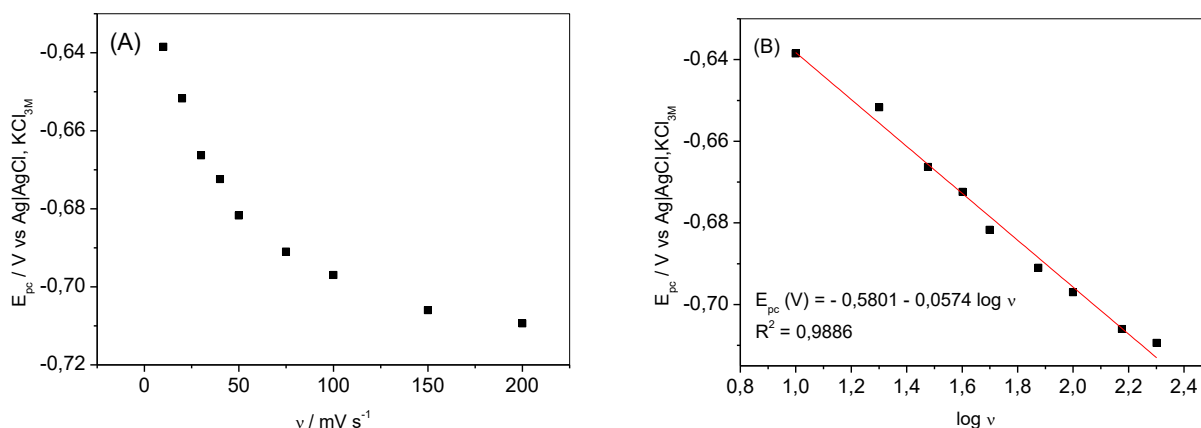
### 3.4. Influência da velocidade de varredura de potencial ( $v$ ) em voltametria cíclica (CV)

Como uma das ferramentas de diagnóstico do comportamento de um processo redox, a influência da velocidade de varredura em CV foi avaliada e os voltamogramas obtidos em cada velocidade são mostrados na Figura 34.A, na qual se observa a variação dos voltamogramas de 10 a 200  $\text{mV s}^{-1}$ . Esta variação apresenta uma relação linear entre a raiz quadrada da velocidade de varredura ( $v$ ) e a intensidade de corrente do pico catódico até a velocidade de 200  $\text{mV s}^{-1}$ , como pode ser visto na Figura 34.B. Assim como os resultados obtidos em SWV, esta relação caracteriza um processo eletroquímico controlado predominantemente por difusão [30]. Além desta observação, o processo de transferência de massa também pode ser determinado pela avaliação da relação entre  $\log(I_{pc})$  e  $\log(v)$ . Neste caso específico, o comportamento de difusão caracteriza-se pelo valor do coeficiente angular (inclinação) da reta próximo a 0,5, como pode ser observado na Figura 34.C. [30]



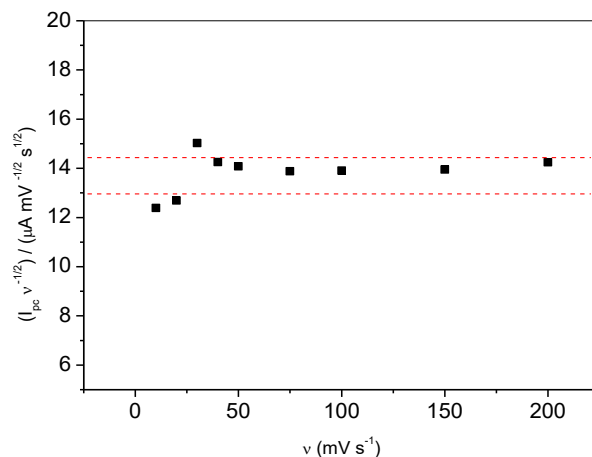
**Figura 34. A) Voltamogramas cíclicos em diferentes valores de  $(v)$  10; 20; 30; 40; 50; 100; 150; 200  $\text{mV s}^{-1}$ ; B) Variação da intensidade da corrente de pico catódico ( $I_{pc}$ ) em função da raiz quadrada da velocidade de varredura ( $v^{1/2}$ ) do potencial elétrico; C) variação do logaritmo da corrente de pico anódico em função do logaritmo da velocidade de varredura em VC. Solução SCP 50,00  $\text{mg L}^{-1}$  em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,300  $\text{mol L}^{-1}$  sobre MCPE 1.**

As características de reversibilidade do sistema para a SCP na superfície do eletrodo modificado MCPE1 podem ser determinadas principalmente pelo monitoramento do potencial de pico  $E_{pc}$  nas diferentes velocidades de varredura aplicadas. Como se pode verificar na Figura 35.A, a partir da variação de  $(v)$  ocorre uma alteração de  $E_{pc}$  para valores mais negativos, fenômeno típico de processos irreversíveis. Assim como a relação linear encontrada entre  $E_{pc}$  e  $\log(v)$ , observada na Figura 35.B e que também caracteriza um processo de transferência eletrônica irreversível [31].



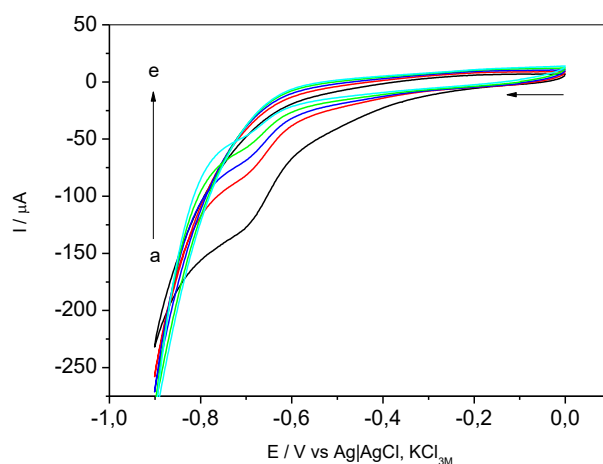
**Figura 35. (A) Variação do potencial de pico catódico em função da velocidade de varredura em CV para SCP 50,00 mg L<sup>-1</sup>. (B) Variação do potencial de pico catódico em função do logaritmo da velocidade de varredura em CV para SCP 50,00 mg L<sup>-1</sup>. Eletrólito de suporte: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,300 mol L<sup>-1</sup>.**

A função corrente também foi determinada para o processo de redução de SCP e também confirma a irreversibilidade do processo. Dada pela relação entre o parâmetro ( $I_{pa}/v^{1/2}$ ) e a velocidade de varredura de potencial ( $v$ ), a função corrente é mostrada na Figura 36. Apesar dos três primeiros pontos determinados apresentarem fora de uma faixa demarcada no gráfico de  $\pm 5\%$  em relação à média dos outros pontos, podendo ser considerada aproximadamente constante por não se observar nenhuma tendência de aumento ou diminuição da função corrente em relação à velocidade de varredura ( $v$ ), uma característica de confirmação do processo catódico irreversível [32].



**Figura 36. Variação da função corrente ( $I_{pc} / v^{1/2}$ ) em relação a variação da velocidade de varredura de potencial em solução de SCP 50,00 mg L<sup>-1</sup> em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,300 mol L<sup>-1</sup>. \* A faixa em destaque indica um desvio de  $\pm 5,0$  % em relação ao valor médio da função corrente encontrada para todos os pontos.**

Utilizando-se varreduras sucessivas em CV sem a renovação manual da superfície do eletrodo de trabalho foi observada uma diminuição gradativa da intensidade da corrente de pico catódico ( $I_{pc}$ ) após cada ciclo como pode ser observado na Figura 37. Este resultado ocorre devido a influência de um processo de adsorção do produto de redução da SCP sobre a superfície do eletrodo de trabalho diminuindo a intensidade de corrente a cada ciclo aplicado. A adsorção deste produto inviabiliza a limpeza eletroquímica da superfície do eletrodo de trabalho. Dessa forma a renovação da superfície do eletródica foi realizada manualmente por substituição da camada superior do eletrodo modificado antes de cada medida voltamétrica.



**Figura 37. Voltamogramas em ciclos sucessivos: a) 1º ciclo; b) 2º ciclo; c) 3º ciclo; d) 5º ciclo; e) 10º ciclo. ( $v = 100$  mV s<sup>-1</sup>) em solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,300 mol L<sup>-1</sup>.**

### 3.5. Comportamento voltamétrico do SCP em MCPE1 por voltametria de onda quadrada (SWV)

O comportamento voltamétrico de SCP no eletrodo modificado foi avaliado utilizando-se  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,300 \text{ mol L}^{-1}$ . Como já observado nos primeiros testes em CV a presença de um pico catódico sem a presença de um pico anódico em um potencial próximo sugere um processo de redução irreversível na superfície do eletrodo de trabalho. Assim, foi verificada a influencia da frequência de aplicação dos pulsos ( $f$ ) sobre os voltamogramas obtidos em SWV. Os voltamogramas obtidos em cada frequência são mostrados na Figura 38.A e de acordo com a Figura 38.B, pode-se verificar uma relação linear entre a  $I_{pc}$  e a raiz quadrada da frequência de pulsos ( $f^{1/2}$ ). Esta relação linear indica um processo controlado pela difusão do analito do seio da solução para a superfície do eletrodo de trabalho [33,34].

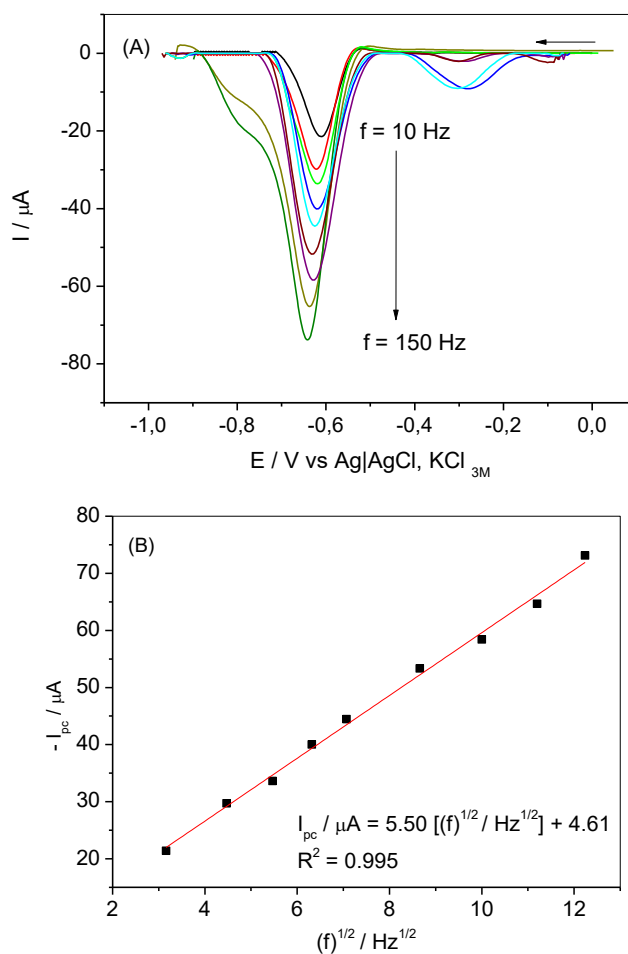


Figura 38. (A) Voltamogramas (SWV) em diferentes frequências para SCP  $50,00 \text{ mg L}^{-1}$ . (B) Relação entre  $I_{pc}$  e raiz quadrada da frequência aplicada em SWV.

Em casos em que não há boa definição do pico de redução ou oxidação de um composto na análise por voltametria cíclica, uma alternativa é a utilização da voltametria de onda quadrada (SWV) como ferramenta de diagnóstico de comportamento voltamétrico. Neste trabalho a SWV foi utilizada de forma análoga à CV para avaliação das características do processo de redução da SWV.

Além do caráter difusional do processo já identificado no Capítulo III deste trabalho pela relação linear entre  $I_{pc}$  e a raiz quadrada da frequência, observa-se nestes sistemas que os potenciais de pico variam de forma linear com o logaritmo da frequência de pulso aplicado em SWV, cuja inclinação da reta obtida pode ser descrita por Lovric pela Equação 4 [33]:

$$E_p = -\frac{2,3RT}{\alpha nF} \log f \quad (4)$$

onde  $R$  é a constante dos gases ideais,  $T$  é a temperatura do sistema,  $\alpha$  é o coeficiente de transferência eletrônica,  $n$  é o número de elétrons transferidos no processo redox e  $F$  é a constante de Faraday. Desta forma, considerando a inclinação da reta ( $E_{pc}$  vs.  $\log f$ ) mostrada na Figura 39 e o valor de  $\alpha$  igual a 0,5, valor normalmente utilizado em processos caracterizados com transporte de massa por difusão [35], foi obtido o valor de  $n$  aproximadamente igual a 2 elétrons para a redução da SCP. Resultado que se encontra em concordância com o valor obtido nos testes por CV.

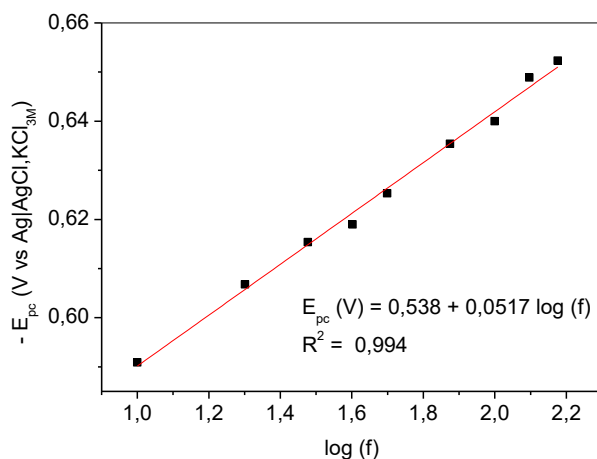


Figura 39. Variação do potencial de pico catódico em função do logaritmo da frequência de pulso em SWV para SCP 50,00 mg L<sup>-1</sup> em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,300 mol L<sup>-1</sup>.

### 3.6. Proposta de mecanismo para redução de SCP em MCPE1

Adicionalmente, de acordo com a metodologia descrita por (Brett & Brett, 1993), o número de elétrons transferidos no processo eletrodico também pode ser estimado por intermédio da largura de pico à meia altura da análise do composto por DPV. A Equação 1 permite que o número de elétrons transferidos seja calculado [31]:

$$W_{1/2} = \frac{3.52 RT}{nF} \quad (1)$$

em que  $W_{1/2}$  é a largura do pico redox a meia altura,  $R$  é a constante dos gases ideais (8.314 J K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>),  $T$  é a temperatura do sistema (298 K),  $F$  é a constante de Faraday (96485 C mol<sup>-1</sup>) e  $n$  é o número de elétrons transferidos por molécula de SCP reduzida. Pelo cálculo da Equação 1, obtemos o valor de  $n$  igual a 2 elétrons transferidos em cada unidade de SCP. Este cálculo ratifica o resultado obtido para o número de elétrons transferidos em SWV.

De acordo com o comportamento voltamétrico do SCP nas condições avaliadas e considerando o processo catódico irreversível com transferência de 2 elétrons por molécula, juntamente com a dependência da resposta voltamétrica com a concentração de [H<sup>+</sup>] no sistema, é possível elucidar uma

proposta de mecanismo para o processo de redução na superfície do eletrodo desenvolvido. A Figura 40 mostra as etapas do mecanismo de redução que envolvendo etapas eletroquímicas com a adição de 2 elétrons e a etapa química em que há a protonação do ânion formado seguido pela clivagem da sulfonamida. O mecanismo é semelhante à proposta já apresentada em outros trabalhos que descrevem o processo para compostos semelhantes em diferentes eletrodos [36,37].

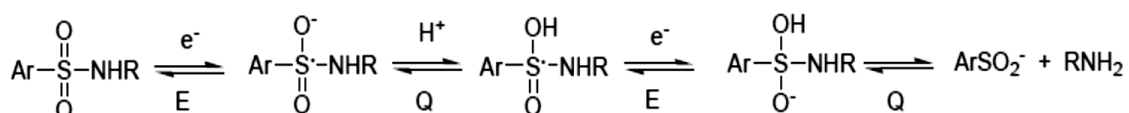


Figura 40. Proposta de mecanismo para redução eletroquímica de SCP em MCPE 1

### 3.7. Otimização de parâmetros instrumentais para DPV e SWV

As variáveis instrumentais das técnicas voltamétricas podem afetar consideravelmente a resposta obtida para um mesmo analito em uma determinada concentração. Desta forma a escolha dos parâmetros instrumentais adequados pode garantir a detecção de concentrações mais baixas do composto de interesse. Os parâmetros das técnicas de pulso DPV e SWV foram avaliados de modo univariado, no intuito de aumentar os valores obtidos de  $I_{pc}$  e minimizar os desvios de corrente de pico.

Três parâmetros instrumentais da DPV (velocidade de varredura, amplitude de pulso e tempo de pulso), assim como da SWV (Frequência de pulso, amplitude de pulso e incremento de varredura) foram avaliados de forma univariada para análise de SCP no eletrodo modificado MCPE1. Assim como os testes realizados no Capítulo II, as maiores valores de  $I_{pc}$  juntamente com os menores valores de largura de pico a meia altura e desvio entre medidas foram os parâmetros para definição das condições técnicas de análise. Nas Figuras 41.A, 41.B e 41.C estão mostrados resultados obtidos em DPV para a variação de  $I_{pc}$  e  $W_{1/2}$  em função da amplitude de pulso, da velocidade de varredura e do tempo de pulso, respectivamente.

Com o objetivo de demonstrar o processo de escolha em cada parâmetro instrumental, observa-se na Figura 41.A que existiu uma variação positiva de  $I_{pc}$  até a velocidade de  $25 \text{ mV s}^{-1}$  e partir deste valor não houve aumento de corrente de pico. Considerando-se também somente a faixa em que há um grande aumento de  $I_{pc}$  ( $v > 15 \text{ mV s}^{-1}$ ), fica evidente que em  $25 \text{ mV s}^{-1}$  a menor largura de pico juntamente com a maior intensidade de  $I_{pc}$ . Esta velocidade de varredura foi então fixada para o restante das análises de SCP. Seguindo assim estes mesmo critérios, foram determinados os valores mais adequados para cada variável instrumental e estes foram listados na Tabela 10.

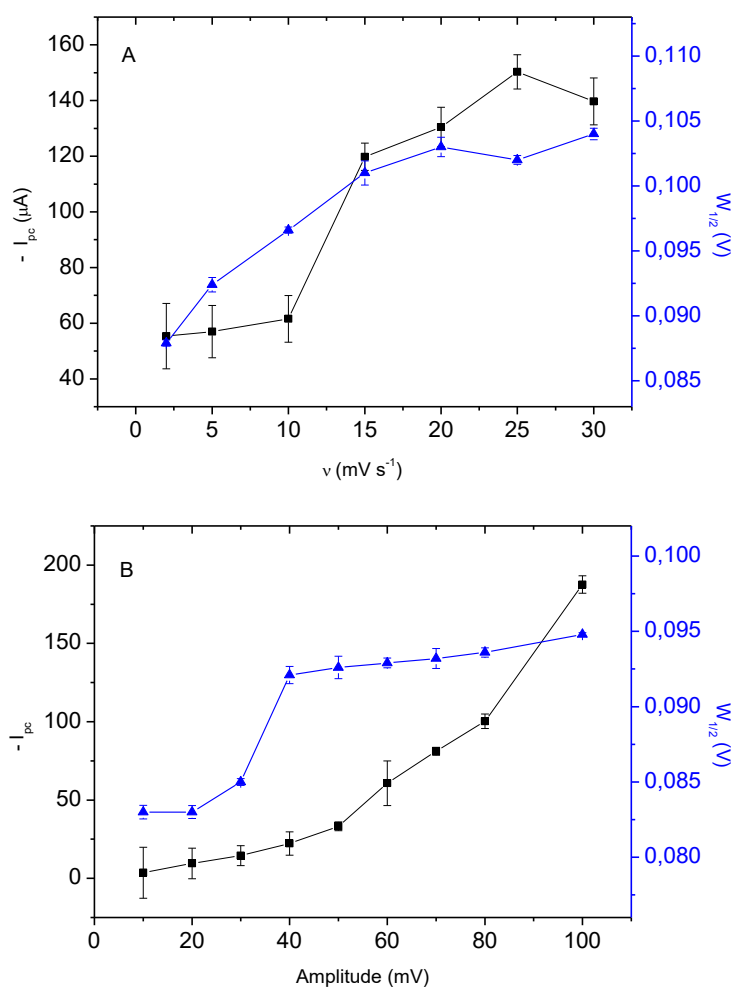


Figura 41. Variação de  $I_{pc}$  e largura de pico a meia altura ( $W_{1/2}$ ) em função de (A) velocidade de varredura, (B) amplitude de pulso e (C) tempo de pulso por DPV para solução de SCP  $50,00 \text{ mg L}^{-1}$ . Eletrólito de suporte:  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,300 \text{ mol L}^{-1}$ .

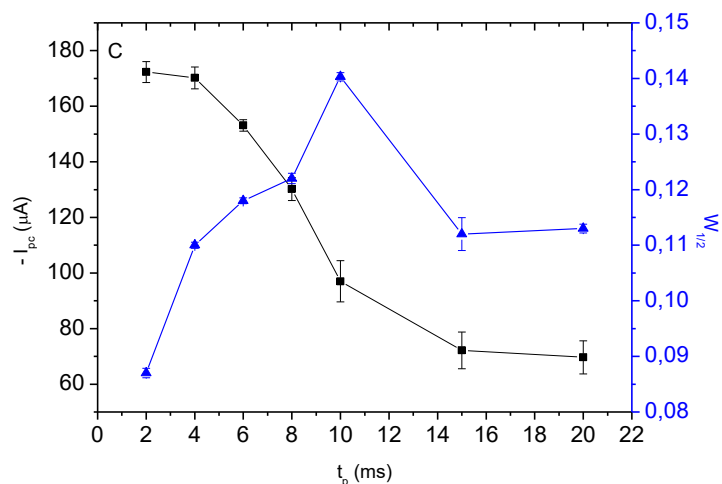


Figura 41. Variação de  $I_{pc}$  e largura de pico a meia altura ( $W_{1/2}$ ) em função de (A) velocidade de varredura, (B) amplitude de pulso e (C) tempo de pulso por DPV para solução de SCP 50,00 mg L<sup>-1</sup>. Eletrólito de suporte: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,300 mol L<sup>-1</sup>.

O mesmo procedimento e os mesmos critérios foram adotados para determinação das melhores condições de análise da SCP em SWV. As Figuras 42.A, 42.B e 42.C mostra os resultados obtidos para cada variável instrumental da técnica, frequência de varredura, amplitude de pulso e incremento de varredura, respectivamente.

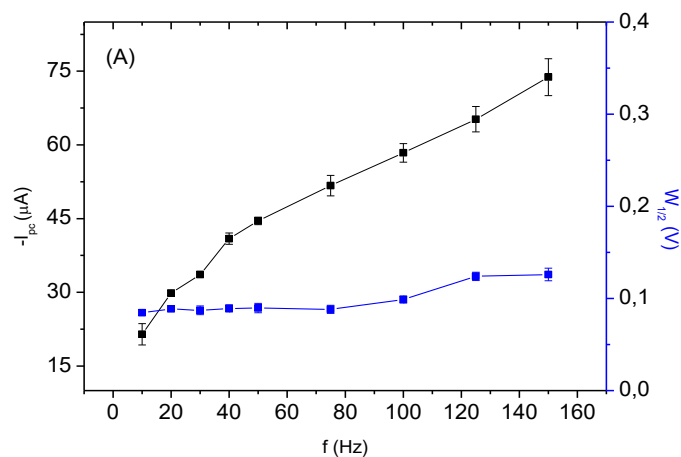


Figura 42. Variação de  $I_{pc}$  e largura de pico a meia altura ( $W_{1/2}$ ) em função de (A) frequência de varredura, (B) amplitude de pulso e (C) incremento de varredura ( $\Delta E$ ) por SWV para solução de SCP 50,00 mg L<sup>-1</sup>. Eletrólito de suporte: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,300 mol L<sup>-1</sup>.

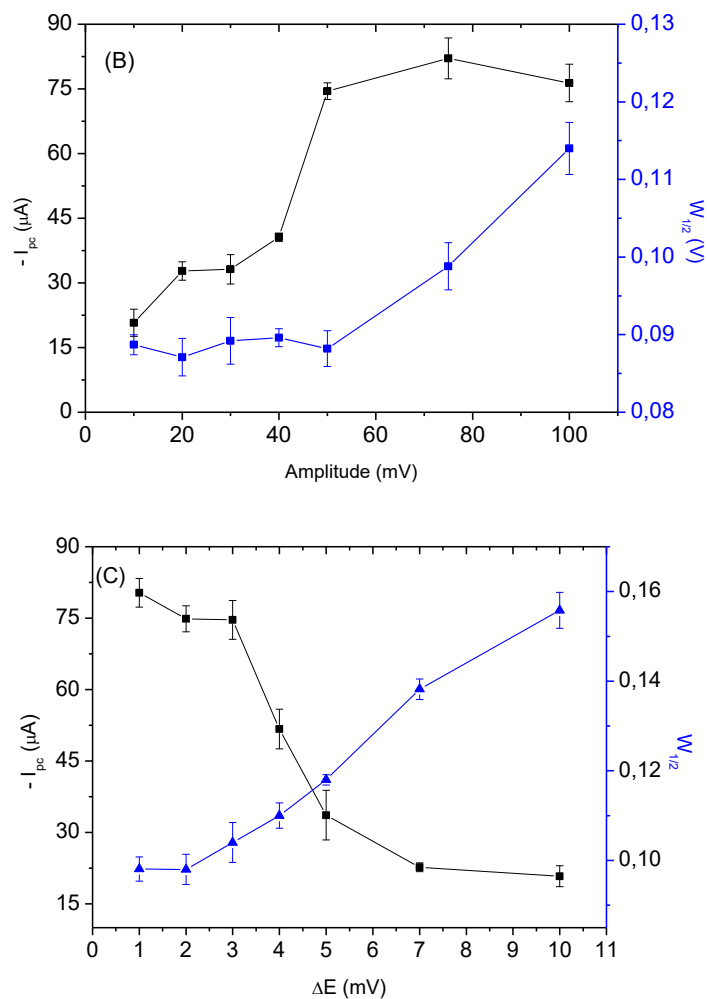


Figura 42. Variação de  $I_{pc}$  e largura de pico a meia altura ( $W_{1/2}$ ) em função de (A) frequência de varredura, (B) amplitude de pulso e (C) incremento de varredura ( $\Delta E$ ) por SWV para solução de SCP 50,00 mg L<sup>-1</sup>. Eletrólito de suporte: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,300 mol L<sup>-1</sup>.

A Tabela 10 apresenta os parâmetros avaliados, as faixas de variação analisadas e os valores em que se obtiveram os resultados mais satisfatórios. Além disso, são mostrados na Tabela 10 os valores de  $I_{pc}$  e  $E_{pc}$  obtidos para SCP 50,00 mg L<sup>-1</sup> sob as condições ideais em DPV e SWV, em que fica notável o resultado mais satisfatório em DPV tanto pelo aumento de  $I_{pc}$  quanto pela diminuição da energia gasta no processo de redução da SCP, caracterizada pelo  $E_{pc}$  localizado em um potencial menos negativo em relação à SWV.

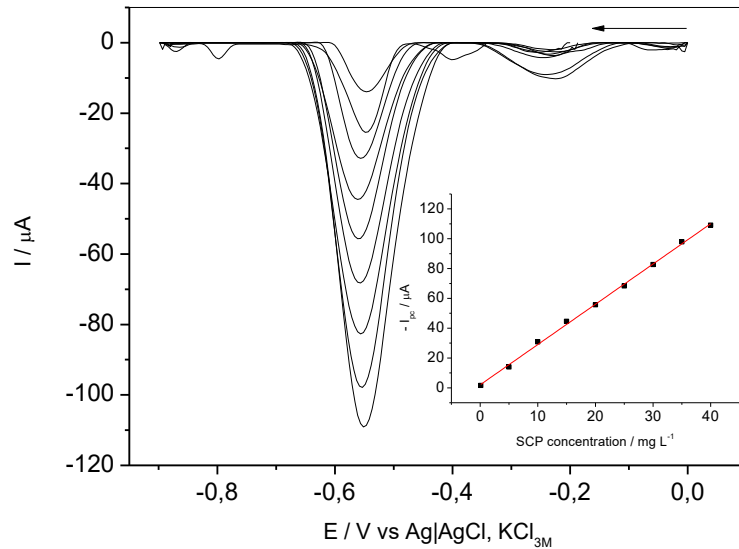
Tabela 10. Variáveis instrumentais das técnicas DPV e SWV para análise de SCP.

<b>DPV</b>		
Variável	Intervalo de análise	Valor definido
Velocidade de varredura	2 – 50 mV s <sup>-1</sup>	25 mV s <sup>-1</sup>
Amplitude de pulso	5 – 100 mV	100 mV
Tempo de pulso	2 – 20 ms	2 ms
SCP 50.00 mg L <sup>-1</sup> nas condições ideais (DPV)	I <sub>pc</sub> 261.0 μA	E <sub>pc</sub> - 0.535 V
<b>SWV</b>		
Variável	Intervalo de análise	Valor definido
Amplitude de pulso	10 – 100 mV	50 mV
Frequência de pulso	10 – 100 Hz	100 Hz
Incremento de potencial	1 – 10 mV	1 mV
SCP 50.00 mg L <sup>-1</sup> nas condições ideais (SWV)	I <sub>pc</sub> 82.4 μA	E <sub>pc</sub> - 0.612 V

### 3.8. Validação do método eletroanalítico para detecção de SCP

#### 3.8.1. Curvas Analíticas, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

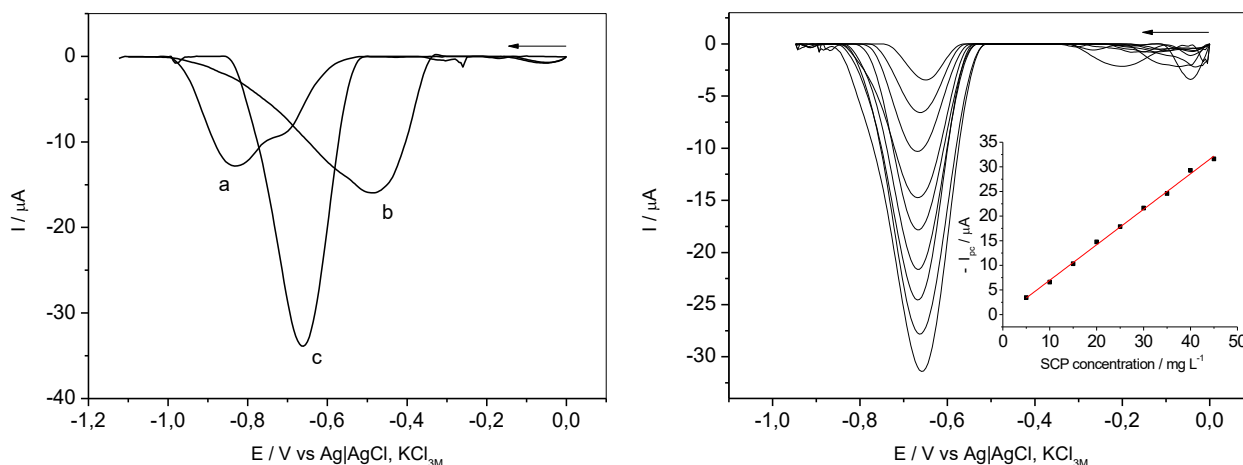
Aplicando-se o método em MCPE1 proposto neste trabalho, desenvolveu-se a análise de SCP em diferentes soluções de concentrações no intervalo de 0,1000 – 40,00 mg L<sup>-1</sup>, preparadas a partir da solução estoque do analito. A curva analítica foi construída a partir do ajuste linear da relação entre os valores de I<sub>pc</sub> em função da concentração de SCP. A Figura 43 mostra a curva analítica obtida cuja equação de ajuste é dada por I<sub>pa</sub> (μA) = - 2,04 + 2,70 C (mg L<sup>-1</sup>) e um coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) 0,998, já a inserção na mesma figura, apresenta os voltamogramas obtidos para cada concentração de SCP.



**Figura 43. Voltamogramas em DPV para as seguintes concentrações de SCP: (a) 0.500; (b) 5.00; (c) 10.00; (d) 15.00; (e) 20.00; (f) 25.00; (g) 30.00; (h) 35.00; (i) 40.00 mg L<sup>-1</sup>, em água (inserção: variação de I<sub>pc</sub> em função da concentração de SCP).**

A aplicação do método para análises em leite passou por testes iniciais nos quais foi verificada a influência do tipo de leite utilizado sobre a resposta voltamétrica da SCP. Para cada solução de análise 8,00 mL de leite foram adicionados a uma quantidade adequada de solução estoque de SCP, juntamente ao eletrólito de suporte (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,300 mol L<sup>-1</sup>) e metanol em uma proporção 10 % (% V/V) na solução final, Após a precipitação de proteínas devido ao meio de análise extremamente ácido, a solução foi desaerada por adição de N<sub>2(g)</sub> por 10 minutos e deixada em repouso por mais 5 minutos para decantação do precipitado. A Figura 44.A mostra a comparação entre voltamogramas obtidos para SCP 50,00 mg L<sup>-1</sup> em leite integral, desnatado e desnatado sem lactose. Pode-se observar melhores resultados para o leite desnatado sem lactose pela maior intensidade de I<sub>pc</sub> e definição de pico.

O procedimento para análise em matriz foi então aplicado na construção de uma curva analítica para determinação de SCP em leite desnatado sem lactose no intervalo de concentração de 5,00 – 45,00 mg L<sup>-1</sup>. A Figura 44.B apresenta os voltamogramas e a variação da intensidade de corrente para cada uma das concentrações de SCP em leite desnatado sem lactose.



**Figura 44. (A) Voltamogramas em DPV para SCP 50,00 mg L<sup>-1</sup> em soluções de (a) leite integral; (b) leite desnatado e (c) leite desnatado sem lactose. (B) Voltamogramas em DPV para SCP em leite desnatado sem lactose nas concentrações: (a) 5,00; (b) 10,00; (c) 15,00; (d) 20,00; (e) 25,00; (f) 30,00; (g) 35,00; (h) 40,00; (i) 45,00 mg L<sup>-1</sup>. (inserção: variação de  $I_{pc}$  em função da concentração de SCP.**

Na Tabela 11 encontram-se as equações de reta para as duas curvas analíticas, assim como os limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) calculados na ausência e na presença da matriz. Uma comparação entre as curvas analíticas obtidas para análise de SCP na ausência de matriz e em leite desnatado mostra um efeito de matriz, evidenciado pela diminuição da sensibilidade (inclinação) da curva analítica em leite quando comparada aos testes em água deionizada. A menor sensibilidade ocasionou a diminuição da faixa de trabalho, uma vez que as medidas de  $I_{pc}$  para valores de concentração abaixo de 5,00 mg L<sup>-1</sup> apresentaram um aumento acentuado de  $W_{1/2}$ , prejudicando a precisão das medidas. Os valores de LD e LQ para SCP foram calculados pelas Equações 2 e 3 [38], em que  $S_b$  é o desvio padrão absoluto da corrente elétrica medida exatamente no  $E_{pc}$  do analito em 12 varreduras realizadas no “branco” e  $b$  é a inclinação da curva analítica do SCP [39].

$$LD = \frac{3.S_b}{b} \quad (2) \qquad LQ = \frac{10.S_b}{b} \quad (3) \quad [38]$$

**Tabela 11. Regressão linear, LD e LQ para análises de SCP.**

Matriz	Equação de reta	R <sup>2</sup>	LD		LQ	
			mg L <sup>-1</sup>	μmol L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>	μmol L <sup>-1</sup>
Água	$I_{pc} / (\mu A) = 2,70 [C / (mg L^{-1})] - 2,04$	0,998	0,0253	$8,88 \cdot 10^{-2}$	0,0845	$2,97 \cdot 10^{-1}$
Leite	$I_{pc} / (\mu A) = 0,720 [C / (mg L^{-1})] - 0,223$	0,998	1,40	4,92	4,65	16,3

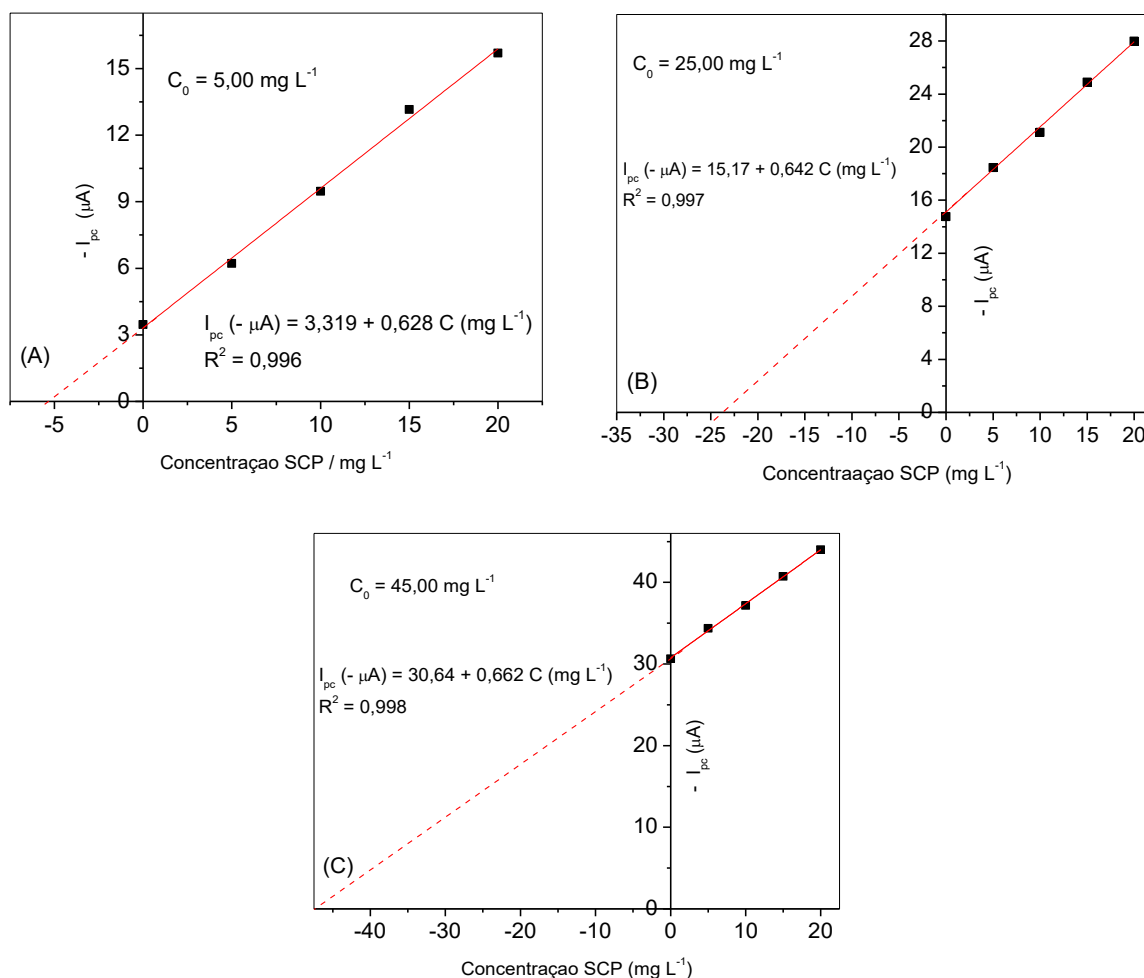
### 3.8.2. Precisão e exatidão do método para análise de SCP em leite hidrolisado

A validação do método proposto foi dada pela avaliação da exatidão pelo método de adição de padrão e a precisão foi determinada por análises de repetibilidade e precisão intermediária.

Análises por DPV realizadas em soluções das amostras de leite e eletrólito adicionado ( $H_2SO_4$   $0,300 \text{ mol L}^{-1}$ ) não apresentaram nenhum pico catódico característico da redução do SCP, indicando a ausência do antimicrobiano nas amostras de leite. Desta forma, foram aplicados ensaios de adição de padrão, método muito utilizado em amostras livres do analito para avaliar a exatidão do método desenvolvido. Estes ensaios simulam uma contaminação intencional da amostra e a partir de adições consecutivas do analito, verificar a exatidão percentual da concentração de SCP determinada pelo método em relação à concentração inicial do analito adicionada à célula.

Alíquotas da amostra de leite desnatado sem lactose foram intencionalmente contaminadas com diferentes concentrações de SCP coincidentes com três pontos ( $5,000$ ;  $25,00$  e  $45,00 \text{ mg L}^{-1}$ ), todos dentro da faixa de trabalho da curva analítica construída na presença da matriz. Em sequencia, foram adicionadas quatro alíquotas ( $50,00 \mu L$ ) de SCP  $5,000 \text{ mg L}^{-1}$  a cada solução e realizadas medidas de  $I_{pc}$  após cada adição de SCP. A partir dos valores de  $I_{pc}$  obtidos para cada uma das quatro adições de antibiótico, foi estimada a concentração da contaminação inicial por extrapolação da curva obtida da relação  $I_{pc}$  versus concentração de SCP. A taxa de exatidão foi determinada para cada contaminação pela relação percentual entre a concentração estimada e a concentração real de SCP adicionada à amostra.

As Figuras 45.A, 45.B e 45.C apresentam os gráficos e a regressões lineares obtidas para cada uma das soluções de SCP.



**Figura 45. Relações voltamétricas entre  $I_{pc}$  e concentração em leite hidrolisado sem lactose para fortificações de SCP em (A) 5,000  $\text{mg L}^{-1}$ ; (B) 25,00  $\text{mg L}^{-1}$  e (C) 45,00  $\text{mg L}^{-1}$ .**

A Tabela 12 mostra os valores de exatidão para cada um dos três níveis de concentração avaliados. A recuperação aparente variou entre 94,5 e 105,7%, que são valores aceitáveis (entre 70 e 120%) para aplicação do método em amostras de água ou alimentos [40]. Outros parâmetros de validação do método proposto, como repetibilidade (precisão intra-dia) e precisão intermediária (precisão inter-dia) foram avaliados, sendo estes valores determinados pelo cálculo do desvio padrão relativo (DPR) entre as repetições das medidas voltamétricas. A repetibilidade relaciona as medidas de uma mesma amostra em diferentes soluções ( $n=7$ ) preparadas no mesmo dia e a

precisão intermediária aplica-se para repetições entre soluções (n=5) preparadas em dias diferentes. O método desenvolvido apresentou (DPR) máximo de 5,71 % e 6,60 % para repetibilidade e precisão intermediária, respectivamente.

**Tabela 12. Resultados de recuperação aparente e precisão para análise de SCP em diferentes concentrações adicionadas em amostra de leite hidrolisado.**

[SCP] adicionada (mg L <sup>-1</sup> )	[SCP] obtida (mg L <sup>-1</sup> )	Exatidão (%)	DPR* precisão intra-dia (%)	DPR* precisão inter-dia (%)
5,000	5,285	105,7	4,20	5,98
25,00	23,63	94,5	5,71	4,22
45,00	46,28	102,8	4,77	6,60

DPR: Desvio Padrão Relativo

### 3.8.3. Análise de Interferentes

Foi avaliado o efeito da presença de possíveis compostos interferentes normalmente encontrados no leite. Neste ensaio foi verificada a influência da adição de lactose e cálcio sobre a resposta voltamétrica de uma solução de SCP. Desta forma foi determinada a variação de  $I_{pc}$  e  $E_{pc}$  do analito em contato com cada um dos interferentes individualmente em concentrações 10, 50 e 100 vezes acima da concentração de SCP.

Os resultados descritos na Tabela 13, mostram a influência da adição de lactose principalmente sobre  $I_{pc}$ , resultando em uma diminuição de cerca de 40 % em presença de lactose na concentração 100 vezes maior em relação a SCP 50,00 mg L<sup>-1</sup>, indicando uma interferência considerável deste composto na análise. Por outro lado, a adição de Ca<sup>2+</sup> ocasiona uma maior variação em  $E_{pc}$ , como visto na Tabela 13. Este resultado está relacionado à interação do Ca<sup>2+</sup> com os íons OH<sup>-</sup> em solução, alterando equilíbrios químicos existentes no sistema e conseqüentemente, diminuindo a acidez do sistema. Este deslocamento do  $E_{pc}$  para valores mais negativos após adição de Ca<sup>2+</sup> se encontra dentro das expectativas teóricas, uma vez que a posição do pico de

SCP é diretamente influenciada pela acidez da solução. Este ensaio permite elucidar melhor como se dá a influência de cada um destes compostos especificamente, a partir de variações relativamente discretas em suas concentrações.

Pode-se afirmar que a lactose oferece uma maior influência sobre a análise, uma vez que as concentrações avaliadas são muito mais baixas que a média encontrada deste composto em amostras de leite bovino. Considerando as características naturais de uma amostra de leite, a influência do cálcio sobre a resposta voltamétrica é menor visto que os valores médios de  $\text{Ca}^{2+}$  em leite são aproximadamente 25 vezes maior que a concentração de SCP utilizada neste ensaio. Sendo assim, o efeito do  $\text{Ca}^{2+}$  em análises de leite pode ser considerado menos acentuado para fins de sensibilidade do método em amostras de leite bovino.

**Tabela 13. Efeito de adição de lactose e cálcio sobre a resposta voltamétrica de SCP 50,00 mg L<sup>-1</sup> em MCPE 1.**

Concentração do interferente (g L <sup>-1</sup> )	SCP 50,00 mg L <sup>-1</sup>		Lactose		Cálcio	
	I <sub>pc</sub> (μA)	E <sub>pc</sub> (V)	I <sub>pc</sub> (μA)	E <sub>pc</sub> (V)	I <sub>pc</sub> (μA)	E <sub>pc</sub> (V)
0	- 245,1	- 0,551	- 245,1	- 0,551	- 245,1	- 0,551
0,5000	----	----	- 214,4	- 0,551	- 214,9	- 0,616
2,500	----	----	-177,3	- 0,550	-193,3	- 0,635
5,000	----	----	-144,9	- 0,559	- 188,8	- 0,662

#### 4. CONCLUSÕES

A utilização de um material compósito englobando as propriedades do grafite, MWCNTs e BMIMBF<sub>4</sub> na confecção do eletrodo de trabalho mostrou-se vantajosa em relação a um eletrodo de pasta de carbono não modificado tanto para detecção de SCP. A pasta desenvolvida, além do fácil preparo, permitiu a melhoria na transferência de massa do processo catódico envolvido, aliando ganho de intensidade de corrente de pico e diminuição da energia gasta em relação ao eletrodo não modificado. A elucidação do comportamento eletroquímico do SCP na superfície do eletrodo foi realizada utilizando-se as técnicas de CV e SWV. Durante a otimização das condições de análise foi observada a importante influência do tipo de substância utilizada como eletrólito de suporte, assim como a concentração deste eletrólito pode gerar um ganho na resposta voltamétrica para o composto estudado.

A metodologia eletroanalítica proposta foi validada por diferentes critérios de precisão e exatidão nas medidas, mostrando-se aplicável em uma ampla faixa de concentração para a SCP. A análise dos possíveis interferentes isoladamente, mostrou que a lactose presente no leite produz uma interferência significativa na intensidade de corrente de pico da SCP, capaz de reduzir a sensibilidade do método, enquanto a o cálcio produz um deslocamento de  $E_{pc}$  para valores mais negativos de potencial e produz pouco efeito sobre  $I_{pc}$ . O método demonstrou-se viável para detecção e quantificação do SCP em água e leite desnatado sem lactose, devido a sua sensibilidade, aliada à rapidez da análise, que dispensa etapas de extração do analito e ao baixo custo de implementação da técnica voltamétrica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Franco, D. A.; Webb, J.; Taylor, C. E. Antibiotic and Sulfonamide Residues in Meat: Implications for Human Health. **Journal of Food Protection**. v. 53, p.178-185, 1990.
2. Ferguson, J., Baxter, A., Young, P., Kennedy, G., Elliott, C., Weigel, S., Gatermann, R., Ashwind, H., Stead, S., Sharman, M. Detection of chloramphenicol and chloramphenicol glucuronide residues in poultry muscle, honey, prawn and milk using a surface plasmon resonance biosensor and Qflex® kit chloramphenicol. **Analytica Chimica Acta**. v. 529, p.109–113, 2005.
3. Fernandez, F.; Hegnerovab, K.; Piliarik, M.; Sanchez-Baezaa, F.; Homolab, J.; Marco, M. A label-free and portable multichannel surface plasmon resonance immunosensor for on site analysis of antibiotics in milk samples. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 26, p.1231–1238, 2010.
4. Van Coillie, E.F.; De Block, J.; Reybroek, W. Development of an Indirect Competitive ELISA for Flumequine Residues in Raw Milk Using Chicken Egg Yolk Antibodies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 52, p. 4975–4978, 2004.
5. Neubert, H. J. Government & Society: Measuring antibiotics in milk. **Analytical Chemistry**. v. 78, p. 7908–7908, 2006.
6. Long, A. R.; Hsieh, L. C.; Malbrough, M. S.; C. R. Short, S. A. Barker. Multiresidue method for the determination of sulfonamides in pork tissue. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 38, p. 423-426.
7. Littlefield, N. A.; Sheldon, W. G.; Allen, R.; Gaylor, D. W. Chronic toxicity/carcinogenicity studies of sulphamethazine in Fischer 344/N rats: Two-generation exposure. **Food and Chemical Toxicology**. v. 28, p. 157-167, 1990.
8. A.E. Cribb, M. Miller, A. Tespro, S.P. Spielberg. Peroxidase-Dependent Oxidation Of Sulfonamides By Monocytes And Neutrophils From Humans And Dogs. **Molecular Pharmacology**. V. 38, P. 744-752, 1990.
9. Neu, H.C. The crisis in antibiotic resistance. **Science**. V. 257, p. 1064-1073, 1992.

10. Yu, H.; Tao, Y.; Chen, D.; Wang, Y.; Huang, L.; Peng, D.; Dai, M.; Liu, Z.; Wang, X.; Yuan, Z.; Development of a high performance liquid chromatography method and a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method with the pressurized liquid extraction for the quantification and confirmation of sulfonamides in the foods of animal origin. **Journal of Chromatography. B.** v. 879, p. 2653–2662, 2011.
11. Cliquet, P.; Cox, E.; Haasnoot, W.; Schacht, E.; Goddeeris, B. M. Extraction procedure for sulfachloropyridazine in porcine tissues and detection in a sulfonamide-specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Analytica Chimica Acta.** v. 494, p. 21–28, 2003.
12. Koesukwiwat, U., Jayanta, S., & Leepipatpiboon, N. Solid-phase extraction for multiresidue determination of sulfonamides, tetracyclines, and pyrimethamine in bovine's milk. **Journal of Chromatography A.** v. 1149, p. 102–111, 2007.
13. Wen, Y., Zhang, M., Zhao, Q., & Feng, Y. Monitoring of five sulfonamide antibacterial residues in milk by in-tube solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** v. 53, p. 8468–8473, 2005.
14. Wen, Y., Li, J., Zhang, W., & Chen, L. Dispersive liquid–liquid microextraction coupled with capillary electrophoresis for simultaneous determination of sulfonamides with the aid of experimental design. **Electrophoresis.** v. 32, p. 2131–2138, 2011.
15. Yan, H., Wang, F., Wang, H., & Yang, G. Miniaturized molecularly imprinted matrix solid-phase dispersion coupled with high performance liquid chromatography for rapid determination of auxins in orange samples. **Journal of Chromatography A.** v. 1256, p. 1–8, 2012.
16. Hoff, R.; Kist, T. B. L. Analysis of sulfonamides by capillary electrophoresis. **Journal of Separation Science.** v. 32, p. 854–866, 2009.
17. Pérez-Fernández, V.; Domínguez-Vega, E.; Crego, A. L.; García, M. A.; Marina, M. L. Recent advances in the analysis of antibiotics by CE and CEC. **Electrophoresis.** V. 33, p. 127–146, 2011.
18. Chen, C.; Zang, X.; Long, Z.; Zheng, C.; Molecularly imprinted dispersive solid-phase microextraction for determination of

- sulfamethazine by capillary electrophoresis. **Microchimica Acta**. v. 178, p. 293–299, 2012.
19. Tong, F.; Zhang, Y.; Chen, F.; Li, Y.; Ma, G.; Chen, Y.; Liu, K.; Dong, J.; Ye, J.; Chu, Q. Hollow-fiber liquid-phase microextraction combined with capillary electrophoresis for trace analysis of sulfonamide compounds. **Journal of Chromatography B**. v. 942–943 p. 134–140, 2009.
20. Chu, Q.; Zhang, D.; Wang, J.; Ye, J.; Multi-residue analysis of sulfonamides in animal tissues by capillary zone electrophoresis with electrochemical detection. **Science of Food and Agriculture**. v. 89, p. 2498–2504, 2009.
21. Font, G., Juan-Garcia, A., Pico, Y. Pressurized liquid extraction combined with capillary electrophoresis–mass spectrometry as an improved methodology for the determination of sulfonamide residues in meat. **Journal of Chromatography A**. v. 1159, p. 233 – 241, 2007.
22. Raich-Montiu, J.; Beltrán, J. L.; Prat, M. D.; Granados, M.; Studies on the extraction of sulfonamides from agricultural soils. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v. 397, p. 807–814, 2010.
23. Dmitrienko, S. G.; Kochuk, E. V.; Tolmacheva, V.V.; Apyari, V. V.; Zolotov, Y. A. Comparison of adsorbents for the preconcentration of sulfanilamides from aqueous solutions prior to HPLC determination. **Journal of Analytical Chemistry**. v. 68, p. 871–879, 2013.
24. Kochuk, E. V.; Dmitrienko, S. G.; Sorption of sulfanilamides on highly cross-linked polystyrene. **Russian Journal of Physical Chemistry A**. v. 85, p. 89–93, 2011.
25. Hongyuan Y.; Ning S., Shijia L., Kyung H. R., Yanxue S. Miniaturized graphene-based pipette tip extraction coupled with liquid chromatography for the determination of sulfonamide residues in bovine milk. **Food Chemistry**. v. 158, p. 239–244, 2014.
26. Veronika V. Tolmacheva, Vladimir V. Apyari, Aleksei A. Furletov, Stanislava G. Dmitrienko, Yury A. Zolotov. Facile synthesis of magnetic hypercrosslinked polystyrene and its application in the magnetic solid-phase extraction of sulfonamides from water and milk samples before their HPLC determination. **Talanta**. V. 152, p. 203–210, 2016.

27. Rodríguez, N.; Ortiz, M. C.; Sarabia, L. A.; Herrero, A. A multivariate multianalyte screening method for sulfonamides in milk based on front-face fluorescence spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**. v. 657, p.136–146, 2010.
28. Vieira, A. P.; Rath, S.; Fostier, A. H. Sorption of Sulfachloropyridazine in Brazilian Soils. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. V. 28, p. 158-167, 2017.
29. Aleixo, H., Okumura, L. L., Silva, A. S. F., Gurgel, A., Diniz, J. A. Adsorptive Stripping Voltammetric Determination of Oxolinic Acid in Water Sample. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 29, p. 1417-1426, 2018.
30. Bard, A. J.; Faulkner, L. R. **Electrochemical Methods: Fundamentals And Applications**, JOHN WILEY & SONS, New York, 2001.
31. BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O. **Electrochemistry: Principles, Methods and Applications**. New York: Oxford University Press, 1993.
32. NICHOLSON, R. S.; SHAIN, I. Theory of Stationary Electrode Polarography. Single Scan and Cyclic Methods Applied to Reversible, Irreversible, and Kinetic Systems. **Analytical Chemistry**, v. 36, p. 706-723, 1964.
33. Lovric, M.; Komorsky-Lovric, S.; Murray, R. W. Adsorption effects in square-wave voltammetry of totally irreversible redox reactions **Electrochimica Acta**. v. 33, p. 739-744, 1988.
34. Lovric, M.; Komorsky-Lovric, S. Square-wave voltammetry of an adsorbed reactant. **Journal of Electroanalytical Chemistry**. v. 248 p. 239-253.
35. Cabral, M. F.; De Souza, D.; Alves, C. R.; Machado, S. A. S. Estudo do comportamento eletroquímico do herbicida ametrina utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada. **Eclética Química**, São Paulo, v. 28, p. 41-47, 2003.
36. Cotrell, P.T.; Mann. C.K. Electrochemical reduction of arylsulfonamides. **Journal of the American Chemical Society**. v. 93, p. 3579-3583, 1971.
37. Oda, K.; Ohnuma, T.; Ban, Y. *Journal of Organic Chemistry*, 49, **1984**, 953-959.

38. International Union of Pure Applied Chemistry (IUPAC); **Spectrochimica Acta**. v. 33, p. 241, 1978.
39. Ribani, M.; Botolli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C.; Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.
40. M.A.P.A. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Manual de Garantia da Qualidade Analítica**. Brasília, pp. 40, 2011.

## CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS FUTURAS

A combinação de diferentes tipos de líquido iônico, juntamente a outros compostos como nanomateriais ou óxidos metálicos pode ser aprimorada na forma de novos compósitos para eletrodos modificados a fim de aumentar a sensibilidade e a seletividade do método voltamétrico. Líquidos iônicos com menor solubilidade em meio aquoso (hidrofóbicos) podem ser uma grande alternativa na composição de eletrodos de pasta, além da proposição de tratamentos químicos para alteração de grupos superficiais em nanotubos de carbono são algumas das ferramentas que podem ser utilizadas pelo grupo em análises de novos compostos ou no aprimoramento de metodologias já existentes.

Além do ácido oxolínico e sulfacloropiridazina avaliados neste trabalho, seria de interesse ainda avaliar a aplicação de métodos voltamétricos para outros antimicrobianos como a flumequina (FMQ), a qual já foi avaliada em ensaios no Grupo de Eletroanalítica Aplicada (GEAP), entretanto ainda sem resultados satisfatórios para sua detecção.