

**MATEUS SCONTRI**

**SENSORES ELETROQUÍMICOS À BASE DE NANOMATERIAIS  
CARBONÁCEOS E CATALISADORES BIOMIMÉTICOS PARA  
DETERMINAÇÃO DE TETRACICLINA EM DIVERSOS TIPOS DE  
AMOSTRAS**

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Química, Universidade Estadual Paulista,  
como parte dos requisitos para obtenção do  
título de Mestrado em Química.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dra Maria Del Pilar T. Sotomayor

**Co-orientador:** Dr Ademar Wong

**Araraquara**

**2015**

## CURRICULUM VITAE

### DADOS PESSOAIS

**Nome:** Mateus Scontri

**Naturalidade:** Capivari/SP

**Nacionalidade:** Brasileira

### FORMAÇÃO ACADÊMICA

#### Graduação

Licenciatura em Química – Instituto de Química da UNESP - Araraquara.

Período: 02/2005 a 12/2010.

#### Pós-Graduação

-*Mestrado em Química*, realizado no Departamento de Química Analítica do Instituto de Química (UNESP), tendo como orientadora Prof<sup>a</sup> Dra Maria D.P.T. Sotomayor e co-orientador Dr. Ademar Wong.

Título do Projeto: “**Sensores eletroquímicos à base de nanomateriais carbonáceos e catalisadores biomiméticos para determinação de tetraciclina em diversos tipos de amostras**”

Período: 08/2012 a 04/2015.

### TRABALHOS CIENTIFICOS

✓ Artigo submetido para o periódico *Sensors and Actuators B* com título: “Differential pulse voltammetry determination of tetracycline using carbon paste electrode modified with multi-walled carbon nanotubes and graphene oxide”.

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meus pais Dailton e Antonia por todo apoio, carinho e confiança que depositaram em mim para atingir meus objetivos.

A minha esposa Clara pelo momentos de paciência, companheirismo e por toda ajuda para me manter firme para continuar realizando este trabalho.

Aos meus irmão Tite e Adriana, por sempre estarem presentes nas minha vida, principalmente me inspirando a estudar.

## AGRADECIMENTOS

*A minha orientadora Maria D. P. T. Sotomayor por dar a oportunidade de trabalhar e desenvolver este projeto.*

*Ao meu co-orientador Ademar Wong pela ajuda, dedicação e paciência para me mostrar os caminhos de um trabalho bem realizado.*

*A profa. Paula pela confiança e ajuda no início deste trabalho.*

*Aos meus superiores imediatos Adélia, Chung, Jean e Márcia (em memória) por me incentivar e apoiar tornando viável a realização deste trabalho bem como todos do LAPDESF que estão sempre presentes no dia a dia.*

*Aos amigos Escobar, Caio, Dudu, André, Ricardo, enfim, todos os que sempre estão ao meu lado a cada dia.*

*Ao grupo de Eletroanalítica na qual convivi vários anos e fiz bons amigos.*

*Ao pessoal da pós-graduação e aos funcionários da biblioteca pela ajuda prestada com atenção, carinho e muito profissionalismo.*

*Ao Instituto de Química.*

## RESUMO

Este trabalho descreve a preparação e viabilidade de sensores eletroquímicos à base de nanomateriais carbonáceos e catalisadores biomiméticos da enzima P450, visando à obtenção de sensores sensíveis e seletivos para determinação de tetraciclina. Para tal, inicialmente foram construídos sensores eletroquímicos usando pasta de carbono modificada com 10% (m/m) de MWCNT-COOH (nanotubos de carbono de paredes múltiplas funcionalizados com grupos carboxila) e 10% (m/m) de óxido de grafeno (GO). A Voltametria de pulso diferencial adsortiva com varredura anódica (VPDadVA) permitiu obter melhores resultados em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0); potencial e tempo de acumulação de 0,2 V e 30 s, respectivamente. Sob estas condições o sensor apresentou uma faixa linear de resposta entre 1,2 x 10<sup>-5</sup> e 1,7 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>, sensibilidade de 1,2 x 10<sup>4</sup> (±1,0x10<sup>3</sup>) µA mol L<sup>-1</sup> e limite de detecção de 3,6 x 10<sup>-8</sup> mol L<sup>-1</sup>. Este sensor foi aplicado na determinação de tetraciclina em urina sintética, águas de rio e medicamentos, obtendo-se recuperações com valores próximos a 100% e valores de repetibilidade em termos do desvio padrão relativo (DPR) abaixo de 6%.

Na segunda etapa do trabalho, visando à obtenção de um sensor biomimético, além dos materiais nanoparticulados, as pastas de carbono foram individualmente modificadas, com 11 compostos organometálicos que mimetizam o sítio ativo da enzima P450. Dentre eles, apenas a bispiridilftalocianinaferro (II), cloreto de 5,10,15,20-tetrafenil-21*H*,23*H*-porfirinaferro (III) e 1,2,3,4,8,9,10,11,15,16,17,18,22,23,24,25-hexadecafluoro-29*H*,31*H*-ftalocianinacobalto (II) apresentaram resposta promissora usando voltametria cíclica. Entretanto, quando realizados experimentos de quantificação através de VPDadVA nas condições otimizadas,

nenhum dos sensores mostrou respostas satisfatórias, apesar dos esforços realizados para conseguir a quantificação da tetraciclina. Mostrando que neste caso, os compostos avaliados não melhoraram a resposta do sensor previamente obtida usando as nanopartículas. Embora este resultado não tenha sido o esperado, permite registrar que no caso da tetraciclina, nenhum dos 11 complexos avaliados é adequado para promover a catálise eletroquímica deste fármaco.

*Palavras Chaves: Tetraciclina, nanomateriais, catalisadores biomiméticos, sensores eletroquímicos.*

## ABSTRACT

This work describes the preparation and feasibility of electrochemical sensors based on carbonaceous nanomaterials and biomimetic catalysts of the P450 enzyme, in order to obtain sensitive and selective sensors for determination of tetracycline. For this, electrochemical sensors were initially constructed using carbon paste modified with 10% (w/w) of MWCNTCOOH (carbon nanotubes multi-walled functionalized with carboxyl groups) and 10% (w/w) of graphene oxide (GO). Differential pulse with adsorptive anodic stripping voltammetry (DPadSAV) provided the best results in phosphate buffer 0.1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7.0) and accumulation potential and time of 0,2 V and 30 s, respectively. Under these conditions the sensor showed a linear response range between 1.2 x 10<sup>-5</sup> and 1.7 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>, sensitivity of 1.2 x 10<sup>4</sup> (± 1,0 x 10<sup>3</sup>) μA mol L<sup>-1</sup> and detection limit of 3.6 x 10<sup>-8</sup> mol L<sup>-1</sup>. This sensor has been applied to the determination of tetracycline in synthetic urine, river water and pharmaceutical formulations with recovery values close to 100% and repeatability in terms of relative standard deviation (RSD) below 6%.

In the second stage of the work in order to obtain a biomimetic sensor, in addition to the nanoparticulate materials, carbon pastes were individually modified, with 11 organometallic compounds that mimic the active site of P450 enzyme. Among them, only *bis(pyridil)phthalocyanine iron (II)*; 5,10,15,20-tetraphenyl-21*H*, 23*H*-porphyrin iron (III) chloride and 1,2,3,4,8,9,10,11,15,16,17,18,22,23,24,25-hexadecafluoro-29*H*,31*H*-phthalocyanine cobalt (II) showed promising response using cyclic voltammetry. However, when performed experiments by VPD and DPadSAV in optimized conditions, none of the sensors showed satisfactory responses, despite the efforts made to achieve the quantification of tetracycline.

Showing that in this case, the these compounds did not improve the sensor response previously obtained using the nanoparticles. Although this result was not expected, allows you to register in the case of tetracycline, none of the 11 evaluated complex is suitable to promote the electrochemical catalysis of this drug.

Keywords: *Tetracycline, nanomaterials, biomimetic catalysts, electrochemical sensors.*



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Estrutura química das tetraciclinas ..... 4
- Figura 2: Número de trabalhos científicos sobre sensores eletroquímicos publicados entre janeiro de 2000 e dezembro de 2014 coletados da base de dados do SciFinder® ..... 7
- Figura 3: Estrutura do sítio ativo da P450, a ferro protoporfirina (IX) (a) e dos complexos 1, 2, 3, 4, 8, 9, 10, 11, 15, 16, 17, 18, 22, 23, 24, 25 – Hexadecafluoro-29H-31H-ftalocianina cobalto (II) (b) e *Bis*(piridil)ftalocianina ferro (II) (c). ..... 15
- Figura 4: Construção do eletrodo de pasta de carbono. (A) Pasta de carbono modificada. (B) Eletrodo adequado para montagem do sensor. .... 22
- Figura 5: Microscopias eletrônicas de varredura dos materiais carbonáceos usados neste trabalho (A) Grafite, (B) MWCNT-COOH. Medidas realizadas em um microscópio eletrônico de varredura modelo JEOL JSM 7500F ..... 26
- Figura 6: Espectros de absorção no infravermelho de nanotubos sem funcionalizar (SIGMA) e de nanotubos funcionalizados tal como descrito na parte experimental (MWCNT-COOH) (B). Medidas realizadas em um espectrofotômetro de infra- vermelho por transformada de Fourier Shimadzu IR Prestige-21 ..... 27
- Figura 7: Micrografia eletrônica de varredura do óxido de grafeno (A) e do grafite Nanotubo funcionalizado e grafeno (B) usados neste trabalho. Imagens obtidas em microscópio eletrônico de varredura modelo JEOL JSM 7500F.. ..... 28
- Figura 8: Espectros FTIR para o grafeno, tal como adquirido e o grafeno funcionalizado (GO). Medidas realizadas em um espectrofotômetro de infra vermelho por transformada de Fourier Shimadzu IR Prestige-21... 29

- Figura 9: Voltamogramas cíclicos para sensor à base de pasta de carbono, EPC (A), MWCNT/EPC (B), e MWCNT-COOH-GO/EPC (C) na presença de tetraciclina na concentração de  $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Eletrólito: Tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,0),  $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$ . ..... 30
- Figura 10: Variação da corrente de pico anódica com a velocidade e varredura. Condições de análise: [Tetraciclina] =  $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , Eletrólito: Tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,0). ..... 32
- Figura 11: Gráfico da  $\Delta i_{pa}$  vs  $v^{1/2}$  obtido apartir dos dados da Figura 10. .... 33
- Figura 12: Gráfico da  $\Delta i_{pa}$  vs  $v$  obtido apartir dos dados da Figura 10. .... 34
- Figura 13: Gráfico da  $v$  para o eletrodo de pasta de carbono modificado com MWCNT-COOH e GO. Medidas realizadas em KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  na presença de  $4,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ . ..... 35
- Figura 14: Estudo realizado para otimização do pH do eletrólito suporte. As medidas foram realizadas por VPDadVA nas condições de análise: degrau de potencial: 4 mV, amplitude de modulação: 75 mV, tempo de modulação: 10 ms, potencial de acumulação: 0,2 V, tempo de acumulação: 30 s em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Barra de erro correspondente a triplicatas.... 37
- Figura 15: Estudo realizado para otimização do eletrólito suporte. As medidas foram realizadas por VPDadVA, nas condições de análise: degrau de potencial: 4 mV, amplitude de modulação: 75 mV, tempo de modulação: 10 ms, potencial de acumulação: 0,2 V, tempo de acumulação: 30 s. Barra de erro correspondente a triplicatas ..... 38
- Figura 16: Estudo realizado para otimização da concentração do tampão fostato em pH 7,0. As medidas foram realizadas por VPDadVA nas condições de análise: degrau de potencial: 4 mV, amplitude de modulação: 75 mV,

tempo de modulação: 10 ms, potencial de acumulação: 0,2 V, tempo de acumulação: 30 s. Barra de erro correspondente a triplicatas..... 39

Figura 17: Estudo realizado para otimização da quantidade de MWCNT-COOH na pasta. Medidas realizadas por VPDadVA nas condições de análise: degrau de potencial: 4 mV, amplitude de modulação: 75 mV, tempo de modulação: 10 ms, potencial de acumulação: 0,2 V em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> ..... 40

Figura 18: Estudo realizado para otimização da quantidade de MWCNT\* na pasta. Medidas realizadas por VPDadVA nas condições de análise: degrau de potencial: 4 mV, amplitude de modulação: 75 mV, tempo de modulação: 0,5 s, potencial de acumulação: 0,2 V em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> ..... 41

Figura 19: Perfil voltamétrico em VPDadVA do sensor nas condições de análise otimizadas. Condições eletroquímicas: Degrau de potencial 4 mV; amplitude de modulação 75 mV; tempo de modulação: 0,5 s potencial de acumulação 0,2 V; tempo de acumulação 30 em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> ..... 42

Figura 20: Curva analítica obtida a partir dos dados da Figura 20. Barra de erros correspondente a triplicatas..... 43

Figura 21: Perfil do sensor em VOQadVAnas condições de análise a seguir: Ap = 100 mV, Edep = 0,2 V, tempo de deposição = 120 s, frequência = 15 Hz, Estep = 6 mV, em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> e pH 7,0. a) 2,10 x 10<sup>-5</sup> (b) 4,89 x 10<sup>-5</sup> (c) 7,27 x 10<sup>-5</sup> (d) 9,60 x 10<sup>-5</sup> (e) 1,19 x 10<sup>-4</sup> (f) 1,41 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> .....44

- Figura 22: Curva analítica obtida a partir dos dados da Figura 21. Barra de erros correspondente a triplicatas..... 44
- Figura 23: Estudo de seletividade do sensor na presença de diversos fármacos diferentes da tetraciclina. Condições de análise: degrau de potencial 4 mV; amplitude de modulação 75 mV; tempo de modulação: 0,5 ms; potencial de acumulação 0,2 V; tempo de acumulação 30 s em solução tampão fosfato 1,0 mol L<sup>-1</sup> e [fármacos] = 1,5x10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>..... 46
- Figura 24: Perfil de resposta do sensor na presença de tetraciclina e seus possíveis interferentes. Condições de análise: degrau de potencial 4 mV; amplitude de modulação 75 mV; tempo de modulação: 0,5 s; potencial de acumulação 0,2 V; tempo de acumulação 30 s. .... 48
- Figura 25: Curva de adição de padrão obtida por VPDadVA para o sensor proposto nas condições de análise otimizadas (degrau de potencial: 4 mV, amplitude de modulação: 75 mV, tempo de modulação: 0,5 ms, potencial de acumulação: 0,2 V, tempo de acumulação: 30 s, tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> e pH 7,0. No gráfico inserido são mostrados os voltamogramas correspondentes às diferentes adições de amostra e padrões, onde (a) 8,0 x 10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> (b) 1,24 x 10<sup>-5</sup>; (c) 2,47 x 10<sup>-5</sup>; (d) 4,89 x 10<sup>-5</sup>; (e) 7,27 x 10<sup>-5</sup>; (f) 9,60 x 10<sup>-5</sup>; (g) 1,19 x 10<sup>-4</sup>; (h) 1,49 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> (j) 1,7 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>) ..... 50
- Figura 26: Cromatogramas dos padrões de tetraciclina e sua correspondente curva analítica usada nesta análise. As medidas foram realizadas usando coluna C8 (partícula 5 µm; 4,6 x 250 mm), fase móvel: Ácido Oxálico 0,1 mol L<sup>-1</sup>: metanol : acetonitrila (68:20:12, v/v/v), fluxo 0,8 mL min<sup>-1</sup> e λ = 365 nm..... 52

- Figura 27: Voltamograma cíclico do sensor à base de pasta de carbono modificada com o complexo hexadecafluoro-29H-31H-ftalocianinacobalto (II). Medidas realizadas em (1) solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0),  $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$  e (2) [Tetraciclina] =  $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . .....56
- Figura 28: Voltamograma cíclico do complexo cloreto de 5,10,15,20-tetrafenil-21H,23H-porfirinaferro (III). Medidas realizadas em (1) solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0),  $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$  e (2) [Tetraciclina] =  $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . ..... 57
- Figura 29: Voltamograma cíclico do complexo bispiridilftalocianinaferro (II). Medidas realizadas em (1) solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0),  $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$  e em (2) [Tetraciclina] =  $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . ..... 58
- Figura 30: Voltamograma cíclico obtido com o sensor EPC. Eletrólito: Tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0),  $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$  e [Tetraciclina] =  $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . ..... 59

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Aplicações para uso de materiais carbonáceos com os respectivos modificadores. ....	9
Tabela 2: Complexos organometálicos utilizados como modificadores biomiméticos. ....	22
Tabela 3: Valores otimizados dos parâmetros de análise por VPDadVA. ....	41
Tabela 4: Comparação do sensor proposto com outros sensores reportados na literatura.....	45
Tabela 5: Resultados obtidos na análise de formulações farmacêuticas através do sensor eletroquímico frente à CLAE. ....	49
Tabela 6: Resultados obtidos nas amostras de rios usando o sensor eletroquímico frente a CLAE-UV/vis.....	51
Tabela 7: Resultados obtidos na amostra de urina sintética através do sensor eletroquímico frente à CLAE.....	53
Tabela 8: Complexos organometálicos utilizados como reconhecidos modificadores biomiméticos.....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS

CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência

TRIS - Tris(hidroxi-metil)aminometano

Hepes - 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid

Pipes - 1,4-Piperazinediethanesulfonic acid sodium salt

TC – cloridrato de tetraciclina

VC – Voltametria cíclica

VOQ – Voltametria de onda quadrada

VOQadVA – Voltametria de onda quadrada adsortiva com varredura anódica

VPD – Voltametria de pulso diferencial

VPDadVA – Voltametria de pulso diferencial adsortiva com varredura anódica

MWCNT - Nanotubos de carbono de parede múltipla

MWCNT-COOH - Nanotubos de carbono de parede múltipla funcionalizado

NTC – Nanotubo de carbono

GO – Óxido de grafeno

FTIR – Transformada de fourier

SD - Desvio padrão

m - sensibilidade

DPR – Desvio padrão relativo

$\upsilon$  - velocidade de varredura

EPC – eletrodo de pasta de carbono

## LISTA DE SÍMBOLOS

$i$  - corrente elétrica

$V$  - Volts

$v$  - velocidade de varredura

$\mu$  - micro

$A$  – ampères

$t$  – tempo

$\Delta E$  – Variação de potencial

$\tau$  - Largura de pulso

$\Delta i$  – variação de corrente

$s$  - segundo



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Antibióticos</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Antibióticos como promotores de crescimento .....	2
1.1.2 Riscos ambientais e resistência a fármacos .....	2
1.1.3 Tetraciclina.....	3
1.1.3.1 Métodos de determinação de tetraciclina .....	5
<b>1.2 Sensores eletroquímicos</b> .....	<b>6</b>
1.2.1 Eletrodos quimicamente modificados (EQM).....	8
1.2.2 Modificação da superfície do eletrodo.....	9
1.2.3 Desenvolvimento de sensores eletroquímicos a base de pasta de carbono.....	10
1.2.3.1 Nanotubos de carbono de (NC).....	10
1.2.3.2 Óxido de grafeno (GO).....	11
<b>1.3 Sistemas bio-inspirados</b> .....	<b>12</b>
<b>1.4 Sensores biomiméticos</b> .....	<b>14</b>
1.4.1 Enzimas P450.....	14
<b>2 OBJETIVO</b> .....	<b>17</b>
<b>3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>19</b>
<b>3.1 Reagentes e Soluções</b> .....	<b>19</b>
<b>3.2 Medidas Eletroquímicas</b> .....	<b>19</b>
<b>3.3 Construção dos sensores eletroquímicos</b> .....	<b>20</b>
3.3.1 Funcionalização de nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNT-COOH) .....	20
3.3.2 Funcionalização do grafeno (GO) .....	20
3.3.3 Preparação do eletrodo de pasta de carbono modificada com MWCNT-COOH e GO.....	21
3.3.4 Preparação do sensor biomimético .....	21

3.4	Análise de amostras de formulações farmacêuticas .....	23
3.5	Análise de amostras ambientais e de urina artificial .....	24
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	26
4.1	Desenvolvimento de sensor eletroquímico modificado com MWCNT-COOH e óxido de grafeno (GO) para detecção de tetraciclina.....	26
4.1.1	Caracterização dos materiais nanoparticulados .....	26
4.1.2	Caracterização eletroquímica do sensor à base de nanopartículas carbonáceas.....	29
4.1.2.1	Determinação da área eletroativa do sensor.....	34
4.1.3	Otimização da resposta do sensor proposto .....	36
4.1.4	Quantificação de tetraciclina por voltametria de pulso diferencial e voltametria de onda quadrada.....	42
4.1.5	Estudo de seletividade .....	46
4.1.6	Estudos das possíveis interferências.....	47
4.1.7	Aplicação do sensor na análise de amostras farmacêuticas .....	49
4.1.8	Aplicação do sensor em águas de rios.....	51
4.1.9	Aplicação do sensor em urina artificial .....	53
4.1.10	Considerações parciais.....	54
4.2	Sensores à base de materiais nanoparticulados e complexos organometálicos biomiméticos.....	54
4.2.1	Considerações parciais.....	60
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	62
6	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	64
	REFERÊNCIAS	
	ANEXOS	

# CAPÍTULO I

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Antibióticos

Desde as últimas décadas intensificou-se o combate das infecções bacterianas tornando o tratamento médico mais eficaz, resultando numa redução significativa da mortalidade causada por doenças microbianas. Entretanto com uso indiscriminado de antibióticos proporcionou o surgimento de cepas resistentes, o que levou a uma certa limitação às opções de tratamentos das infecções (SILVEIRA *et al.*, 2006).

Os antibióticos podem ser classificados em bactericidas e bacteriostáticos, dependendo se o fármaco causa diretamente a morte das bactérias ou se apenas inibe sua replicação, respectivamente. A classificação se baseia no comportamento do antibiótico *in vitro* e ambas as classes podem ser eficazes no tratamento de uma infecção. Dentre eles temos amoxicilina, bacitracina, sulfanilamida, cloranfenicol, rifampicina, clindamicina, ciprofloxacina, tetraciclina entre outros.

Também podem ser classificados como sendo de origem natural e seus derivados semi-sintéticos,  $\beta$ -lactâmicos, tetraciclinas, aminoglicosídeos, macrolídeos, peptídeos cíclicos esteptograminas; ou de origem sintética como as sulfonamidas, fluoroquinolonas e oxazolidinonas (GUIMARÃES, MOMESSO, PUPO, 2010).

Todo antibiótico ideal deve apresentar algumas características como ação antibacteriana seletiva e potente para agir em uma ampla série de microorganismos; exercer sua atividade antibacteriana em presença dos líquidos do organismo e não ser destruído por enzimas teciduais; não perturbar as defesas do organismo; não produzir efeitos colaterais graves nem sensibilização alérgica; não provocar resistência dos microorganismos sensíveis. Desse modo é indispensável que a

absorção, distribuição, destino e excreção devem ser altamente eficientes (CALIXTO, 2012).

### **1.1.1 Antibióticos como promotores de crescimento**

O uso de antibióticos como promotores de crescimento ocorre em doses subterapêuticas, aumentando também a produção em vacas leiteiras e aves de postura bem como o número de filhotes em suínos. Seu mecanismo de ação está relacionado a modificações na flora intestinal de modo a diminuir as bactérias sensíveis ao antibiótico administrado, causando também a diminuição dos gastos energéticos com a fermentação microbiana e direcionando essa energia para o crescimento, atenuando a produção de toxinas pelas bactérias a partir de aminoácidos, de modo a liberá-los para o desenvolvimento do animal bem como diminuindo a espessura da parede intestinal, garantindo maior absorção de nutrientes como vitaminas, minerais, aminoácidos e monossacarídeos (GOMES, 2004).

### **1.1.2 Riscos ambientais e resistência a fármacos**

Com a utilização destes antibióticos para prolongar a vida útil de alimentos pode-se colocar a saúde em risco, pois há a possibilidade de aparecer fenômenos alergênicos, em indivíduos sensíveis; carcinogênicos; alterações no equilíbrio da flora intestinal; podendo até aparecer bactérias resistentes no trato digestivo dos consumidores (FOLLY, 2011).

É conhecido como resistência bacteriana o fenômeno no qual um microorganismo resiste a outras substâncias devido a características naturais ou adquiridas pela espécie bacteriana. A resistência natural, ou intrínseca, ocorre devido a mecanismos genéticos de caráter hereditário para impedir a ação de antibióticos, seja pela ausência de receptores ou pela presença de estruturas com essa funcionalidade. A resistência adquirida, por sua vez, pode ter origem em mutações genéticas que resultam em sínteses de diferentes proteínas capazes de tornar o medicamento ineficaz. O uso indiscriminado de antibióticos pode induzir a resistência adquirida devido à pressão seletiva sobre os microorganismos fazendo surgir nova espécie bacteriana melhor adaptada e mais difícil de ser combatida pelos medicamentos tradicionais. Há também a resistência transferível ou cruzada, outra forma de resistência adquirida, na qual ocorre transferência de material genético de um microorganismo resistente para outro sensível transferindo-lhe a característica da resistência a um ou mais antibióticos (GOMES, 2004).

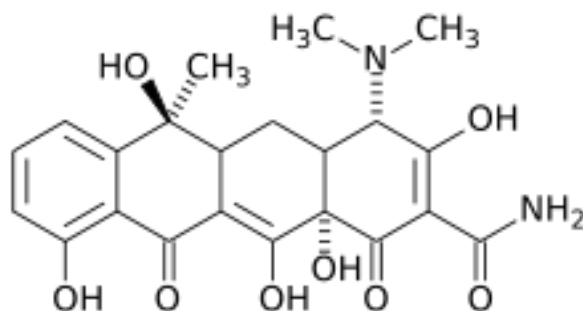
Com o aumento da utilização destes antibióticos, aumentou também a quantidade de resíduos descartados na rede de esgoto levando ao aumento de bactérias resistentes (DIAS, 1987).

### 1.1.3 Tetraciclina

Desde 1945 com a descoberta do primeiro membro da família das tetraciclinas (**Figura 1**), por Benjaminn Dugar, a partir da fermentação natural de uma bactéria do solo *Streptomyces aureofaciens* até hoje são desenvolvidos e sintetizados análogos à tetraciclina. Outras tetraciclinas foram identificadas mais tarde, bem como produzidas a partir de semi-sínteses como as descritas

recentemente da classe das glicilglicinas como metaciclina, doxyciclina, minociclina e tigliciclina(CHOPRA, ROBERTS, 2001). Esta classe de antibióticos possui propriedades favoráveis como uma grande faixa de ação, possui baixa toxicidade e baixo custo, o que tornam seu uso fácil e indiscriminado (MAIA, 2010). São exemplos da classe das tetraciclinas a clorotetraciclina, doxyciclina, minociclina, oxitetraciclina e a tetraciclina (SILVA,1999). Todas elas têm em comum uma estrutura química denominada *anel naftaleno* e a diferença entre os vários tipos de tetraciclinas devem-se a diferenças nos grupos químicos que se ligam ao anel naftaleno, **Figura 1** (HERBST, MACÊDO, ROCCO, 2004) sendo que a forma de excreção da tetraciclina se dá na forma ativa em 60% pela urina e de 20 a 50% nas fezes. (BEALE, 2011)

Figura 1: Estrutura química das tetraciclinas



Tetraciclina têm sido prescritas como profilaxia e tratamento de infecções principalmente respiratórias, como pneumonia. Entretanto, estudos mostram que pode-se encontrar tetraciclina também no escarro, que pode ser explicado por este tipo de tratamento do trato respiratório, a qual irá penetrar no sebo sendo excretado

pelo suor proporcionando também o tratamento contra acne (CHOPRA, ROBERTS, 2001). Adicionalmente, estudos têm demonstrado que tetraciclina tem efeitos na profilaxia e tratamento de malária, *Plasmodium falciparum*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Leishmania*, *Trichomonas vaginalis*, *Toxoplasma gondii* e até mesmo para o tratamento de doenças causadas por protozoários. Alternativamente, as tetraciclina também apresentam efeitos não antibacterianos como anti-inflamação e imunossupressão pela inibição da lipase (ROBERTS, 2003), tornando ainda maior seu campo de aplicação.

Entretanto, os principais efeitos adversos do uso da tetraciclina são náuseas, vômitos, anorexia, flatulência, pirose e diarreia. O efeito mais grave, porém, é o atraso no crescimento dos ossos e formação de manchas amareladas permanente nos dentes de crianças durante a calcificação, quando administrada diretamente ou a suas mães no período de lactação ou gestação (KOROLKOVAS; BURCKHALTER 1988 p. 593-595).

Na medicina veterinária, a tetraciclina também pode ser utilizada no tratamento de infecções como a mastite em bovinos, aves, ovinos e suínos, e também usado para melhorar o crescimento. Outro uso se dá em aquacultura para controle de infecções em salmão, bagres e lagostas em cativeiro (CHOPRA, ROBERTS, 2001).

### **1.1.3.1 Métodos de determinação de tetraciclina**

Na literatura são descritos vários métodos para análise de tetraciclina como, por exemplo, os métodos por determinação espectrofotométrica através da complexação (NIAZI, SADEGHI, 2006), eletroforese capilar (IBARRA et al, 2011) e a



cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV, a qual é o método de análise preconizado pela Farmacopeia brasileira (RUFINO, 2009; PRADO, MACHINSKI, 2011). Atualmente, tem sido constatado um grande interesse na área da eletroquímica, especialmente no desenvolvimento de sensores. As vantagens que se obtém com o emprego de sensores eletroquímicos são inúmeras, como alta seletividade e sensibilidade, reprodutibilidade, robustez e principalmente o baixo custo, tornando, assim, muito promissora essa metodologia de análise (WONG et al, 2014, LOWINSOHN *et al*, 2006).

## **1.2 Sensores eletroquímicos**

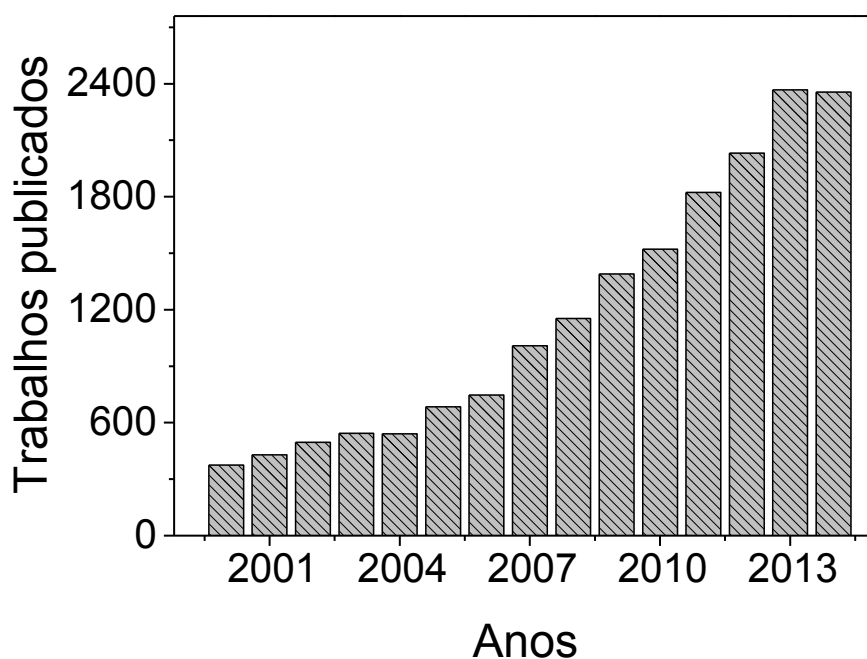
O desenvolvimento de sensores eletroquímicos tem se destacado muito recentemente, principalmente devido aos novos desafios impostos por amostras de interesse industrial, clínico e ambiental, que têm levado a uma crescente busca por métodos analíticos cada vez mais eficientes.

A utilização de técnicas eletroquímicas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos constitui-se em uma poderosa ferramenta para os químicos analíticos na resolução de seus problemas, especialmente por causa de algumas características vantajosas como a elevada sensibilidade das determinações, custo moderado quando comparado à CLAE e portabilidade. A versatilidade das técnicas eletroquímicas também merece destaque visto que é possível controlar as reações eletródicas modificando a interface eletrodo-solução através de correntes mais baixas e diminuição da corrente capacitiva, além de, principalmente, priorizar a corrente faradaica, que é a corrente de interesse (LOWINSOHN, BERTOTTI, 2006). Deve-se enfatizar que as reações eletrolíticas que ocorrem na superfície do eletrodo

são heterogêneas e tem lugar na região interfacial entre o eletrodo e a solução, região onde a distribuição de carga difere da fase no interior da solução. O eletrodo pode atuar como doador (redução) ou receptor (oxidação) de elétrons transferidos para ou desde as espécies em solução (BRETT, 1997).

Na **Figura 2** pode-se notar a evolução de trabalhos científicos publicados entre os anos de 2000 a 2014, com destaque em 2013 e 2014 que apresentaram aproximadamente 2400 trabalhos científicos publicados, mostrando o crescimento exponencial e indicando o interesse da comunidade científica por esta área de pesquisa.

**Figura 2:** Número de trabalhos científicos sobre sensores eletroquímicos publicados entre janeiro de 2000 e dezembro de 2014 coletados da base de dados do SciFinder®.



### 1.2.1 Eletrodos quimicamente modificados (EQM)

O termo eletrodo quimicamente modificado (EQM) foi introduzido no jargão eletroquímico por Murray e colaboradores 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 (SOUZA, et al, 1997). A modificação da superfície do eletrodo pode ocorrer com o uso de muitos compostos, como por exemplo, pelo uso de enzimas como a acetilcolinesterase (biossensor), ou pelo uso de um composto orgânico ou inorgânico que imita a função enzimática (bioinspirado), ou que imita a estrutura química do sítio ativo da enzima (biomimético). O fato é que a modificação da superfície através do uso desses materiais permite melhorar a reatividade, e/ou seletividade, e/ou sensibilidade do dispositivo, possibilitando o desenvolvimento de eletrodos para vários propósitos e aplicações (WONG, 2014, PEREIRA, 2002, SOTOMAYOR, 2006).

Sensores à base de pasta de carbono são um tipo de EQM que consiste em uma mistura de grafite em pó e um ou mais modificadores que permitirá obter características vantajosas como alta sensibilidade e seletividade de um ou mais analitos de interesse. Nesse tipo de sensor é utilizado um aglutinante, geralmente óleo mineral (Nujol®), para obtenção da pasta de carbono modificada. As características vantajosas de um EQM são verificadas quando se compara com a resposta eletroquímica do eletrodo de pasta de carbono não modificada.

Por exemplo, no caso da construção de sensores biomiméticos, a pasta de carbono é modificada com compostos redox capazes de mimetizar o sítio ativo de enzimas redox (GOBATTO, et al., 2010; BONI, et al., 2010; WONG, et al., 2010). Na literatura, recentemente, tem sido observado o uso de nanomateriais que contribuem

com a resposta eletroquímica do sensor. Dentre estes compostos podem ser citadas as nanopartículas metálicas e os nanomateriais carbonáceos, como nanotubos de carbono e grafeno.

A **Tabela 1** apresenta algumas aplicações para o uso destes materiais descritos na literatura.

**Tabela 1:** Aplicações para uso de materiais carbonáceos com os respectivos modificadores.

<b>Material carbonáceo</b>	<b>Modificador</b>	<b>Aplicação</b>
Pasta de carbono	Ácido 1,1-Ferrocenodicarboxílico	Captopril (KARIMI-MALEH, 2009)
Pasta de carbono	<i>bis</i> (piridil)ftalocianinaferro (II)	Captopril (WONG, 2010)
Nanotubo de carbono	Nanotubo de carbono (NTC)	Paracetamol e ácido ascórbico (DUARTE, 2013)
Pasta de carbono	Ditiocarbamato	Carbamazepina (SILVA, 2006)
Pasta de carbono	Ácidos húmicos	Cu (II), Pb (II) e Bi (III) (CRESPILHO, 2004)
Pasta de carbono	2,7-bis(etilferrocenil) fluoreno-9-ona	Glutathione (RAOOF, 2009)
Pasta de carbono	Metalofalocianina	Dideoxinosina (OZOEMENA, 2009)

### 1.2.2 Modificação da superfície do eletrodo

A modificação consiste na escolha adequada do material do eletrodo assim como do método de imobilização conveniente para manter a atividade redox do modificador. Nesse contexto podem ser empregados para a modificação de

eletrodos enzimas, no caso de biossensores, ou catalizadores biomiméticos (complexos metálicos) para os sensores biomiméticos (WONG, 2010; PEREIRA, 2010).

Existem vários métodos de imobilização destes materiais como: (i) a adsorção que consiste na interação física do modificador na superfície do eletrodo; (ii) ligação covalente, onde o modificador é fixado na superfície eletródica por ligação covalente, nesse tipo de imobilização é possível manipular a reatividade dos grupos funcionais na superfície do eletrodo oferecendo um método estável; e (iii) a imobilização por oclusão, que é aquela comumente usada na obtenção de pastas de carbono modificadas, nas quais há a mistura de grafite em pó, agente modificador e um aglutinante podendo ser parafina ou óleo mineral (VALLE, 2011, WONG, 2014, PEREIRA, 2002).

### **1.2.3 Desenvolvimento de sensores eletroquímicos a base de pasta de carbono**

Nos últimos anos a literatura tem mostrado um aumento significativo no emprego de sensores amperométricos à base de pasta de carbono, os quais tem sido preparados a partir de uma simples mistura de pó de grafite e um modificador seletivo ou até usando materiais mais elaborados como compostos de ftalocianina, porfirina metálica e nanotubos de carbono (WONG, 2010 e BONI, 2010).

#### **1.2.3.1 Nanotubos de carbono de (NC)**

Nanotubos de carbono foram introduzidos por Iijima em 1991 apresentando-se como estruturas únicas e com propriedades mecânicas e eletrônicas notáveis

(IJIMA, 1991). Esses nanomateriais são compostos por folhas de grafeno enrolados na forma de um cilindro fechado, com estruturas hexagonais ligadas entre si com hibridização do tipo  $sp^2$  e dimensões nanométricas, formando uma cavidade interna oca. Os nanotubos de carbono são estruturas químicas altamente rígidas e resistentes a tensões mecânicas. Nesse sentido, os nanotubos de carbono possuem uma boa estabilidade química e mecânica, bem como propriedades eletrocatalíticas elevadas e interessantes para o emprego nos eletrodos (ZARBIN, OLIVEIRA, 2013; WONG, 2010). Desempenham simultaneamente as funções de condutores, tanto de calor como de eletricidade dependendo da direção de seu enrolamento, e estão divididos em dois grandes grupos, os de parede simples, compostos pelo enrolamento de uma única folha de grafeno (SWCNT, *single walled carbon nanotubes*) e os de paredes múltiplas (MWCNT, *multi walled carbon nanotubes*) (BELIN, et al., 2005).

Atualmente, nanotubos de carbono têm sido utilizados em numerosas aplicações práticas como dispositivos emissores de elétrons, armazenagem de energia, sensores eletroquímicos, entre outros (MOKHTAR, et al, 2012). A utilização de nanotubos de carbono em sensores eletroquímicos permite obter maior área superficial, amplificando o sinal analítico e algumas vezes até eletrocatalise (MORAES, 2010; HU, HU, 2009). Entretanto recentemente, vem se intensificando os estudos sobre a toxicidade desses nanotubos e do grafeno, quanto a exposição a esses nanomateriais, pois é conhecido que podem acelerar várias atividades intracelulares no organismo (ZARBIN, OLIVEIRA, 2013).

### **1.2.3.2 Óxido de grafeno (GO)**

O grafeno consiste em uma folha plana de átomos de carbono com hibridização  $sp^2$  densamente compactados, com espessura de um átomo e reunidos em uma estrutura cristalina hexagonal. Atualmente, a comunidade científica e tecnológica vem se interessando pelas várias aplicações como eletrônica, armazenamento e conversão de energia, biociências e biotecnologia. Algumas propriedades físico-químicas do grafeno o torna muito vantajoso, como sua excelente condutividade elétrica e térmica, resistência mecânica e, principalmente, baixo custo, esta última propriedade muito interessante quando comparado a outros nanomateriais. Em muitos trabalhos foi constatado que a imobilização de grafeno na superfície de eletrodos permite um aumento significativo da corrente faradáica, levando a um aumento de sensibilidade de sensores devido ao aumento da atividade eletrocatalítica (WONG, 2014, GEIM et al, 2007). Assim, a funcionalização destes materiais proporciona pequenas distorções na estrutura do grafeno alterando, assim, auxiliando a transferência de carga através das carboxilas (TONEL, et al 2013).

### **1.3 Sistemas bio-inspirados**

Sistemas bio-inspirados referem-se à simulação/imitação da arquitetura de sistemas biológicos (ZAPP *et al*, *apud* SANTOS, CAVALHEIRO, 2014), os quais espera-se que apresentem propriedades similares às daquele sistema que foi imitado (KIM *et al*, 2005), desenvolvendo formas artificiais que podem imitar as únicas e delicadas estruturas e funções naturais (WANG *et al*, 2013). Assim, bio-inspiração envolve os conceitos de biologia, mecanismos e funções e é o ponto de

partida para o desenvolvimento de materiais sintéticos com estrutura e funções avançadas.

Os materiais químicos bio-inspirados são importantes para diversas áreas como engenharia biomédica, bionanotecnologia, biocerâmica e biossensoriamento. A longo prazo, o caminho entre sistemas biológicos e materiais bioinspirados poderia originar uma “biologia artificial” na qual a evolução de componentes biomiméticos seriam tão comum quanto a transformação da natureza humana (DUJARDIN, MANN, 2002).

Os sistemas bio-inspirados promovem um diálogo entre a ciência básica e a engenharia aplicada, pois requer o conhecimento de como funciona um sistema vivo, mas permite adicionar características que não estão presentes nos modelos biológicos, garantindo performances superiores às naturais. Os processos biomiméticos, por sua vez, possibilitam testes precisos para copiar e recriar estruturas e funções sem precisar lidar com a complexidade dos sistemas vivos. Entretanto, é importante destacar que ambos os conceitos são componentes inseparáveis para o progresso tecnológico (VULLEV, 2011).

Assim, a somatória dos avanços da ciência para obtenção de sistemas bio-inspirados acoplados às habilidades tecnológicas até agora desenvolvidas, permitem o desenvolvimento de novas aplicações, com intuito de complementar ou imitar a especificidade dos organismos biológicos, através de sistemas biomiméticos. No caso específico dos biossensores, o intuito é a melhora em relação a sua seletividade e robustez de modo a oferecer opções mais interessantes para diagnósticos e tratamentos médicos.



## 1.4 Sensores biomiméticos

Nos últimos anos a literatura tem mostrado a possibilidade de desenvolvimento de sensores altamente seletivos, mais sensíveis e mais duradouros, baseando-se na química biomimética de enzimas, cuja estrutura e mecanismo de catálise são amplamente conhecidos (BLACKBURN et al., 1991; SOLOMON, 1996; SONO et al., 1996).

Estratégias para a construção deste tipo de sensores, principalmente voltamétricos, estão baseadas na estrutura do sítio ativo da enzima tomada como modelo e no mecanismo enzimático da reação que será catalisada, que na maioria das vezes trata-se de enzimas redox. Assim, sensores biomiméticos são baseados em análogos sintéticos de enzimas naturais que proporcionam uma maior estabilidade do que os sensores baseados em materiais biológicos. O desenvolvimento desses sensores se dá pela mimetização do sítio ativo da enzima e a reação envolvida na catálise desta com o substrato, favorecendo uma transferência eletrônica que proporciona maior eficiência ao processo (SOTOMAYOR; KUBOTA, 2002) e, desta forma, permitindo obter sensores mais sensíveis e, ao mesmo tempo, seletivos e duradouros.

### 1.4.1 Enzimas P450

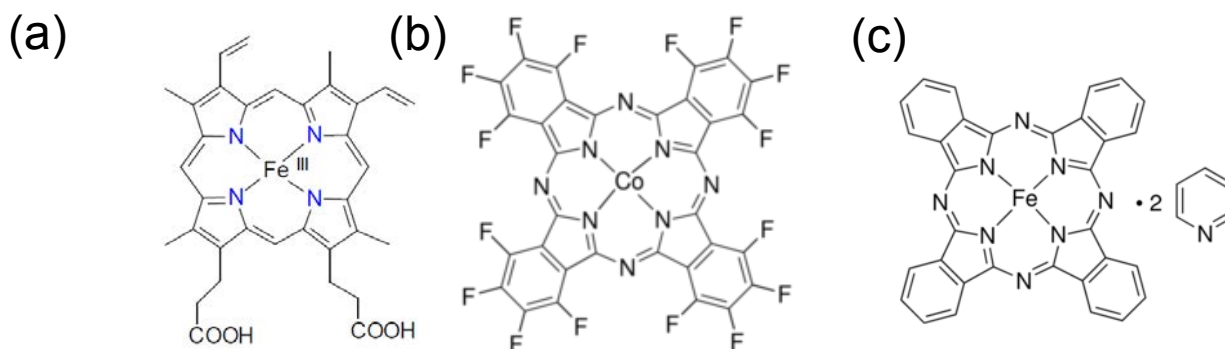
As enzimas P450 ou citocromo P450, da família das óxido-redutases, constituem um dos principais sistemas enzimáticos do organismo que atua sobre diversos xenobióticos, pesticidas, fármacos, entre outros. Localizam-se no retículo endoplasmático liso, mitocôndrias e outras membranas. O termo P450 se refere ao fato de que, quando ligada ao monóxido de carbono (CO), o complexo mostra um

espectro de absorção característico, com pico de absorção em aproximadamente 450 nm.

As enzimas P450 apresentam um sítio ativo que é comum a todas essas enzimas, o composto organometálico ferro protoporfirina IX (**Figura 3**). O uso de compostos mimetizadores é de extrema importância tendo em vista a seletividade promovida por essas enzimas. Assim, tem sido mostrado que complexos organometálicos com estruturas semelhantes ao sítio ativo desta enzima, como derivados de ftalocianinas e porfirinas de ferro, manganês e cobalto, são capazes de desempenhar essa função (HLAVICA, 2004; CHAUHAN, KUMARI, 2007; HIRAO, KUMAR, SHAIK, 2006). A utilização destes materiais facilita a transferência eletrônica entre o analito e a superfície do eletrodo, podendo ser imobilizados na superfície dos eletrodos através de algum agente imobilizador (WONG, 2014).

Na **Figura 3**, são apresentadas as estruturas químicas da ferro protoporfirina IX e dos complexos organometálicos utilizados neste trabalho, na tentativa de construção de sensores biomiméticos para tetraciclina.

**Figura 3:** Estrutura do sítio ativo da P450, a ferro protoporfirina (IX) (a) e dos complexos 1, 2, 3, 4, 8, 9, 10, 11, 15, 16, 17, 18, 22, 23, 24, 25 – Hexadecafluoro-29H-31H-ftalocianina cobalto (II) (b) e *Bis*(piridil)ftalocianina ferro (II) (c).



# CAPÍTULO II

## 2 OBJETIVO

Este trabalho tem por objetivo o desenvolvimento de sensores voltamétricos seletivos, sensíveis e estáveis visando determinação de tetraciclina em amostras ambientais, biológicas e farmacêuticas.

Para isto foi proposta a construção de sensores eletroquímicos modificados com nanomateriais carbonáceos e complexos biomiméticos do sítio ativo da enzima P450.

# CAPÍTULO III

## 3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### 3.1 Reagentes e Soluções

Todos os reagentes empregados foram de grau analítico ou cromatográfico (CLAE), segundo a necessidade. Todas as soluções foram preparadas com água deionizada (resistividade  $\geq 18 \text{ M}\Omega$  a  $25^\circ\text{C}$ ) obtida de um sistema de purificação Milli-Q (Direct-0,3).

Tetraciclina hidrocloreada, nanotubos de carbono de parede múltipla e grafeno foram adquiridos da Sigma-Aldrich<sup>®</sup>. Hidróxido de sódio, ácido clorídrico e dihidrogenofosfato de sódio foram obtidos da Synth-Brazil<sup>®</sup>.

Soluções estoque de tetraciclina foram preparadas a partir da dissolução de 40 mg do analito e dissolvidas com água deionizada até um volume de 10,0 mL.

Os eletrólitos utilizados foram soluções de tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  que foram preparadas a partir de 13 g de fosfato monobásico de potássio anidro dissolvidos em 1 litro, após o ajuste de pH com solução  $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  de ácido clorídrico para pH abaixo de 7,0 e hidróxido de sódio para pH acima de 7,0.

### 3.2 Medidas Eletroquímicas

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um micro-potenciostato da Autolab Tipo III, usando uma célula eletroquímica convencional de 3 eletrodos, contendo um eletrodo de referência de  $\text{Ag}|\text{AgCl} (\text{KCl}_{\text{sat}})$  comercial (Analion<sup>®</sup>), eletrodo auxiliar de fio de platina em forma de espiral e eletrodo para uso com pasta de carbono com diâmetro de 4 mm, como eletrodo de trabalho.

### **3.3 Construção dos sensores eletroquímicos**

#### **3.3.1 Funcionalização de nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNT-COOH)**

O método de funcionalização para nanotubos de carbono consistiu em misturar 20 mg de nanotubos de carbono de paredes múltiplas com 100 mL de solução de sulfonitrila ( $3\text{H}_2\text{SO}_4:1\text{HNO}_3$ , concentrada). Essa mistura foi agitada durante 12 horas e posteriormente realizada a filtração em papel de filtro com diluição de 1:10 (solução/água) e lavagem com água ultra pura para retirada do ácido (pH próximo a 7). Após isso, o material foi levado a estufa a 70 °C por 12 horas para secagem do material (WONG, et al., 2014). Após este tratamento obteve-se o nanotubo de carbono funcionalizado com grupos carboxila (MWCNT-COOH).

#### **3.3.2 Funcionalização do grafeno (GO)**

O método de funcionalização para grafeno consistiu em misturar 20 mg de grafeno com 100 mL de solução de sulfonitrila ( $1\text{H}_2\text{SO}_4:1\text{HNO}_3$ ). Essa mistura foi agitada durante 4 horas e posteriormente realizada a filtração em papel de filtro com diluição de 1:10 (solução/água) e lavagem com água ultra pura para retirada do ácido. Após isso, o material foi levado em estufa a 70 °C por 12 horas para secagem (SHESHMANI et al, 2013). Após este tratamento obteve-se o grafeno em sua forma oxidada (GO).

### 3.3.3 Preparação do eletrodo de pasta de carbono modificada com MWCNT-COOH e GO

A preparação da pasta de carbono para determinação de tetraciclina foi realizada inicialmente misturando 80 mg de pó de grafite, 10 mg de MWCNT-COOH, 10 mg de GO e 1,0 mL de tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0). O material foi cuidadosamente homogeneizado com uma espátula de aço inox e, a seguir, deixado secar ao ambiente por um período de 24 horas para evaporação da fase líquida. Sobre o material seco, adicionou-se aproximadamente 90 µL do agente aglutinante, óleo mineral (Nujol<sup>®</sup>), para a obtenção da pasta de carbono modificada.

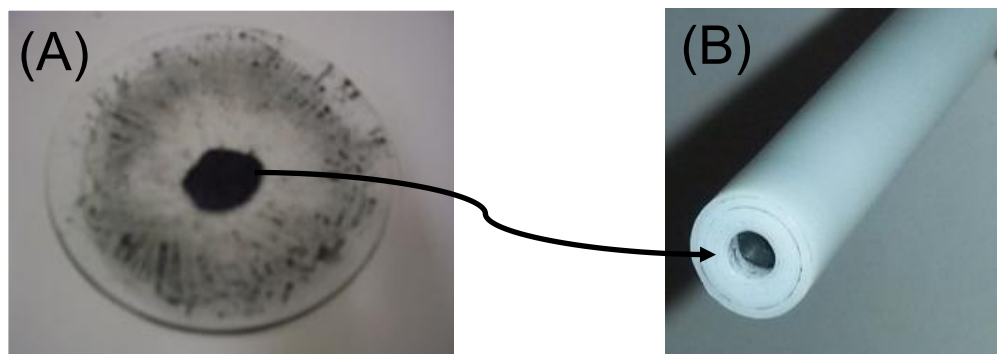
### 3.3.4 Preparação do sensor biomimético

A preparação do sensor biomimético visando a determinação de tetraciclina foi realizada de três formas. Misturando 90 mg de pó de grafite, 10 mg do material biomimético e 1,0 mL de tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0), ou misturando 80 mg de grafite, 10 mg de complexo metálico, 10 mg de MWCNT-COOH e 1,0 mL de tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0), ou misturando 70 mg de grafite, 10 mg de complexo metálico, 10 mg de MWCNT-COOH, 10 mg de GO e 1,0 mL de tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0) Estas misturas foram cuidadosamente homogeneizadas com uma espátula de aço inox e, a seguir, deixadas secar ao ambiente por um período de 24 horas para evaporação da fase líquida. Após secos sobre os materiais foram adicionados 90 µL do agente aglutinante, óleo mineral (Nujol<sup>®</sup>), e homogeneizou-se todas as misturas obtendo-se as correspondentes pastas de carbono modificadas. Cada pasta, **Figura 4A**, preparada foi introduzida na cavidade do eletrodo de trabalho de dimensão de 4 mm diâmetro e 1 mm de



profundidade, **Figura 4B**. O eletrodo utilizado é composto por um suporte de teflon, um disco de platina como contato com a pasta e uma haste de cobre para contato elétrico.

**Figura 4:** Construção do eletrodo de pasta de carbono. (A) Pasta de carbono modificada. (B) Eletrodo adequado para montagem do sensor.



Os complexos utilizados nesse trabalho encontram-se na **Tabela 2**.

**Tabela 2:** Complexos organometálicos utilizados como modificadores biomiméticos.

Complexos testados como potenciais catalisadores P450
<i>Ftalocianina cobre (II)</i>
<i>Hexadecafluoro-29H-31H ftalocianina cobalto</i>
<i>Bis(piridil)ftalocianina ferro (II)</i>
<i>Cloroftalocianina ferro (III)</i>
<i>Tetrakismetoxifenilporfirina cobalto (II)</i>
<i>Ftalocianina cobalto</i>
<i>29H,31H-Ftalocianina 1,4,8,11,15,18,22,25-octabutoxi níquel (II) (NiOPc)</i>
<i>Cloro 21H,23H-porfirina 5,10,15,20-tetraquis (pentafluorophenil) ferro (III)</i>
<i>Protoporfirina IX</i>
<i>Cloreto de 5,10,15,20-Tetrafenil-21H,23H-porfirina ferro(III)</i>

A utilização de eletrodos de pasta de carbono permite realizar inúmeras análises eletroquímicas mediante um simples polimento da superfície do eletrodo em papel sulfite limpo. Nas medidas eletroquímicas em voltametria de pulso diferencial, o desvio padrão relativo e a barra de erro obtida de três curvas analíticas foram realizadas com o objetivo de confirmar a repetibilidade e a confiabilidade do sensor.

### **3.4 Análise de amostras de formulações farmacêuticas**

O medicamento analisado foi o cloridrato de tetraciclina de 500 mg por cápsula, das marcas Teuto<sup>®</sup> e TetraMed<sup>®</sup>. Foram analisadas também cápsulas de cloridrato de tetraciclina de farmácias de manipulação, sendo também avaliada a resposta dos excipientes das formulações que são estearato de magnésio, laurilssulfato de sódio e talco, visando estudar as possíveis interferências na resposta do sensor.

Os medicamentos, que se encontravam como cápsulas, foram abertos para retirada do fármaco e dos excipientes. Em seguida foram preparadas soluções a partir de cálculos de massa referente à tetraciclina presente nas cápsulas em relação a sua massa total. Depois de preparada uma solução aquosa de concentração conhecida de tetraciclina, filtrou-se essa solução para a retirada de substâncias insolúveis.

A quantificação da tetraciclina em amostras farmacêuticas foi realizada com o sensor proposto e os resultados obtidos foram comparados com o método adaptado da Farmacopeia brasileira (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA,

2010). As análises foram realizadas preparando-se os padrões com a finalidade de se elaborar uma curva analítica. Cada solução padrão foi filtrada em filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  e então injetada no equipamento com volume de 20  $\mu\text{L}$  usando como fase móvel acetonitrila:metanol:ácido oxálico 0,1 mol L<sup>-1</sup> (70:12:18), coluna C8 e detector UV-Vis fixado em  $\lambda = 365$  nm. Cabe ressaltar que cada amostra de tetraciclina foi preparada da mesma forma que os padrões e injetadas no cromatógrafo.

### **3.5 Análise de amostras ambientais e de urina artificial**

O sensor proposto foi avaliado em três amostras de águas de rios localizadas na região de Araraquara, interior do estado de São Paulo (Brasil) e uma amostra de urina artificial que foi preparada a partir dos seguintes reagentes: 0,73 g de NaCl, 0,40 g de KCl, 0,28 g de CaCl<sub>2</sub>, 0,56 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,35 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,25 g de NH<sub>4</sub>Cl, e 6,25 g de ureia os quais foram dissolvidos com água ultra pura em um balão volumétrico de 250,0 mL (DEROCO et al, 2014).

Todas as amostras obtidas foram enriquecidas com tetraciclina obtendo-se uma solução com concentração de  $4,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> e analisadas eletroquimicamente com o sensor proposto e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV).

O método de adição de padrão foi utilizado para determinação de tetraciclina nas amostras preparadas e os resultados foram comparados com o método comparativo (CLAE-UV). As amostras analisadas em CLAE foram previamente filtradas em filtros de 0,45  $\mu\text{m}$  para evitar entupimento da coluna cromatográfica.

# CAPÍTULO IV

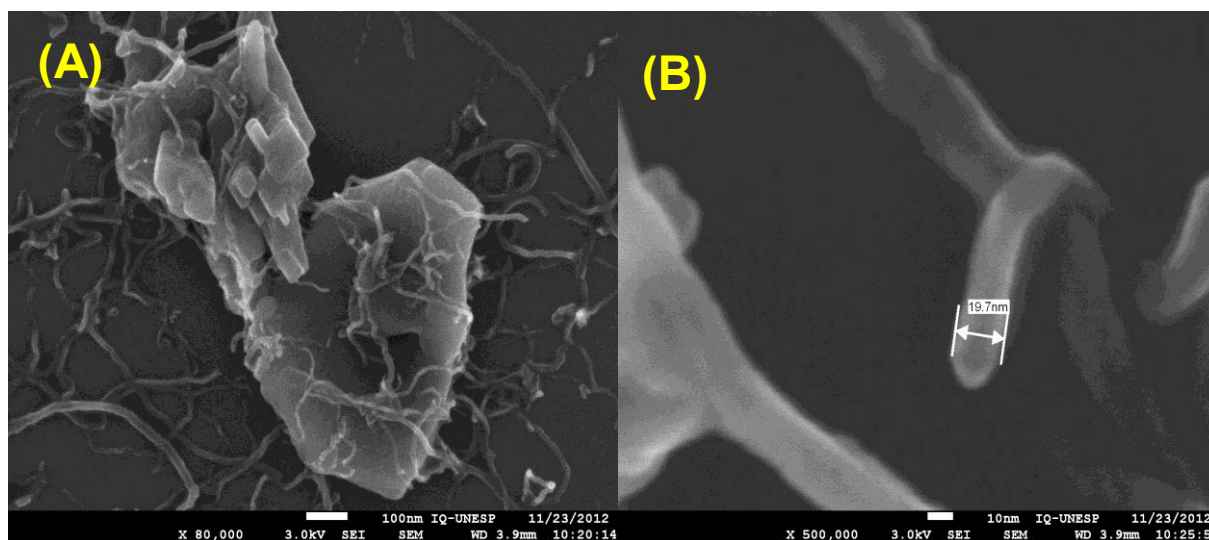
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Desenvolvimento de sensor eletroquímico modificado com MWCNT-COOH e óxido de grafeno (GO) para detecção de tetraciclina

#### 4.1.1 Caracterização dos materiais nanoparticulados

A **Figura 5** apresenta as imagens do grafite (A), onde observa-se a estrutura em forma de “flocos” característica do grafite, e MWCNT-COOH (B), onde observa-se a estrutura característica em “fio” própria dos nanotubos de carbono, que foram obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

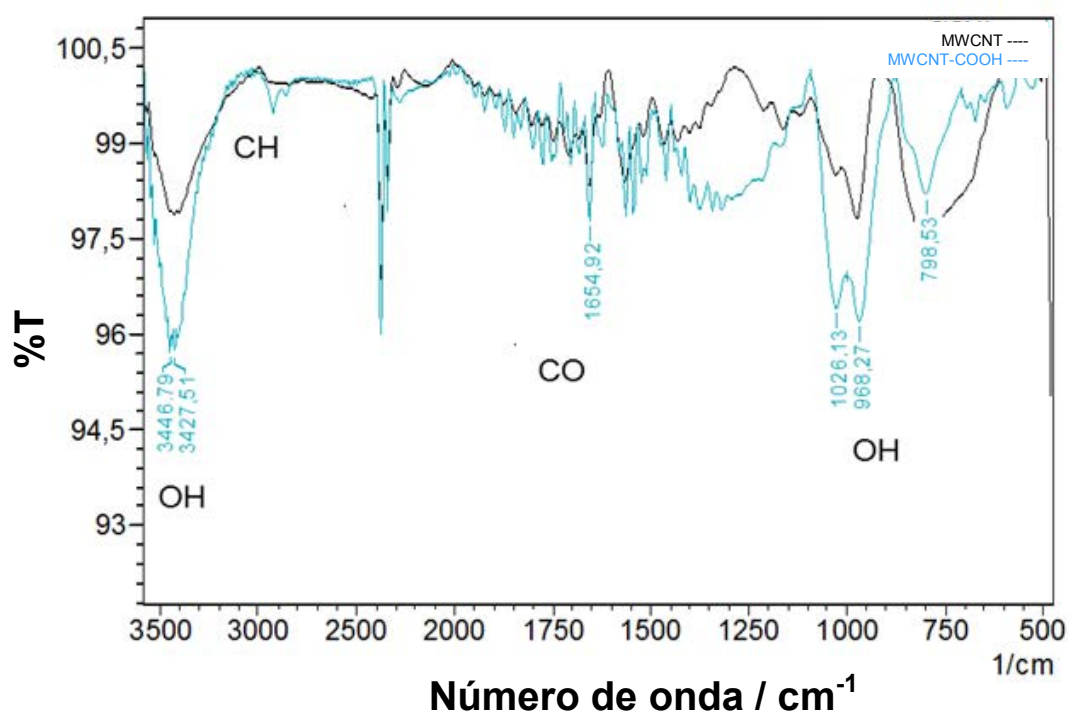
**Figura 5:** Microscopias eletrônicas de varredura dos materiais carbonáceos usados neste trabalho (A) Grafite, (B) MWCNT-COOH. Medidas realizadas em um microscópio eletrônico de varredura modelo JEOL JSM 7500F.



Na **Figura 6** é mostrado um espectro no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) do MWCNT sem funcionalizar tal como adquirido da Sigma e do MWCNT-COOH. Neste espectro de infravermelho podem ser destacadas as bandas de absorção em 1654, que corresponde ao grupo C=O, e bandas na região de 3000,

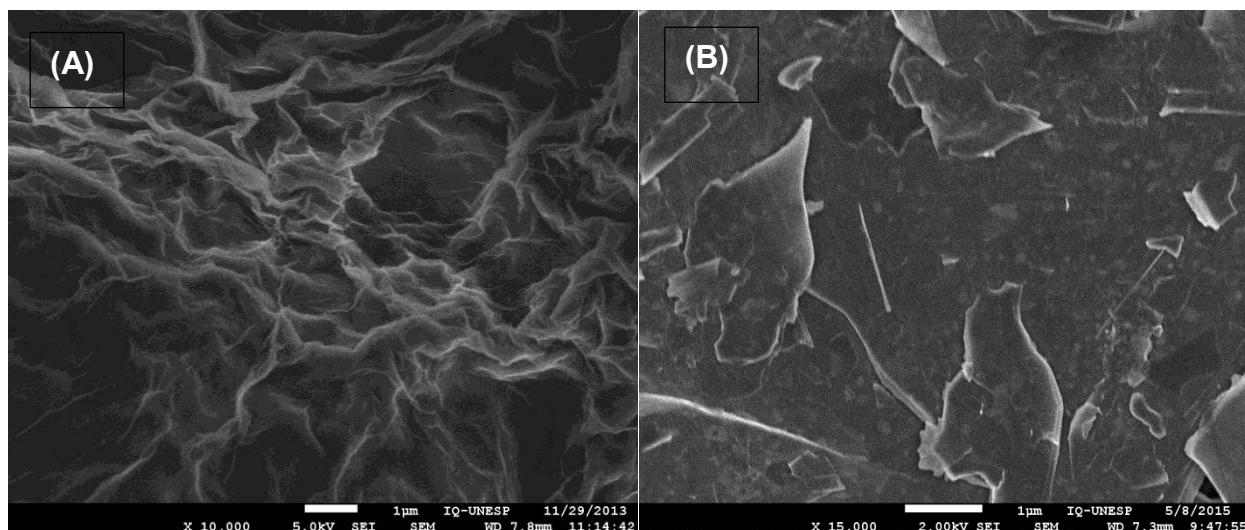
1400, 1000  $\text{cm}^{-1}$  que correspondem aos grupos e -OH dos ácidos carboxílicos que estão presentes no nanomaterial, evidenciando que o tratamento realizado para a funcionalização dos nanotubos de carbono foi bem sucedida.

**Figura 6:** Espectros de absorção no infravermelho de nanotubos sem funcionalizar (SIGMA) e de nanotubos funcionalizados tal como descrito na parte experimental (MWCNT-COOH) (B). Medidas realizadas em um espectrofotômetro de infravermelho por transformada de Fourier Shimadzu IR Prestige-21.



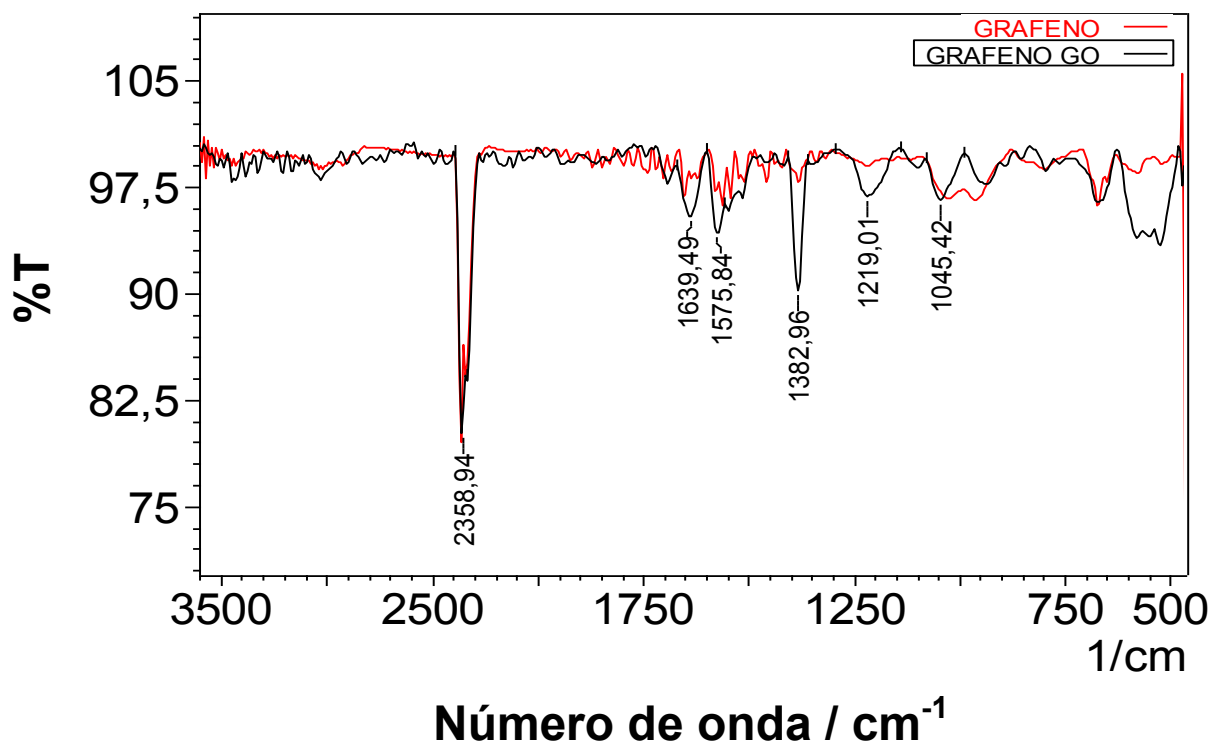
A **Figura 7 A** apresenta as imagens do óxido de grafeno (GO) usado neste trabalho obtidas por microscopia eletrônica de varredura, na qual a estrutura do GO se assemelha a “folhas de papel amassadas” ou enrugadas, tal como relatado e conhecido na literatura (ZHU *et al*, 2010, WONG, 2014). Na **Figura 7B** é possível verificar a presença do nanotubo funcionalizado, do grafeno ao fundo e das placas de grafite.

**Figura 7:** Micrografia eletrônica de varredura do óxido de grafeno (A) e do grafite Nanotubo funcionalizado e grafeno (B) usados neste trabalho. Imagens obtidas em microscópio eletrônico de varredura modelo JEOL JSM 7500F.



Já o espectro de infravermelho do GO (FTIR), mostrado na **Figura 8** mostra algumas bandas de absorção características para este nanomaterial. Em  $1639\text{ cm}^{-1}$  apresenta-se o pico correspondente da dupla ligação carbono-carbono (C=C), e em  $1575\text{ cm}^{-1}$  indica a ligação C=C presente em anéis aromáticos. A banda característica em  $1382\text{ cm}^{-1}$  sugere a deformação angular de C-H nas metilas, e a banda  $1219\text{ cm}^{-1}$  corresponde à ligação carbono-oxigênio de ácido carboxílico no GO. Este último pico indica que houve a funcionalização do grafeno para óxido de grafeno, sem modificar drasticamente a estrutura original do nanomaterial, pois os picos do grafeno continuam nas mesmas posições, porém mais definidos após o tratamento, indicando que, além de oxidar o grafeno, o material foi convenientemente purificado.

**Figura 8:** Espectros FTIR para o grafeno, tal como adquirido, e o grafeno funcionalizado (GO). Medidas realizadas em um espectrofotômetro de infravermelho por transformada de Fourier Shimadzu IR Prestige-21.

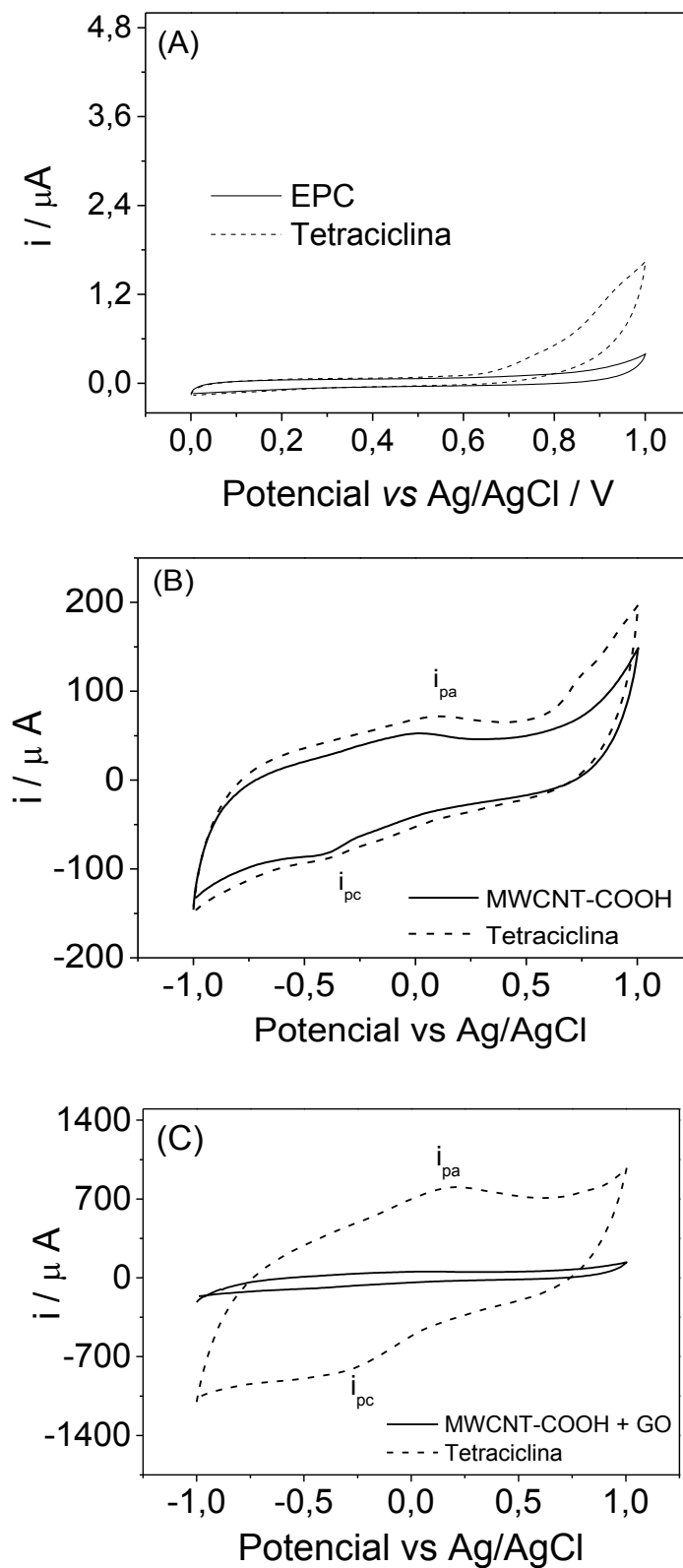


#### 4.1.2 Caracterização eletroquímica do sensor à base de nanopartículas carbonáceas

A partir dos resultados preliminares obtidos com o eletrodo modificado com nanotubo funcionalizado iniciaram-se os testes com eletrodo de pasta de carbono modificada com nanotubo de carbono funcionalizado (MWCNT-COOH) e óxido de grafeno (GO). A caracterização eletroquímica foi realizada usando voltametria cíclica em uma faixa de potencial de -1 a 1 V. As **Figura 9** e **Figura 10** apresentam os voltamogramas cíclicos detalhados dos modificadores utilizados nesta parte do trabalho, para fins de comparação, na presença de tetraciclina.



**Figura 9:** Voltamogramas cíclicos para sensor à base de pasta de carbono, EPC (A), MWCNT/EPC (B), e MWCNT-COOH-GO/EPC (C) na presença de tetraciclina na concentração de  $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Eletrólito: Tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,0),  $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$ .

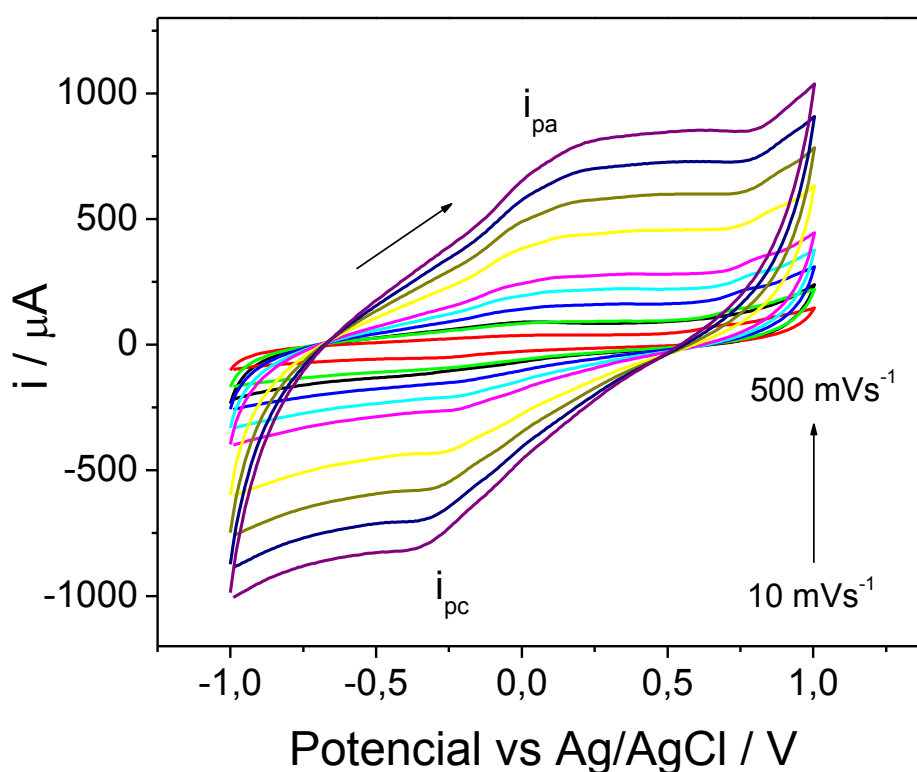


Pode-se notar que, nesse intervalo de potencial estudado, a resposta do sensor vai melhorando a medida que os materiais nanoestruturados são inseridos na preparação da pasta de carbono. Na **Figura 9A** a tetraciclina apresenta um perfil irreversível, com um discreto pico de oxidação em cerca de 700 mV vs Ag/AgCl ( $\text{KCl}_{\text{sat}}$ ). Ao usar os MWCNT-COOH (**Figura 9B**), a reversibilidade da tetraciclina na superfície do sensor é melhorada aparecendo um pico de oxidação em 320 mV e um pico de redução em -320 mV vs Ag/AgCl ( $\text{KCl}_{\text{sat}}$ ), porém com um baixo ganho de corrente. Já no sensor à base de MWCNT-COOH-GO/EPC (**Figura 9C**), além da melhora na reversibilidade, observa-se uma grande variação da corrente na presença de tetraciclina, como consequência da melhora da transferência eletrônica do sistema. Assim, os sensores preparados com estes dois nanomateriais, permitiram uma determinação mais sensível da tetraciclina.

Deve-se enfatizar que ao usar grafeno e MWCNT não funcionalizados, tal como recebidos do fabricante, não foi possível a detecção eletroquímica da tetraciclina sob as mesmas condições mostradas na **Figura 9**, pois é conhecido que estes nanomateriais, que são a base de carbono, possuem diâmetros e comprimento maiores que quando tratados, além de uma capa protetora que os envolvem. Assim, o tratamento com um agente oxidante (solução concentrada de  $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ , 1:1 e 1:3, m/m) removeu essa capa protetora (esfoliação) e, ao mesmo tempo, diminuiu o diâmetro e comprimento desses materiais, além de inserir grupos carboxilas nas extremidades que contribuirão enormemente com a condutividade eletrônica no sensor (TROJANOWICZ, 2006, BELIN, 2005). O tratamento químico desses materiais permitiu aumentar as propriedades eletroquímicas contribuindo assim com o aumento da seletividade e sensibilidade do sensor.

Quando foi avaliada a resposta do sensor em função da variação da velocidade de varredura entre 10 – 500 mV s<sup>-1</sup> (**Figura 10**), constatou-se que o aumento de velocidade promoveu maior sinal de corrente, e que o sensor foi bastante estável, uma vez que os voltamogramas cíclicos apresentaram-se sem ruído nenhum.

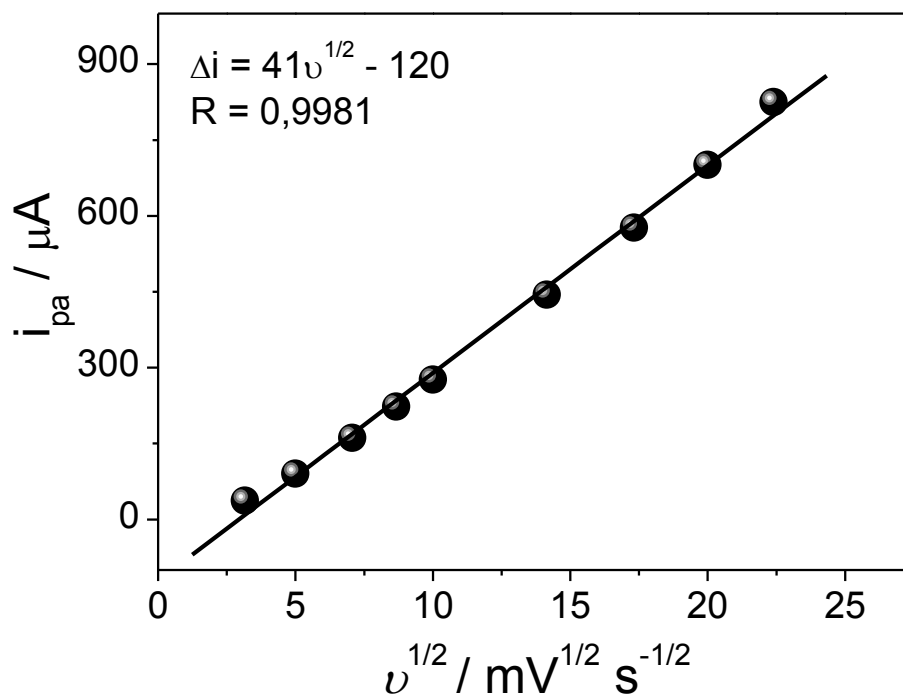
**Figura 10:** Variação da corrente de pico anódica com a velocidade e varredura. Condições de análise: [Tetraciclina] = 5,0 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>, Eletrólito: Tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0).



O gráfico de corrente de pico ( $i_{pa}$ ) vs  $\sqrt{v}$  (raiz quadrada da velocidade de varredura) apresentou um perfil de resposta linear (**Figura 11**) sugerindo que o transporte de massa da tetraciclina no meio eletrolítico para a superfície do sensor seja controlada por difusão. Entretanto este gráfico não passa pela origem (coordenadas 0,0), indicando que trata-se de um processo misto, no qual a

tetraciclina se adsorve na superfície do sensor. Com base nisto foi plotada a **Figura 12**, que corresponde a  $i_{pa}$  em função da  $v$ .

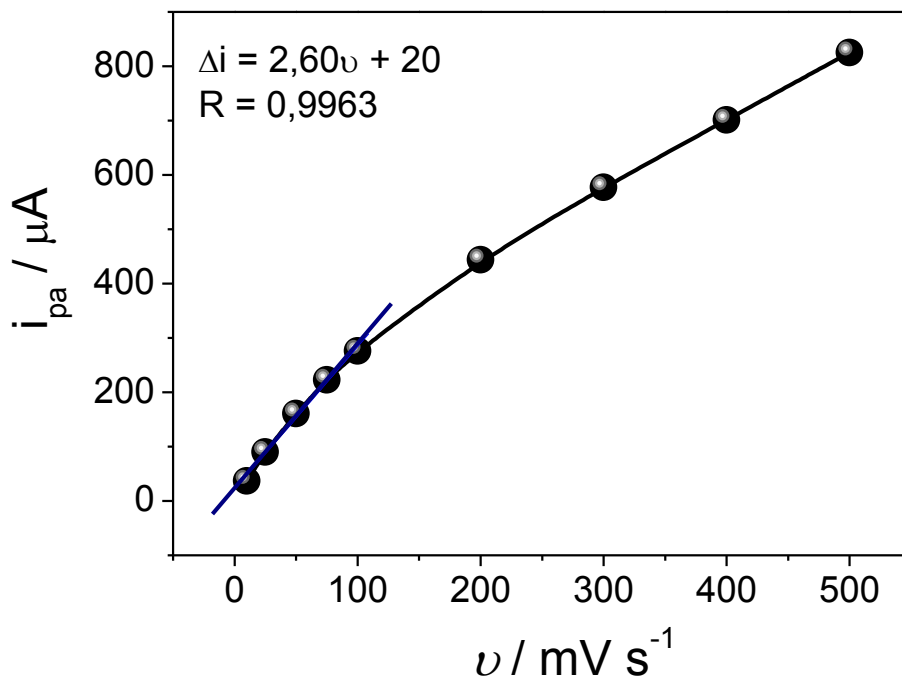
**Figura 11:** Gráfico da  $\Delta i_{pa}$  vs  $\sqrt{v}$ , obtido apartir dos dados da **Figura 10**.



Observa-se que, quando construído o gráfico de  $i_{pa}$  vs  $v$ , o perfil de resposta é apenas linear na região de baixas velocidades de varredura, na qual o sistema também se comporta como adsorativo em contato com a tetraciclina, concluindo que neste sistema eletroquímico ocorrem os fenômenos de transporte por difusão seguido por uma adsorção.

Este resultado abre a possibilidade de uso de voltametria de redissolução adsorativa na quantificação da tetraciclina, a qual promoverá um aumento na sensibilidade do sensor.

**Figura 12:** Gráfico da  $\Delta i_{pa}$  vs  $\nu$  obtido apartir dos dados da **Figura 10**.



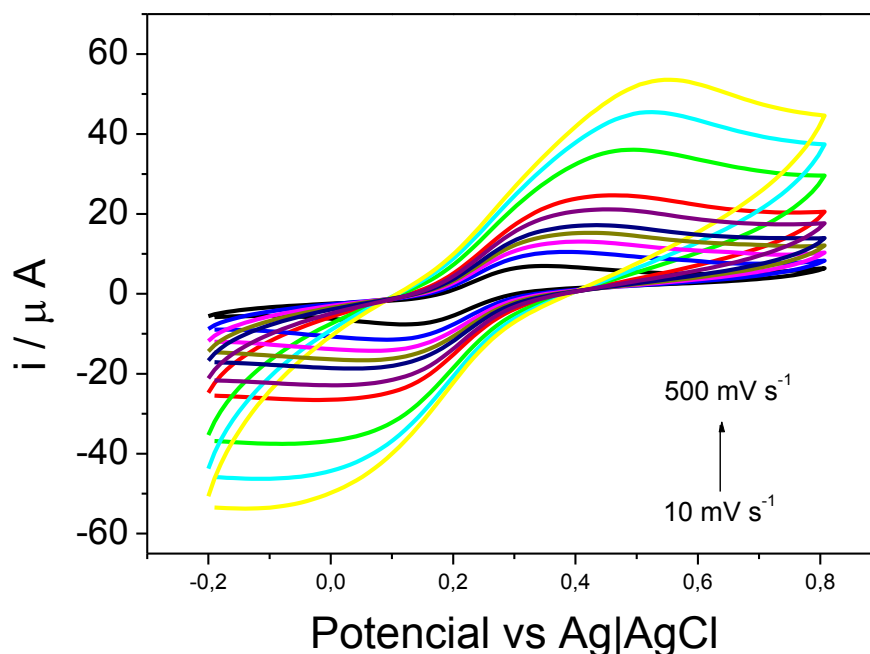
#### 4.1.2.1 Determinação da área eletroativa do sensor

No intuito de estimar as áreas eletroativas dos eletrodos de pasta de carbono e dos sensores construídos foram realizados experimentos usando a sonda eletroquímica de ferricianeto de potássio em diferentes velocidades de varredura.

Na **Figura 13** são mostrados, a maneira de exemplo, os voltamogramas cíclicos do ferricianeto de potássio no intervalo de  $\nu$  entre 10 e 500  $mV s^{-1}$  para o eletrodo de pasta de carbono modificado com MWCNT-COOH e GO.

As áreas eletroativas dos eletrodos de pasta de carbono (EPC), MWCNT-COOH/EPC e MWCNT-COOH-GO/EPC foram estimadas usando a equação de Randles-Sevick (eq. 1), tendo como eletrólito suporte KCl 0,1  $mol L^{-1}$  em presença de  $4,5 \times 10^{-3} mol L^{-1}$  de  $K_3[Fe(CN)_6]$ .

**Figura 13:** Gráfico da  $i$  para o eletrodo de pasta de carbono modificado com MWCNT-COOH e GO. Medidas realizadas em KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> na presença de  $4,5 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> de K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>].



$$I_p = 2,69 \times 10^5 A D^{1/2} n^{3/2} \nu^{1/2} C \quad (\text{eq. 1})$$

Onde:  $I_p$  é a corrente de pico,  $D$  é o coeficiente de difusão do  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  ( $6,2 \times 10^{-6}$  cm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>),  $A$  é área eletroativa (cm<sup>2</sup>),  $n$  é o número de eletrons,  $\nu$  é a velocidade de varredura (V s<sup>-1</sup>) e  $C$  é a concentração de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  (mol cm<sup>-3</sup>).

Após a obtenção das retas de  $I_p$  vs  $\sqrt{\nu}$  para cada eletrodo, o coeficiente angular é igualado ao termo  $2,69 \times 10^5 A D^{1/2} n^{3/2} C$ , de onde puderam ser calculados os valores da área ativa para cada eletrodo, as quais foram de  $6,6 \times 10^{-2}$ , 0,11 e 0,18 cm<sup>2</sup> para o eletrodo de pasta de carbono (EPC), MWCNT-COOH/EPC e MWCNT-COOH-GO/EPC, respectivamente. O aumento da área ativa da superfície do sensor

nanoestruturado (MWCNT-COOH e GO) foi 2,73 vezes maior em relação ao eletrodo de pasta de carbono não modificado, explicando os dados obtidos nas **Figura 10B** e **Figura 10C**.

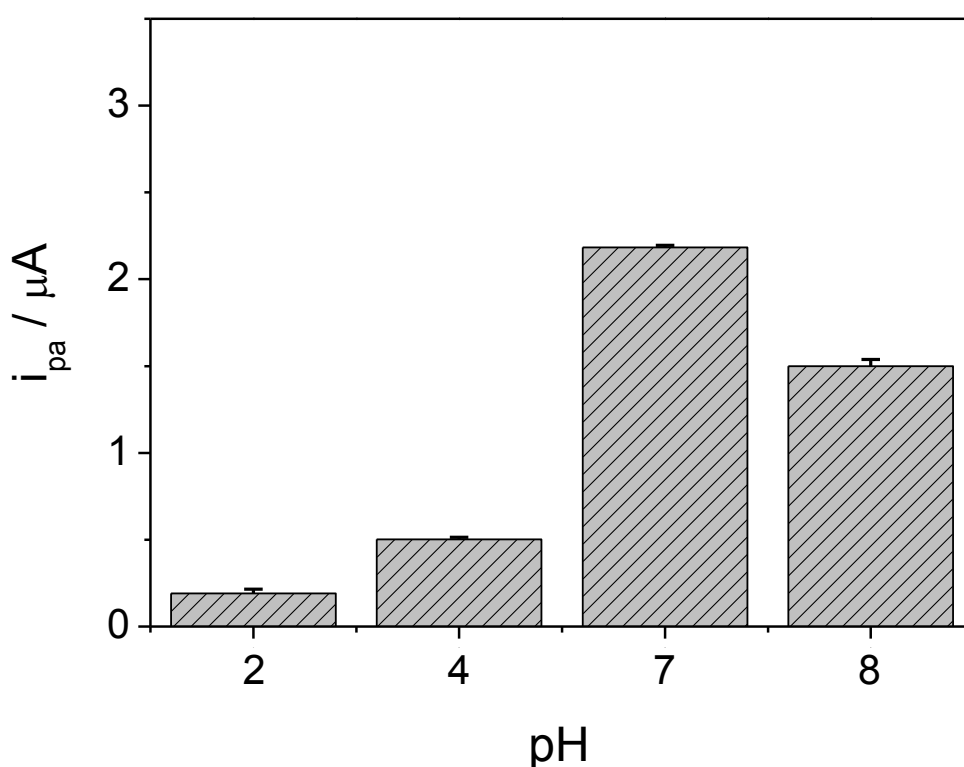
### 4.1.3 Otimização da resposta do sensor proposto

Como foi descrito pelos gráficos nas **Figura 11** e **Figura 12**, a tetraciclina é adsorvida na superfície dos sensores quando são usadas baixas velocidades de varredura. Com base neste resultado, para a quantificação deste analito, foi avaliada a redissolução adsortiva que, aliada a técnicas voltamétricas de pulso, permitiu obter sensores com maior detectabilidade. Para tal, usou-se a voltametria de onda quadrada com redissolução anódica adsortiva (VOQadVA) e a voltametria de pulso diferencial com redissolução anódica adsortiva (VPDadVA). Nestes experimentos foi usada a corrente de oxidação, uma vez que o pico anódico apresentou-se melhor definido.

Para a otimização da resposta do sensor, foram otimizadas as variáveis de pH, eletrólito suporte, concentração do eletrólito suporte e preparação da pasta em relação à quantidade de nanomateriais. O parâmetro que serviu para escolher a melhor condição foi a altura e o perfil do pico de oxidação.

Primeiramente foi estudado o pH do eletrólito suporte para análise da tetraciclina usando VPDadVA, para isso, foi avaliado o intervalo de pH entre 2 e 8. A **Figura 14** mostra o resultado obtido neste estudo, no qual pode ser observado que em pH 7 o sensor à base de nanomateriais apresenta a maior resposta e com maior precisão. Assim, este pH foi usado para os estudos posteriores.

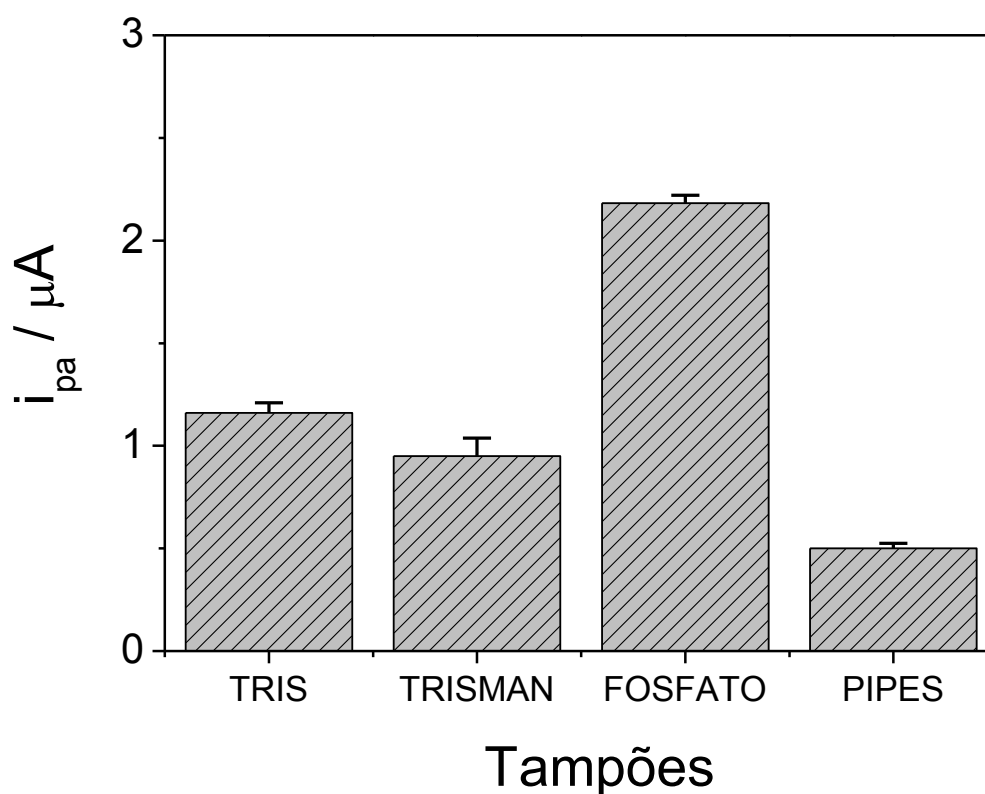
**Figura 14:** Estudo realizado para otimização do pH do eletrólito suporte. As medidas foram realizadas por VPDadVA nas condições de análise: [tetraciclina] =  $1,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>, degrau de potencial: 4 mV, amplitude de modulação: 75 mV, tempo de modulação: 10 ms, potencial de acumulação: 0,2 V, tempo de acumulação: 30 s em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Barra de erro correspondente a triplicatas.



Nas **Figura 15** mostra-se os resultados dos estudos realizados para avaliar o melhor eletrólito suporte para realizar os experimentos. Percebe-se claramente que a solução tampão fosfato apresentou o melhor resultado para o analito em estudo.

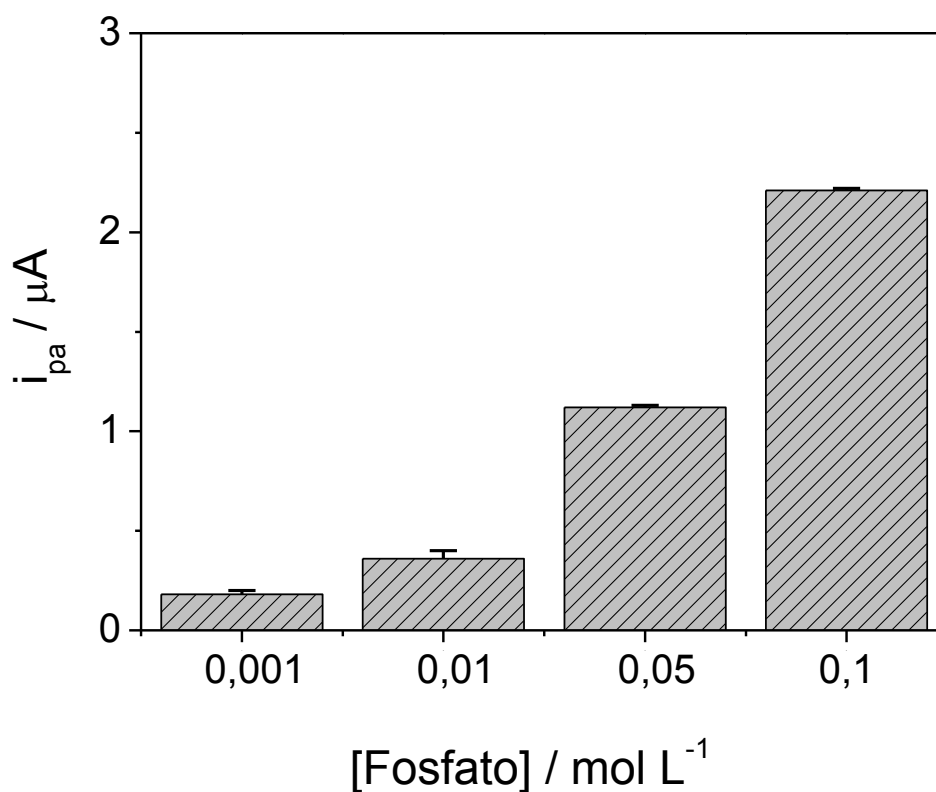


**Figura 15:** Estudo realizado para otimização do eletrólito suporte. As medidas foram realizadas por VPDadVA, nas condições de análise: [tetraciclina] =  $1,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>, degrau de potencial: 4 mV, amplitude de modulação: 75 mV, tempo de modulação: 10 ms, potencial de acumulação: 0,2 V, tempo de acumulação: 30 s. Barra de erro correspondente a triplicatas.



A **Figura 16** mostra o estudo realizado para escolher a concentração da solução tampão fosfato e, como pode-se observar, em  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  a resposta do sensor foi a maior. Desta forma, para realizar as medidas com o sensor proposto, usou-se como eletrólito suporte solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7).

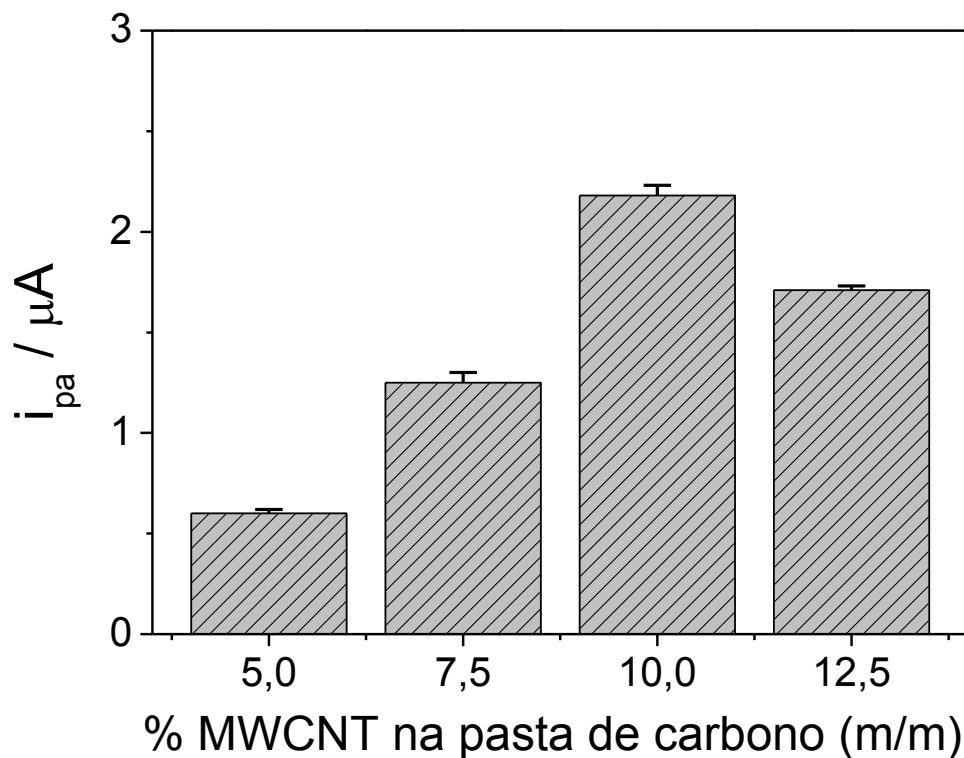
**Figura 16:** Estudo realizado para otimização da concentração do tampão fostato em pH 7,0. As medidas foram realizadas por VPDadVA nas condições de análise: [tetraciclina] =  $1,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>, degrau de potencial: 4 mV, amplitude de modulação: 75 mV, tempo de modulação: 10 ms, potencial de acumulação: 0,2 V, tempo de acumulação: 30 s. Barra de erro correspondente a triplicatas



Já a otimização na preparação da pasta foi realizada com base na quantidade de nanomaterial na mistura. Para tal, as **Figura 17** e **Figura 18** mostram o perfil da resposta do sensor em função da quantidade de MWCNT e de óxido de grafeno na composição da pasta de carbono, respectivamente. Pode-se verificar um aumento significativo no sinal analítico atingindo um máximo em 10% m/m tanto para óxido de grafeno quanto para o nanotubo de carbono, constatando-se que a quantidade excedente desses materiais provocava diminuição na resposta do sensor. Provavelmente, esse efeito deve-se ao aumento de aglutinante necessário para obtenção da pasta. Sendo assim, para esse trabalho, fixou-se a preparação das pastas com 10% de cada nanomaterial.

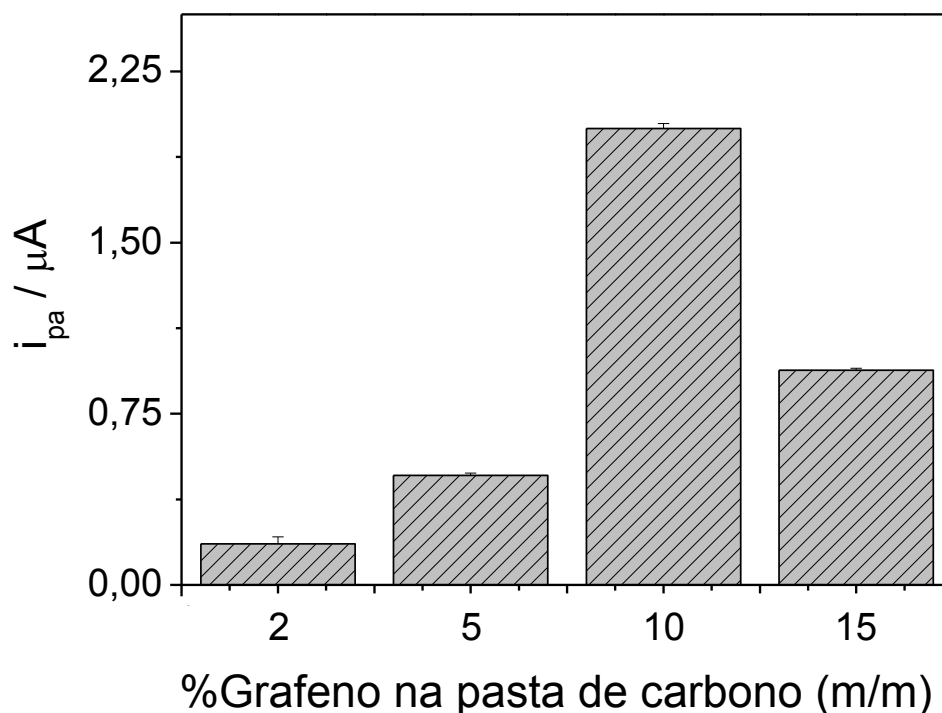
**Figura 17:** Estudo realizado para otimização da quantidade de MWCNT-COOH na pasta.

Medidas realizadas por VPDadVA nas condições de análise: [tetraciclina] =  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , degrau de potencial: 4 mV, amplitude de modulação: 75 mV, tempo de modulação: 10 ms, potencial de acumulação: 0,2 V em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ .



Na **tabela 3** são apresentados os parâmetros otimizados para a voltametria de pulso diferencial com redissolução anódica adsortiva (VPDadVA).

**Figura 18:** Estudo realizado para otimização da quantidade de óxido de grafeno na pasta. Medidas realizadas por VPDadVA nas condições de análise: [tetraciclina]=  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , degrau de potencial: 4 mV, amplitude de modulação: 75 mV, tempo de modulação: 10 ms, potencial de acumulação: 0,2 V em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ .



**Tabela 3:** Valores otimizados dos parâmetros de análise por VPDadVA.

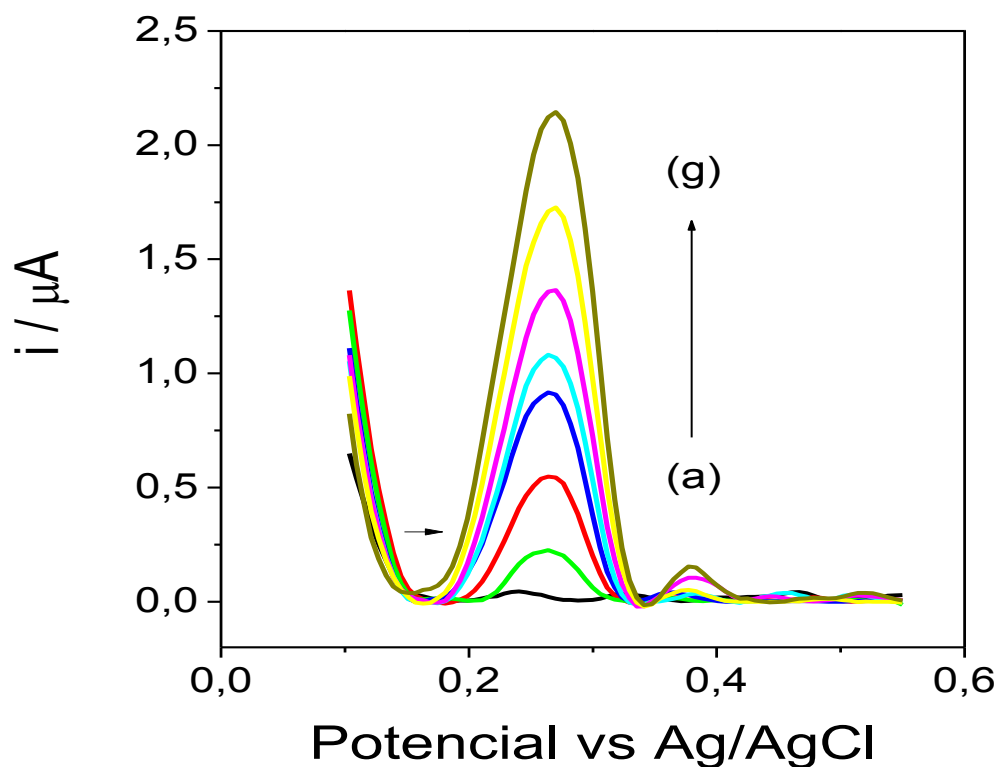
Parâmetro estudado	Faixa linear	Valor otimizado
Degrau de potencial (mV)	2 – 7	<b>4</b>
Amplitude de modulação (mV)	2,5 – 100	<b>75</b>
Tempo de modulação (s)	0,02 – 1,0	<b>0,5</b>
Tempo de acumulação (s)	0 – 60	<b>30</b>
Potencial de acumulação (mV)	-400 a 400	<b>200</b>

#### 4.1.4 Quantificação de tetraciclina por voltametria de pulso diferencial e voltametria de onda quadrada

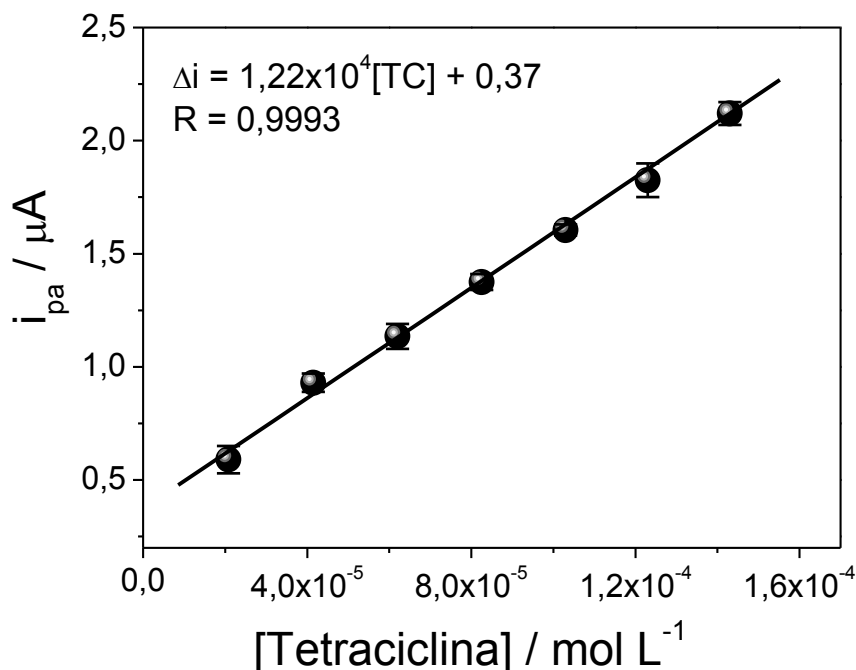
Na **Figura 19** mostra-se o perfil de resposta do sensor nas condições otimizadas e na **Figura 20** a curva analítica correspondente. Sob as condições previamente otimizadas, a faixa linear de resposta foi entre  $1,24 \times 10^{-5}$  e  $1,7 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>, sensibilidade de  $1,2 \times 10^4 (\pm 1,0 \times 10^3)$   $\mu\text{A mol L}^{-1}$  e limite de detecção de  $3,6 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>, que foi calculado como  $3 \times \text{SD}/m$ , onde SD é o desvio padrão da solução na ausência de tetraciclina ( $n = 10$ ), e  $m$  é o valor da sensibilidade da curva analítica.

**Figura 19:** Perfil voltamétrico em VPDadVA do sensor nas condições de análise otimizadas.

Condições eletroquímicas: Degrau de potencial 4 mV; amplitude de modulação 75 mV; tempo de modulação: 0,5 s; potencial de acumulação 0,2 V; tempo de acumulação: 30 s em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>. (a) eletrólito (b)  $2,10 \times 10^{-5}$  (c)  $4,89 \times 10^{-5}$  (d)  $7,27 \times 10^{-5}$  (e)  $9,60 \times 10^{-5}$  (f)  $1,19 \times 10^{-4}$  (g)  $1,41 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>.

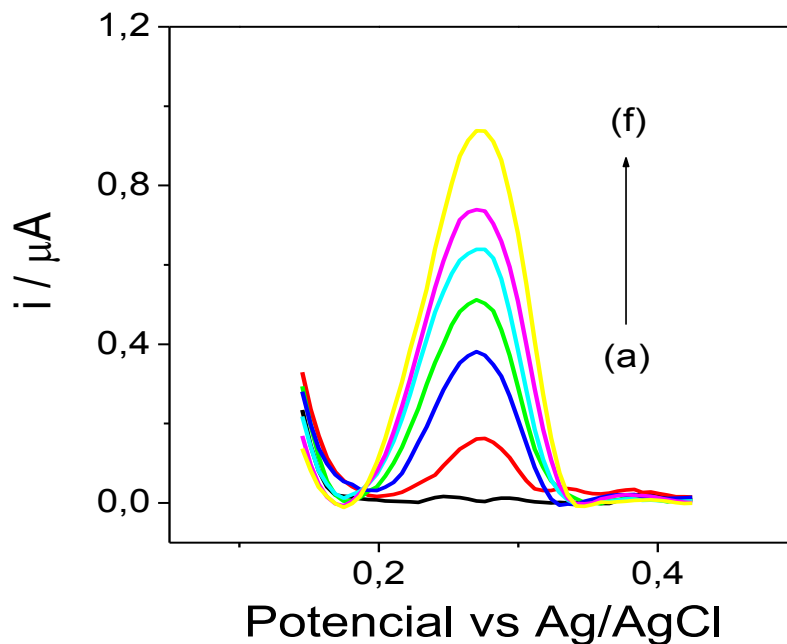


**Figura 20:** Curva analítica obtida a partir dos dados da **Figura 19**. Barra de erros correspondente a triplicatas.

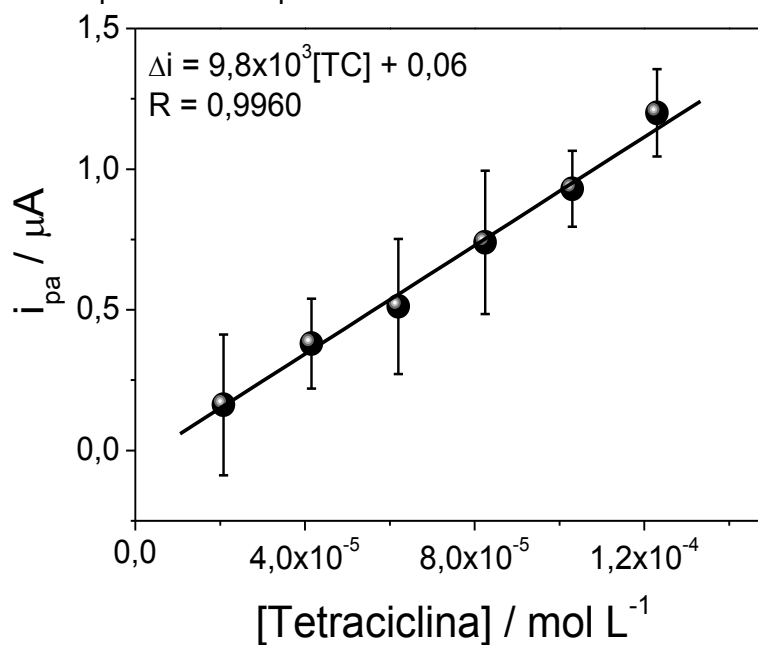


Entretanto, visando quantificar a tetraciclina em baixas concentrações, também foi avaliada a VOQ com redissolução adsortiva. Na **Figura 21**, mostra-se a resposta do sensor por VOQadVA nas condições otimizadas de análise e a curva analítica correspondente é mostrada na **Figura 22** sob estas condições o sensor apresentou uma faixa linear entre  $2,1 \times 10^{-5}$  e  $2,4 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>, sensibilidade de  $9,8 \times 10^3 (\pm 1,0 \times 10^3)$  µA mol L<sup>-1</sup> e limite de detecção de  $5,0 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> µA ( $3 \times$  SD/m), onde SD é o desvio padrão da solução na ausência de tetraciclina ( $n = 10$ ), e m é o valor da sensibilidade da curva analítica. Como pode ser observado o sensor apresenta pouca precisão, tal como visto pelas barras de erros. Desta forma, o método por VOQ não se apresenta adequado para quantificação da tetraciclina. Adicionalmente, em relação à detectabilidade e faixa de resposta, as duas técnicas apresentam-se similares.

**Figura 21:** Perfil do sensor em VOQadVA nas condições de análise a seguir:  $A_p = 100$  mV,  $E_{dep} = 0,2$  V, tempo de deposição = 120 s, frequência = 15 Hz, Estep = 6 mV, em solução tampão fosfato  $0,1$  mol L<sup>-1</sup> e pH 7,0. (a)  $2,10 \times 10^{-5}$  (b)  $4,89 \times 10^{-5}$  (c)  $7,27 \times 10^{-5}$  (d)  $9,60 \times 10^{-5}$  (e)  $1,19 \times 10^{-4}$  (f)  $1,41 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>.



**Figura 22:** Curva analítica obtida a partir dos dados da **Figura 21** (a)  $2,10 \times 10^{-5}$ ; (b)  $4,89 \times 10^{-5}$ ; (c)  $7,27 \times 10^{-5}$ ; (d)  $9,60 \times 10^{-5}$ ; (e)  $1,19 \times 10^{-4}$ ; (f)  $1,41 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>. Barra de erros correspondente a triplicatas.



Com base nos resultados apresentados por VPDadVA foi realizada uma comparação com outros trabalhos descritos na literatura, conforme mostrado na

**Tabela 4.**

**Tabela 4:** Comparação do sensor proposto com outros sensores reportados na literatura.

Eletrodo	Faixa linear (mol L <sup>-1</sup> )	Potencial (V)	LOD (mol L <sup>-1</sup> )	Referência
ECV (Fe/Zn–MMT) <sup>a</sup>	$3,0 \times 10^{-5} - 5,2 \times 10^{-4}$	1,17	$1,0 \times 10^{-5}$	(GAN, 2014)
MIP-Pt/Ti <sup>b</sup>	$2,0 \times 10^{-6} - 2,0 \times 10^{-5}$	0,8	$5,3 \times 10^{-8}$	(ZHAO, 2013)
MWNTs GNPs <sup>c</sup>	$2,0 \times 10^{-7} - 8,3 \times 10^{-5}$	1,1	$8,3 \times 10^{-8}$	(WANG, 2011)
GME <sup>d</sup>	$2,0 \times 10^{-5} - 2,0 \times 10^{-4}$	1,5	$1,8 \times 10^{-7}$	(WANG, 2012)
ECV (IL–MWNT) <sup>f</sup>	$1,1 \times 10^{-7} - 2,2 \times 10^{-5}$	0,54	$3,0 \times 10^{-8}$	(GUO, 2009)
EPC (GO/MWCNT*)	$2,1 \times 10^{-5} - 3,1 \times 10^{-4}$	0,3	$3,6 \times 10^{-8}$	<b>Este trabalho</b>

<sup>a</sup> Eletrodo de carbono vítreo modificado com composto a base de zinco e ferro (Fe/Zn–MMT).

<sup>b</sup> Cluster de nanoPt depositados em folhas de titânio (Pt/Ti)-MIP

<sup>c</sup> Microeletrodo de ouro modificado com nanotubos de carbono

<sup>d</sup> Microeletrodo de ouro

<sup>e</sup> Eletrodo de carbono vítreo modificado com aptamero e nanotubos de carbono

<sup>f</sup> Eletrodo de carbono vítreo modificado com líquido iônico e nanotubos de carbono

Como se pode observar o sensor torna-se promissor frente aos outros sensores eletroquímicos mostrados na **Tabela 4**, principalmente no que se refere ao baixo potencial de análise, conferindo ao sensor maior seletividade, e à capacidade de realização de inúmeras análises, mediante a renovação da superfície do eletrodo através de um simples polimento, o que diminui o custo por análise e, portanto, possibilita maior acessibilidade, não sendo possível esse polimento nos sensores à

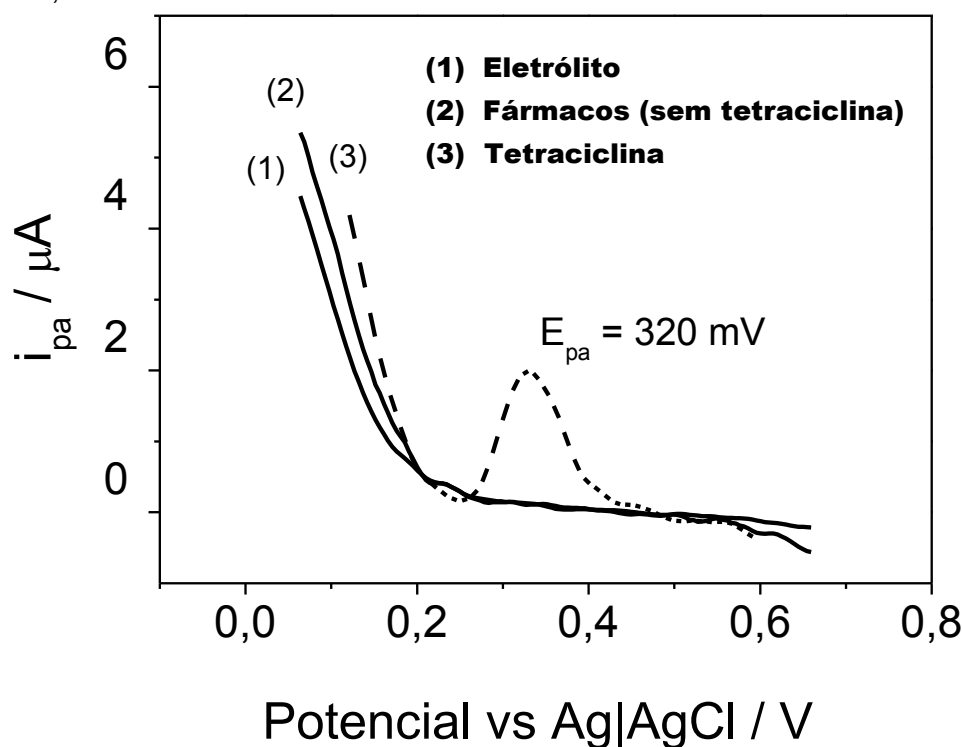


base de eletrodos sólidos e filmes nanoparticulados devido a perda da modificação na superfície desse tipo de eletrodo.

#### 4.1.5 Estudo de seletividade

No estudo de seletividade vários fármacos foram analisados em VPDadVA sob as condições otimizadas e, na faixa de potencial estudado, apenas a tetraciclina apresentou um pico de corrente ( $E_{pa}$ ) em potencial de 320 mV. Os fármacos estudados foram clindamicina, ciprofloxacina, rifampicina, secnidazol, piroxicam, ranitidina e tetraciclina. A concentração dos fármacos na cela eletroquímica foi de  $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  (Figura 23). As respectivas estruturas químicas se encontram em ANEXO I.

**Figura 23:** Estudo de seletividade do sensor na presença de diversos fármacos diferentes da tetraciclina. Condições de análise: degrau de potencial 4 mV; amplitude de modulação 75 mV; tempo de modulação: 0,5 ms; potencial de acumulação 0,2 V; tempo de acumulação 30 s em solução tampão fosfato  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  e  $[\text{fármacos}] = 1,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .



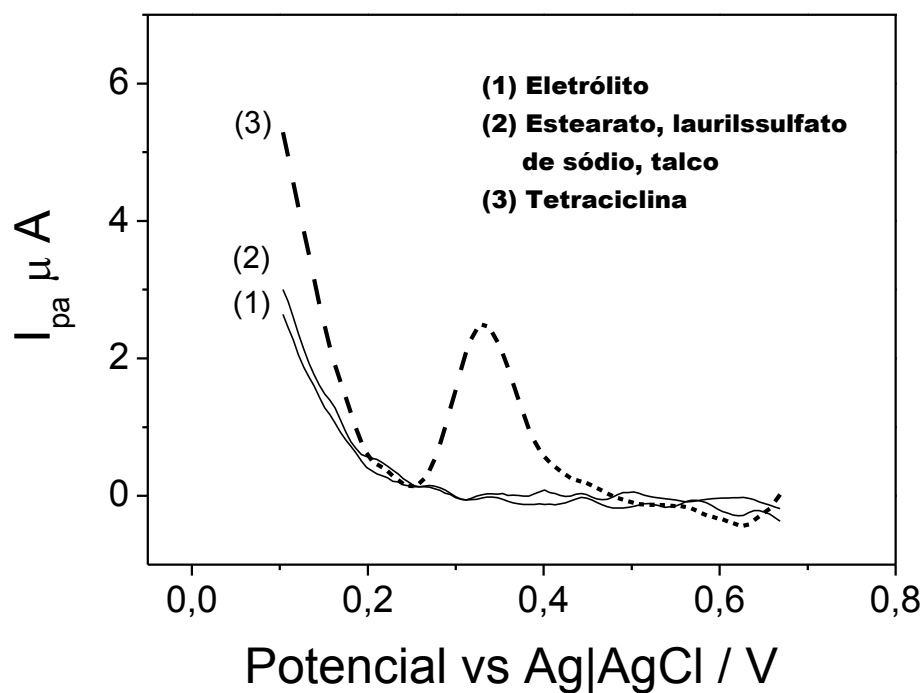
Como pode ser observado na figura anterior, apenas a tetraciclina apresenta resposta nas condições de análise usadas, o que viabiliza a aplicação do sensor em diversos tipos de matrizes.

#### 4.1.6 Estudos das possíveis interferências

A determinação de tetraciclina sob a influência de diversas substâncias como potenciais interferentes também foi estudada simultaneamente. Os interferentes estudados foram os excipientes encontrados nas formulações farmacêuticas como talco, amido, laurilssulfato de sódio e estearato de magnésio. Assim, para elaborar o estudo, soluções de tetraciclina  $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  foram enriquecidas com esses possíveis interferentes em uma razão molar de 1:1 (tetraciclina:interferente). Dessa quantidade preparada 100  $\mu\text{L}$  foi adicionada em cela eletroquímica contendo 10,0 mL de eletrólito. O sinal obtido foi comparado com aquele correspondente apenas ao da tetraciclina.

Na **Figura 24** pode-se observar que nenhum dos componentes das amostras de medicamentos no potencial de 320 mV vs Ag/AgCl interfere nas análises de tetraciclina. Vale ressaltar que os interferentes foram adicionados em triplicata a fim de verificar a consistência dos resultados.

**Figura 24:** Perfil de resposta do sensor na presença de tetraciclina e seus possíveis interferentes. Condições de análise: degrau de potencial 4 mV; amplitude de modulação 75 mV; tempo de modulação: 0,5 s; potencial de acumulação 0,2 V; tempo de acumulação 30 s em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>.



Portanto é possível concluir, a partir dos estudos realizados, que os materiais nanoparticulados MWCNT-COOH e GO, mostraram-se bons modificadores na pasta de carbono para a quantificação de tetraciclina, permitindo construir sensores com boa sensibilidade e seletividade, aliadas a um baixo limite de detecção. Assim, estes resultados permitiram aplicar o sensor em diversos tipos de amostras, tal como mostrado a seguir.

### 4.1.7 Aplicação do sensor na análise de amostras farmacêuticas

A quantificação deste fármaco nos medicamentos foi realizada em triplicata e usando o método da adição de padrão para se avaliar, evitar e prevenir o efeito matriz. Os resultados encontrados com o sensor nanoestruturado foram comparados com CLAE-UV (método oficial de análise) e são mostrados na **Tabela 5**.

**Tabela 5:** Resultados obtidos na análise de formulações farmacêuticas através do sensor eletroquímico frente à CLAE.

Medicamento	Valores obtidos em mg comprimido <sup>-1</sup> (RSD)*			Erro % (Sensor / CLAE)
	Valor Nominal	Método oficial (CLAE)	Método proposto	
Manipulado	500	485 (2,0)	467 (1,3)	-3,7
Teutro®	500	505 (0,8)	510 (2,3)	+0,9
Tramed®	500	510 (0,6)	532 (4,2)	+4,3

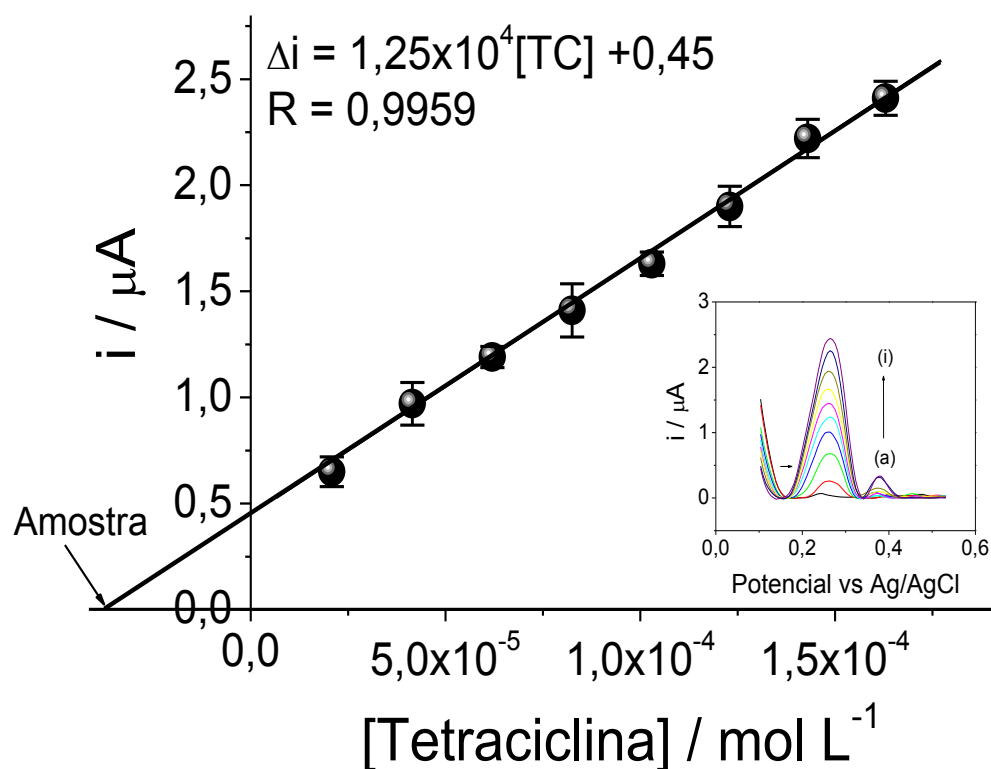
\*Medidas em triplicata

Como pode ser observado os teores de tetraciclina obtidos para os medicamentos analisados foram próximos para o sensor proposto e o CLAE, evidenciando o bom desempenho do sensor proposto.

Na **Figura 25** são mostradas a resposta do sensor e a correspondente curva da adição de padrão obtidas pela VPDadVA da amostra de fármaco. Pode-se observar que a sensibilidade obtida na adição de padrão foi muito similar a da curva de calibração (**Figura 20**) mostrando que no caso das amostras de fármacos o sensor não apresentou efeito de matriz. Entretanto este resultado já era esperado, uma vez que, na presença dos excipientes dos medicamentos, o sensor não

mostrou nenhuma resposta (**Figura 24**). Desta forma, amostras farmacêuticas poderão ser analisadas usando a curva analítica, facilitando a realização da medida.

**Figura 25:** Curva de adição de padrão obtida por VPDadVA para o sensor proposto nas condições de análise otimizadas (degrau de potencial: 4 mV, amplitude de modulação: 75 mV, tempo de modulação: 0,5 s, potencial de acumulação: 0,2 V, tempo de acumulação: 30 s, solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> e pH 7,0. No gráfico inserido são mostrados os voltamogramas correspondentes às diferentes adições de amostra e padrões, onde (a) 1,24 x 10<sup>-5</sup>; (b) 2,47 x 10<sup>-5</sup>; (c) 4,89 x 10<sup>-5</sup>; (d) 7,27 x 10<sup>-5</sup>; (e) 9,60 x 10<sup>-5</sup>; (f) 1,19 x 10<sup>-4</sup>; (g) 1,49 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> (h) 1,7 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>.



### 4.1.8 Aplicação do sensor em águas de rios

Com a finalidade de avaliar a resposta do sensor frente a uma matriz complexa, como as amostras de rios, e assim verificar a eficiência do sensor proposto na detecção de tetraciclina, foram coletadas amostras de água dos rios Jacaré-Pepira, Jacaré-Guaçú e Chibarro, que são provenientes da região de Araraquara-SP. As amostras de rio foram enriquecidas com tetraciclina na concentração de  $4,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  e em seguida realizou-se o estudo de recuperação utilizando o sensor e a CLAE, para fins de comparação, e os resultados obtidos são mostrados na **Tabela 6**.

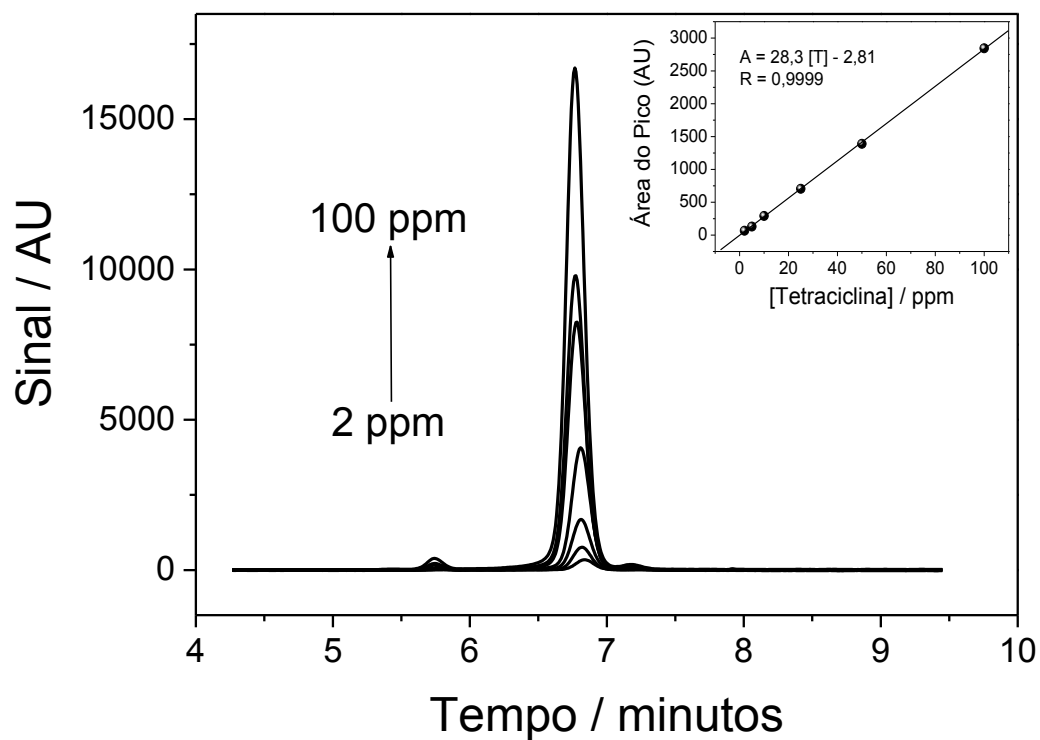
**Tabela 6:** Resultados obtidos nas amostras de rios usando o sensor eletroquímico frente a CLAE-UV/vis.

Rios	Valores obtidos (RSD)*			Erro % (Sensor / CLAE)
	Adicionado / $\text{mol L}^{-1}$	Método oficial / $\text{mol L}^{-1}$ (CLAE)	Método proposto / $\text{mol L}^{-1}$ (Sensor)	
Jacaré Pepira	$4,0 \times 10^{-5}$	$3,94 \times 10^{-5}$ (2,0)	$4,16 \times 10^{-5}$ (5,0)	+5,5
Jacaré-Guaçu	$4,0 \times 10^{-5}$	$4,05 \times 10^{-5}$ (1,2)	$4,24 \times 10^{-5}$ (4,2)	+4,6
Chibarro	$4,0 \times 10^{-5}$	$3,76 \times 10^{-5}$ (0,6)	$3,68 \times 10^{-5}$ (2,0)	-2,1

\*Medidas em triplicata

Para fins de ilustração, na **Figura 26** são apresentados os cromatogramas usados nestes estudos e sua correspondente curva analítica.

**Figura 26:** Cromatogramas dos padrões de tetraciclina e sua correspondente curva analítica usada nesta análise. As medidas foram realizadas usando coluna C8 (partícula 5  $\mu\text{m}$ ; 4,6 x 250 mm), fase móvel: Ácido Oxálico 0,1 mol L<sup>-1</sup>: metanol : acetonitrila (68:20:12, v/v/v), fluxo 0,8 mL min<sup>-1</sup> e  $\lambda = 365$  nm.



Os resultados mostrados na **Tabela 6** permitem verificar que os valores de recuperação obtido pelo método proposto foi próximo daquele obtido pelo método oficial de análise para a tetraciclina, mostrando a aplicabilidade do sensor neste tipo de amostra ambiental.

#### 4.1.9 Aplicação do sensor em urina artificial

Para se verificar a eficiência do sensor em amostras biológicas, o sensor foi avaliado em urina sintética, a qual foi preparada segundo relatado por SEEMAN (2007).

Para isto, inicialmente analisou-se a amostra de urina sem tetraciclina, na qual não foi observado nenhum sinal eletroquímico, evidenciando que os compostos contidos na urina sintética não interferem na resposta do sensor. Em seguida, realizou-se o estudo de recuperação da tetraciclina utilizando uma concentração conhecida do fármaco, e os resultados são mostrados na **Tabela 7**.

**Tabela 7:** Resultados obtidos na amostra de urina sintética através do sensor eletroquímico frente à CLAE.

Amostra de urina artificial	Valores obtidos (RSD, %)			Erro % (Sensor / CLAE)
	Adicionado / mol L <sup>-1</sup>	Método oficial / mol L <sup>-1</sup> (CLAE)	Método proposto / mol L <sup>-1</sup> (Sensor)	
nº 1	4,0 x 10 <sup>-5</sup>	3,6 x 10 <sup>-5</sup> (1,5)	3,9 x 10 <sup>-5</sup> (6,5)	-7,6

Os dados mostrados na **Tabela 7**, indicam que o sensor proposto apresenta valores mais exatos (erro de 2,5%) que o método cromatográfico (erro 10%). Mostrando a eficiência do sensor construído à base dos nanomateriais MWCNT-COOH e GO, e que torna possível seu uso na análise de amostras biológicas.



#### **4.1.10 Considerações parciais**

- ✓ O desempenho satisfatório do sensor foi obtido pela modificação de pasta de carbono com os nanomateriais MWCNT e grafeno, os quais forneceram ao sensor características satisfatórias para quantificação de tetraciclina. Entretanto, o pré-tratamento desses nanomateriais foi imprescindível para conseguir explorar ao máximo as características desses materiais carbonáceos.
- ✓ O sensor desenvolvido apresentou respostas sensíveis, estáveis e seletivas, as quais foram adquiridas com o uso de técnica voltamétrica de pulso com redissolução adsortiva.
- ✓ O sensor desenvolvido demonstrou ser uma alternativa simples, econômica e altamente viável no monitoramento de tetraciclina em matrizes farmacêuticas, biológicas e ambientais.

#### **4.2 Sensores à base de materiais nanoparticulados e complexos organometálicos biomiméticos**

Baseando-se nos estudos eletroquímicos com o EPC e o MWCNT-COOH-GO/EPC foram iniciados nesta etapa os estudos correspondentes com diferentes complexos biomiméticos à base de derivados de porfirina e ftalocianina. Para isto as pastas de carbono foram adicionalmente modificadas com o complexo organometálico. As técnicas usadas para monitorar o comportamento eletroquímico da tetraciclina na superfície dos sensores foram a voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial com redissolução adsortiva. As condições de análise foram às mesmas utilizadas com o sensor MWCNT-GO/EPC.

Foram construídos sensores a partir da utilização dos complexos organometálicos derivados de ftalocianinas e porfirinas mostrados na **Tabela 8**. Estes complexos foram imobilizados na pasta de carbono e em seguida analisados na presença de tetraciclina em uma janela de potencial de -1 a 1 V, utilizando uma solução estoque de  $8,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  do analito.

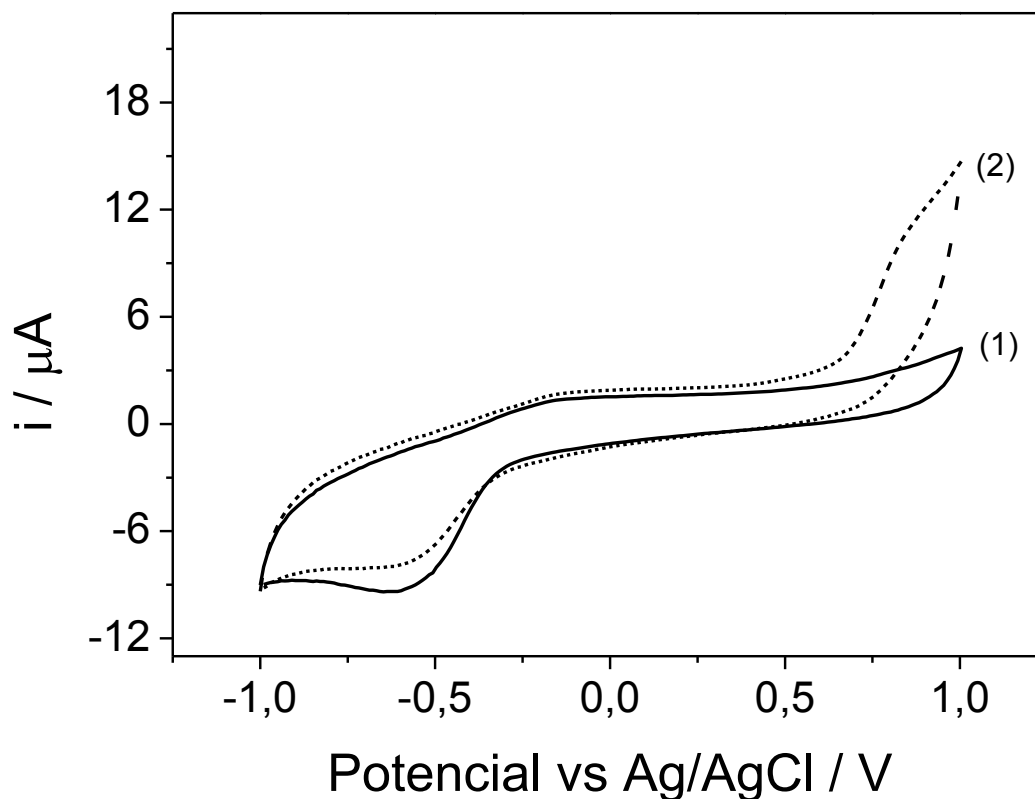
**Tabela 8:** Complexos organometálicos utilizados como reconhecidos modificadores biomiméticos.

Complexos testados como potenciais catalisadores P450
<i>Ftalocianina cobre (II)</i>
<i>Hexadecafluoro-29H-31H ftalocianina cobalto</i>
<i>Bis(piridil)ftalocianina ferro (II)</i>
<i>Cloroftalocianina ferro (III)</i>
<i>Tetrakismetoxifenilporfirina cobalto (II)</i>
<i>Ftalocianina cobalto</i>
<i>29H,31H-Ftalocianina 1,4,8,11,15,18,22,25-octabutoxi níquel (II) (NiOPc)</i>
<i>Cloro 21H,23H-porfirina 5,10,15,20-tetraquis (pentafluorophenil) ferro (III)</i>
<i>Protoporfirina IX</i>
<i>Cloreto de 5,10,15,20-Tetrafenil-21H,23H-porfirina ferro(III)</i>
<i>29H,31H-ftalocianina 1,4,8,11,15,18,22,25-octabutoxi zinco (II)</i>

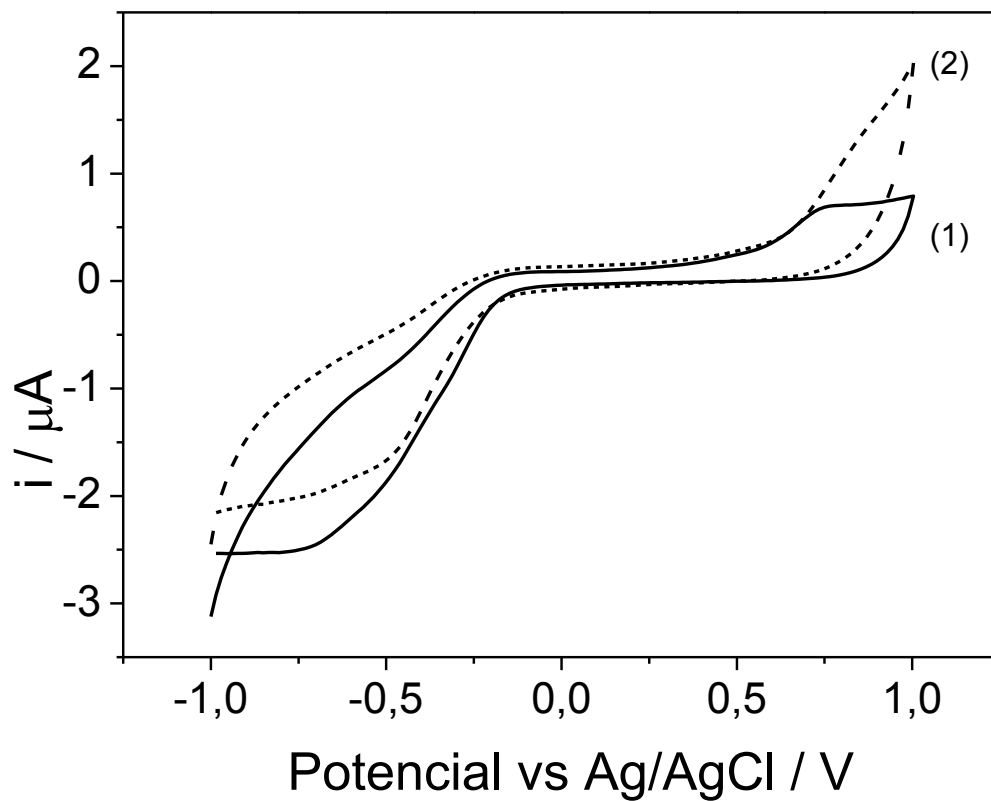
Foram preparadas pastas com grafite, grafite-MWCNT-COOH e grafite-MWCNT-COOH/GO usando os 11 modificadores organometálicos. As quais foram avaliadas sob as condições experimentais anteriormente otimizadas. As Figuras **Figura 27,**

**Figura 28** e **Figura 29** exemplificam as análises por voltametria cíclica das pastas modificadas apenas com os complexos, de forma a mostrar que não ocorre nenhuma contribuição satisfatória proveniente do material biomimético, podendo ser percebida, somente no potencial de 700 mV, uma resposta eletroquímica que é correspondente à oxidação da tetraciclina na superfície do grafite (**Figura 30**). Adicionalmente, nos picos redox correspondentes ao complexos metálicos, a resposta dos sensores não foi quantificável para a tetraciclina.

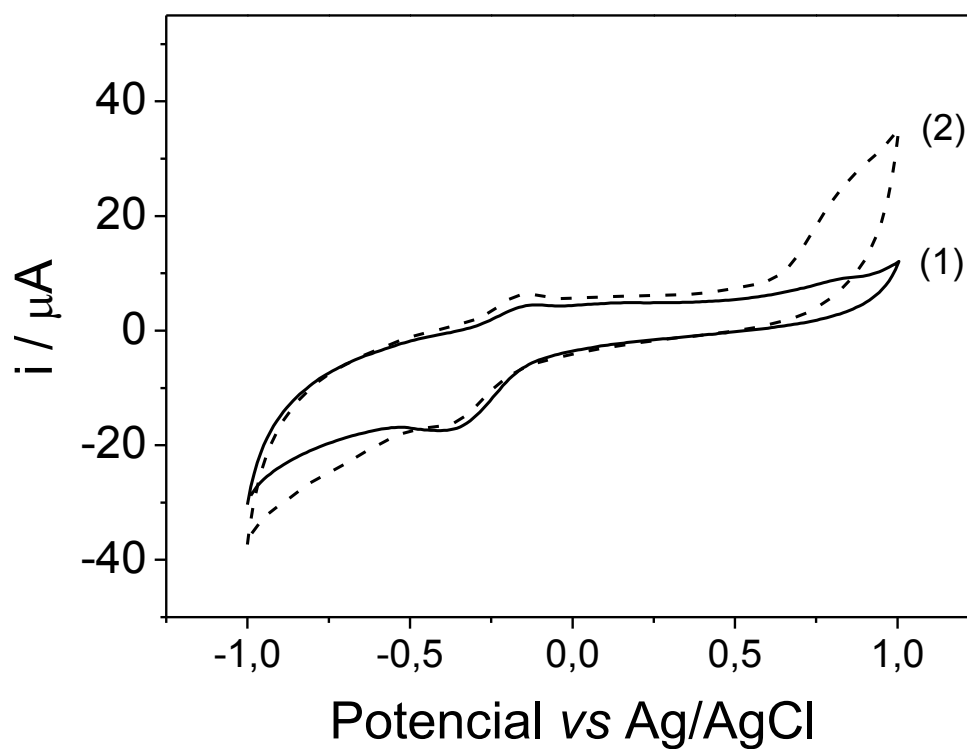
**Figura 27:** Voltamograma cíclico do sensor à base de pasta de carbono modificada com o complexo hexadecafluoro-29H-31H-ftalocianinacobalto (II). Medidas realizadas em (1) solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0),  $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$  e (2) [Tetraciclina] =  $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .



**Figura 28:** Voltamograma cíclico do complexo cloreto de 5,10,15,20-tetrafenil-21H,23H-porfirinaferro (III). Medidas realizadas em (1) solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0),  $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$  e (2) [Tetraciclina] =  $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .

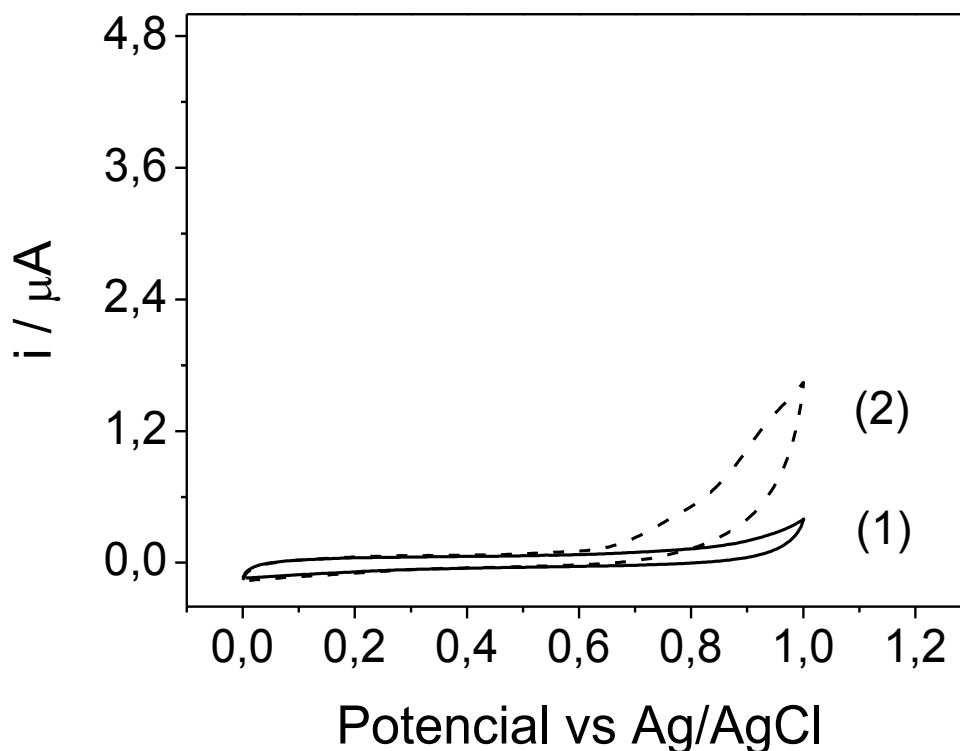


**Figura 29:** Voltamograma cíclico do complexo bispiridilftalocianinaferro (II). Medidas realizadas em (1) solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0),  $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$  e em (2) [Tetraciclina] =  $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .



Quando comparados os voltamogramas dos sensores com o perfil de resposta do EPC (**Figura 30**), o sinal eletroquímico apresentado pela pasta sem modificar foi muito menor ( $1,2 \mu\text{A}$ ), mostrando a contribuição dos complexos na pasta.

**Figura 30:** Voltamograma cíclico obtido com o sensor EPC. Eletrólito: (1) Tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,0),  $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$  e (2)  $[\text{Tetraciclina}] = 5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .



Apesar dos sensores à base dos complexos biomiméticos terem permitido um aumento na corrente de pico obtida para tetraciclina, foi verificado também que estes perfis foram obtidos somente para a primeira adição de tetraciclina ( $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ), sendo que nas adições posteriores não ocorreu variação do sinal de corrente. Mesmo após diversos estudos para explorar a resposta dos sensores em função do pH e de eletrólitos suportes, e apesar dos inúmeros experimentos realizados com a finalidade de obter algum sinal analítico quantificável para a tetraciclina, não foi possível encontrar nenhum sensor que apresentasse resposta promissora frente à tetraciclina e proveniente de nenhum dos 11 complexos biomiméticos avaliados neste trabalho. Uma possível explicação para não ter-se

obtido resposta nos sensores avaliados pode ser devido a que a tetraciclina forma quelato na presença dos íons metálicos das supermoléculas, o qual pode ter provocado a inibição e/ou saturação dos “sítios ativos”, limitando assim, seu uso para os sensores à base dos complexos com centro metálicos avaliados.

#### **4.2.1 Considerações parciais**

- ✓ O uso da mimetização da enzima P450, através do uso de complexos organometálicos imobilizados na pasta de carbono, não foi possível para a quantificação da tetraciclina, pois para os três complexos que inicialmente apresentaram algum resultado promissor, apesar de terem sido mudadas as variáveis experimentais, usando inclusive nanomateriais carbonáceos, não observou-se nenhuma contribuição adicional proveniente dos complexos metálicos.
- ✓ Embora o resultado obtido não tenha sido aquele esperado, o estudo exaustivo realizado neste trabalho mostra pelo menos que os 11 complexos organometálicos testados não são adequados para a construção de um sensor biomimético para determinação de tetraciclina.

# CAPÍTULO V



## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ O sensor desenvolvido com MWCNT-COOH e GO apresentaram respostas sensíveis, estáveis e seletivas. A seletividade e sensibilidade do sensor foram garantidas nesse caso quando se utilizou uma técnica voltamétrica de pulso aliada a redissolução adsortiva.
- ✓ Com base nos resultados obtidos em amostras biológicas, farmacêuticas e de rios conclui-se que o eletrodo de pasta de carbono modificada MWCNT-COOH e GO é um método alternativo de análise de tetraciclina. Quando comparado a outros métodos analíticos já existentes, esse método não necessita de pré-tratamento de amostras como em CLAE. Nesse método proposto a análise é realizada a um custo extremamente baixo. Nesse contexto, pode-se concluir que o sensor desenvolvido se torna uma ferramenta útil e promissora para determinação de tetraciclina em diversas matrizes.
- ✓ O desenvolvimento de um sensor biomimético na área dos sensores eletroquímicos é altamente promissor, entretanto, neste caso específico, os complexos avaliados/disponíveis para a construção do sensor não foram adequados, mesmo ao trabalhar arduamente nas condições de análise, indicando que, para a tetraciclina, nenhum desses complexos permitirá ou servirá para realizar eletrocatalise deste fármaco. Desta forma outros compostos miméticos do sítio ativo da P450 continuarão a ser explorados, visando a obtenção de um sensor biomimético para tetraciclina, o qual espera-se que seja ainda inédito na literatura.

# CAPÍTULO VI

## 6 Perspectivas futuras

Como perspectivas futuras, o sensor à base de materiais nanoestruturados poderia ser aplicado em análises de acompanhamento em tempo real (on line e simultanea) para testes de bioequivalencia, redissolução, entre outros, e também como uma alternativa aos métodos cromatográficos amplamente usados pela industria farmaceutica.

Devido aos excelentes resultados obtidos com os sensores à base de NTC e grafeno, e visando ainda encontrar um sensor biomimético. Estes materiais nanoestruturados poderiam ser inseridos na síntese de polímeros molecularmente impressos (polímeros biomiméticos) para obtenção de materiais condutores e seletivos para tetraciclina.

## REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopéia brasileira**. 5. ed. Brasília, DF, 2010.

BEALE, J. M. Jr. Antibacterial antibiotics. In: BEALE, J. M. Jr.; BLOCK, J. H. **Wilson and Gisvold's Textbook of organic medicinal and pharmaceutical chemistry**. 12nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2011. Chap. 8, p. 258-329.

BELIN, T.; EPRON, F. Characterization methods of carbon nanotubes: a review. **Materials Science and Engineering: B**, v. 119, n. 2, p. 105-118, 2005.

BLACKBURN, N. J.; HASNAIN S. S.; PETTINGILL, T. M.; STRANGE, R. W. Copper & extended X-ray absorption fine structure studies of oxidized and reduced dopamine-hydroxylase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 34, p. 23120-23127, Dec. 1991.

BONI, A. C.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; LANZA, M. R. V.; TANAKA, S. M. C. N.; TANAKA, A. A. Application of a biomimetic sensor based on iron phthalocyanine chloride: 4-methylbenzylidene-camphor detection. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 7, p. 1377-1383, Sept. 2010.

BRETT, A. M.; BRETT, C. M. A. **Eletroquímica: princípio, métodos e aplicações**. Coimbra: Almedina, 1997.

CALIXTO, C. M. F. **Utilização de eletrodos compósitos na análise voltamétrica de tetraciclina em amostras biológicas e ambientais**. 2012. 113 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

CHAUAN, S. M. S.; KUMARI, P. Biomimetic oxidation of metribuzin with hydrogen peroxide catalyzed by 5,10,15,20-tetraarylporphyrinatoiron(III) chlorides. **Tetrahedron Letters**, v. 48, p. 5035-5038, May 2007.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 2, p. 232-260, June 2001.

CRESPILHO, F. N.; REZENDE, M. O. O. Eletrodos de pasta de carbono modificados com ácidos húmicos: estudo e determinação de metais em meio aquoso. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 964-969, 2004.

DEROCO, P. B.; VICENTINI, F. C.; OLIVEIRA, G. G.; ROCHA FILHO, R. C.; FATIBELLO FILHO, O. Square-wave voltammetric determination of hydroxychloroquine in pharmaceutical and synthetic urine samples using a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 719, p. 19-23, 2014.

DIAS, J. C. A. R.; VICENTE, A. C. P.; HOFER, E. Coliformes fecais em águas de esgoto: I. Resistência a antibióticos, metais pesados e colicinogenia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, n. 3, p. 335-343, 1987.

DUARTE, H. P. **Desenvolvimento de um método voltamétrico para determinação simultânea de paracetamol e ácido ascórbico na presença de surfactante catiônico empregando eletrodo de pasta de nanotubo de carbono**. 2013. 72 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

DUJARDIN, E.; MANN, S. Bio-inspired materials chemistry. **Advanced Materials**, n. 11, p. 1-14, June 2002.

FOLLY, M. M.; MACHADO, S. C. A. Determinação de resíduos de antibióticos, utilizando-se métodos de inibição microbiana, enzimático e imuno-ensaios no leite pasteurizado comercializado na região norte do estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Ciência Rural**, v. 31, n. 1, p. 95-98, 2001.

GAN, T.; SHI, Z.; SUN, J.; LIU, Y. Simple and novel electrochemical sensor for the determination of tetracycline based on iron/zinc cations-exchanged montmorillonite catalyst. **Talanta**, v. 121, p. 187-193, Jan. 2014.

GEIM, A. K.; NOVOSELOV, K. S. The rise of graphene. **Nature Materials**, v. 6, p. 183-191, Mar. 2007.

GOBATTO, D. F.; WONG, A; LANZA, M. R. V.; SOTOMAYOR, M. D. P. T. Development of biomimetic sensor for fast and sensitive detection of norfloxacin. **The Open Chemical and Biomedical Methods Journal**, v. 3, p. 98-107, May 2010.

GOMES, D. M. **Resíduos de antibióticos como promotores de crescimento em produtos de origem animal**. 2004. 69 f. Monografia (Especialização em Qualidade em Alimentos) - Centro de Excelência em Turismo, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2004.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, fev. 2010.

GUO, G.; ZHAO, F.; XIAO, F.; ZENG, B. Voltammetric determination of tetracycline by using multi-wall carbon nanotube – ionic liquid film coated glassy carbon electrode. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 4, p. 1365-1372, Sept. 2009.

HERBST, M. H.; MACÊDO, M. I. F.; ROCCO, A. M. Tecnologia dos nanotubos de carbono: tendências e perspectivas de uma área multidisciplinar. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 986-992, ago. 2004.

HIRAO, H.; KUMAR, D.; SHAIK, S. On the identity and reactivity patterns of the "second oxidant" of the T252A mutant of cytochrome P450cam in the oxidation of 5-methylenenylcamphor. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 100, p. 2054-2068, Dec. 2006.

HLAVICA, P. Models and mechanisms of O-O bond activation by cytochrome P450. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, p. 4335-4360, Feb. 2004.

HU, C.; HU, S. Carbon nanotube-based electrochemicals sensors: principals and applications in biomedical systems. **Journal of Sensors**, v. 2009, p. 1-41, Mar. 2009.

IBARRA, I. S.; RODRIGUES, J. A.; MIRANDA, J. M.; VEGA, M.; BARRADO, E. Magnetic solid phase extraction based on phenyl silica adsorbent for the determination of tetracyclines in milk samples by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 2196-2202, Feb. 2011.

IJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **Letters to Nature**, v. 354, p. 56-58, Nov. 1991.

ISHI, E. P. **Eficácia do cloridrato de tetraciclina na remoção da smear layer e na exposição do colágeno da matriz dentinária**. 2007. 141 f. Tese (Doutorado em Periodontia) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

KARIMI-MALEH, H.; ENSAFI, A. A.; ALLAFCHIAN, A. R. Fast and sensitive determination of captopril by voltammetric method using ferrocenedicarboxylic acid modified carbon paste electrode. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 14, n. 1, p. 9-15, Jan. 2009.

KIM, S. J.; KIM, H. I.; KIM, S. J. P.; KIM, I. Y.; LEE, S. H.; LEE, T. S.; KIM, S. I. Behavior in electric fields of smart hydrogels with potential application as bio-inspired actuators. **Smart Materials and Structures**, n. 14, p. 511-514, May 2005.

KOROLVOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. Antibióticos. In: \_\_\_\_\_. **Química farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. Cap. 33, p. 593-596.

LEMOS, A. J. G.; TRINDADE, E. J. Interferências no efeito farmacológico mediadas pelas biotransformações dos citocromos P450. **Revista Científica do ITPAC**, v. 7, n. 2, abr. 2014. Disponível em: <<http://www.itpac.br/arquivos/Revista/72/3.pdf>>. Acesso em: 04 maio 2015.

LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1318-1325, ago. 2006.

MAIA, E. C. P. SILVA, P. P.; ALMEIDA, W. B. Traciclina e gliciliclinas: uma visão geral. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 700-706, fev. 2010.

MOKHTAR, A.; KARIMI-MALEH, H.; ENSAFI, A. A.; BEITOLLAHI, H. Application of modified multiwall carbon nanotubes paste electrode for simultaneous voltammetric determination of morphine and diclofenac in biological and pharmaceutical samples. **Sensors Actuators B**, v. 169, p. 96-105, Apr. 2012.

MORAES, F. D. de. **Nanotubos de carbono no desenvolvimento de sensores eletroquímicos**. 2010. 126 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

NIAZI, A.; SADEGHI, M. PARAFAC and PLS applied to spectrophotometric determination of tetracycline in pharmaceutical formulation and biological fluids. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 54, p. 711-713, May 2006.

OZOEMENA, K. I.; STANDEN, R.-I. S.-van; NYOKONG, T. Metallophthalocyanine based carbon paste electrodes for the determination of 2', 3'- dideoxyinosine. **Electroanalysis**, v. 21, n. 14, p. 1651-1654, Mar. 2009.

PEDROSO, R. C. R.; PERALBA, M. C. R.; SANTOS, J. H. Z.; PIZZOLATO, T. M. Desenvolvimento de métodos de análise por CLAE-UV para os antimicrobianos tetraciclina, sulfametoxazol e trimetoprima utilizando materiais à base de sílica como sistemas de pré-concentração. **Química Nova**, v. 34, n. 2, p. 206-212, jan. 2011.

PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. S.; KUBOTA, L.T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 787-976, dez. 2002.

PRADO, C. K.; MACHINSKI JÚNIOR, M. Metodologia analítica para determinação de resíduos de tetraciclina em leite: uma revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 70, n. 4, p. 448-456, nov. 2011.

RAOOF, J. B.; OJANI, R.; KARIMI-MALEH, H. Electrocatalytic oxidation of glutathione at carbon paste electrode modified with 2,7-bis (ferrocenyl ethyl) fluoren-9-one: application as a voltammetric sensor. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 39, n. 8, p. 1169-1175, Aug. 2009.

ROBERTS, M. C. Tetracycline therapy: update. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, p. 462-467, Feb. 2003.

RUFINO, J. L. **Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de tetraciclina, doxiciclina, azitromicina, norfloxacina e ciprofloxacina em formulações farmacêuticas**. 2009. 156 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

SANTOS, S. X.; CAVALHEIRO, E. T. G. Using of a graphite-polyurethane composite electrode modified with a schiff base as a bio-inspired sensor in the dopamine determination. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 6, p. 1071-1077, abr. 2014.

SEEMAN, F. S. **Desenvolvimento de estratégias analíticas para determinação do anti-hipertensivo furosemida**. 2007. 112 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade São Paulo, São Carlos, 2007.

SHESHMANI S.; FASHAPOYEH, M. A. Suitable chemical methods for preparation of graphene oxide, graphene and surface functionalized graphene nanosheets. **Acta Chimica Slovenica**, v. 60, p. 813-25, 2013.

SILVA, C. H. P. M. e. Antimicrobianos. In: \_\_\_\_\_. **Bacteriologia: um texto ilustrado**. Teresópolis: Eventos, 1999. Cap. 10, p. 107-120.

SILVA, R. C. **Preparação e aplicação de eletrodos de pasta de carbono modificados com ditiocarbamatos para análise de fármacos**. 2006. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

SILVEIRA, G. P.; NOM, F.; GESSER, J. C.; SÁ, M. M. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 844-855, mar. 2006.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. Voltametria. In: \_\_\_\_\_. **Fundamentos de química analítica**. Rio de Janeiro: Pioneira Thomson Learning, 2006. Cap. 23, p. 627-666.

SOLOMON, E. I.; SUNDARAM, U. M.; MACHONKIN, T. E. Multicopper oxidases and oxygenases. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 7, p. 2563-2605, Sept. 1996.

SONO, M.; ROACH, M. P.; COULTER, E. D.; DOWSON, J. H. Heme-containing oxygenases. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 7, p. 2841-2887, Aug. 1996.

SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTTA, L. T. Enzymeless biosensors: uma nova área a ser explorada. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 123-128, maio 2002.

SOTOMAYOR, M. D. P. T.; TANAKA, A. A.; FREIRE, R. S.; KUBOTA, L. T. Amperometric sensors based on biomimetic catalysts. In: GRIMES, C. A.; DICKEY, E. C.; PISHKO, M. V. (Ed.). **Encyclopedia of sensors**. Stevenson Ronchi: American Scientific, 2006. v. 1, p. 195-209.

SOUZA, M. R. S. **Estudo eletroquímico de minociclina e sua determinação em leite materno e em formulação farmacêutica por voltametria de pulso diferencial**. 2012. 71 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristovão, 2012.

SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de ondaquadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Química Nova**, v. 26, n. 1, 81-89, jul. 2003.

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 ondaquadrada. Segunda parte: aplicações. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 790-797, jun. 2004.



- TONEL, M. Z.; ROSSATO, J.; FAGAN, S. B.; ZANELLA, I. Estudo *ab initio* das propriedades estruturais eletrônicas e magnéticas do grafeno carboxilado. **Disciplinarum Scientia**, v. 14, n. 1, p. 131-137, ago. 2013.
- TROJANOWICZ, M. Analytical applications of carbon nanotubes: a review. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, n. 5, p. 480-489, May 2006.
- VALLE, M. del. Bioinspired sensor systems. **Sensors**, v. 11, p. 10180-10186, Oct. 2011.
- VULLEVE, V. I. From biomimesis to bioinspiration: what's the benefit for solar energy conversion applications? **The Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 2, p. 503-508, Feb. 2011.
- WANG, H.; ZHAO, H.; QUAN, X. Gold modified microelectrode for direct tetracycline detection. **Frontiers of Environmental Science & Engineering**, v. 6, n. 3, p. 313-319, May 2012.
- WANG, H.; ZHAO, H.; QUAN, X.; CHEN, S. Electrochemical determination of tetracycline using molecularly imprinted polymer modified carbon nanotube-gold nanoparticles electrode. **Electroanalysis**, v. 23, n. 8, p. 1863-1869, July 2011.
- WANG, Y.; TAO, S.; AN, Y.; WU, S.; MENG, C. Bio-inspired high performance electrochemical supercapacitors based on conducting polymer modified coral-like monolithic carbon. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 1, p. 8876-8887, May 2013.
- WONG, A. **Desenvolvimento de sensor biomimético para determinação de captopril em amostras de interesse ambiental, biológico e farmacêutico**. 2010. 81 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.
- WONG, A. **Desenvolvimento de sensores eletroquímicos e métodos de extração em fase sólida baseados em sistemas biomiméticos para análise de poluentes ambientais**. 2014. 172 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.
- WONG, A.; LANZA, M. R. V.; SOTOMAYOR, M. D. P. T. Development and application of a highly selective biomimetic sensor for detection of captopril, an important ally in hypertension control. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 13, p. 666-674, Jan. 2010.
- ZARBIN, A. J. G.; OLIVEIRA, M. M. Nanoestruturas de carbono (nanotubos, grafeno): *quo vadis?* **Química Nova**, vol. 36, n. 10, p. 1533-1539, out. 2013.
- ZHAO, H.; WANG, H.; QUAN, X.; TAN, F. Amperometric sensor for tetracycline determination based on molecularly imprinted technique. **Procedia Environmental Sciences**, v. 18, p. 249-257, 2013.

ZOUH, L.; LI, D. J.; GAI, L.; WANG, J. P.; LI, U. B. Electrochemical aptasensor for the detection of tetracycline with multi-walled carbon nanotubes amplification.

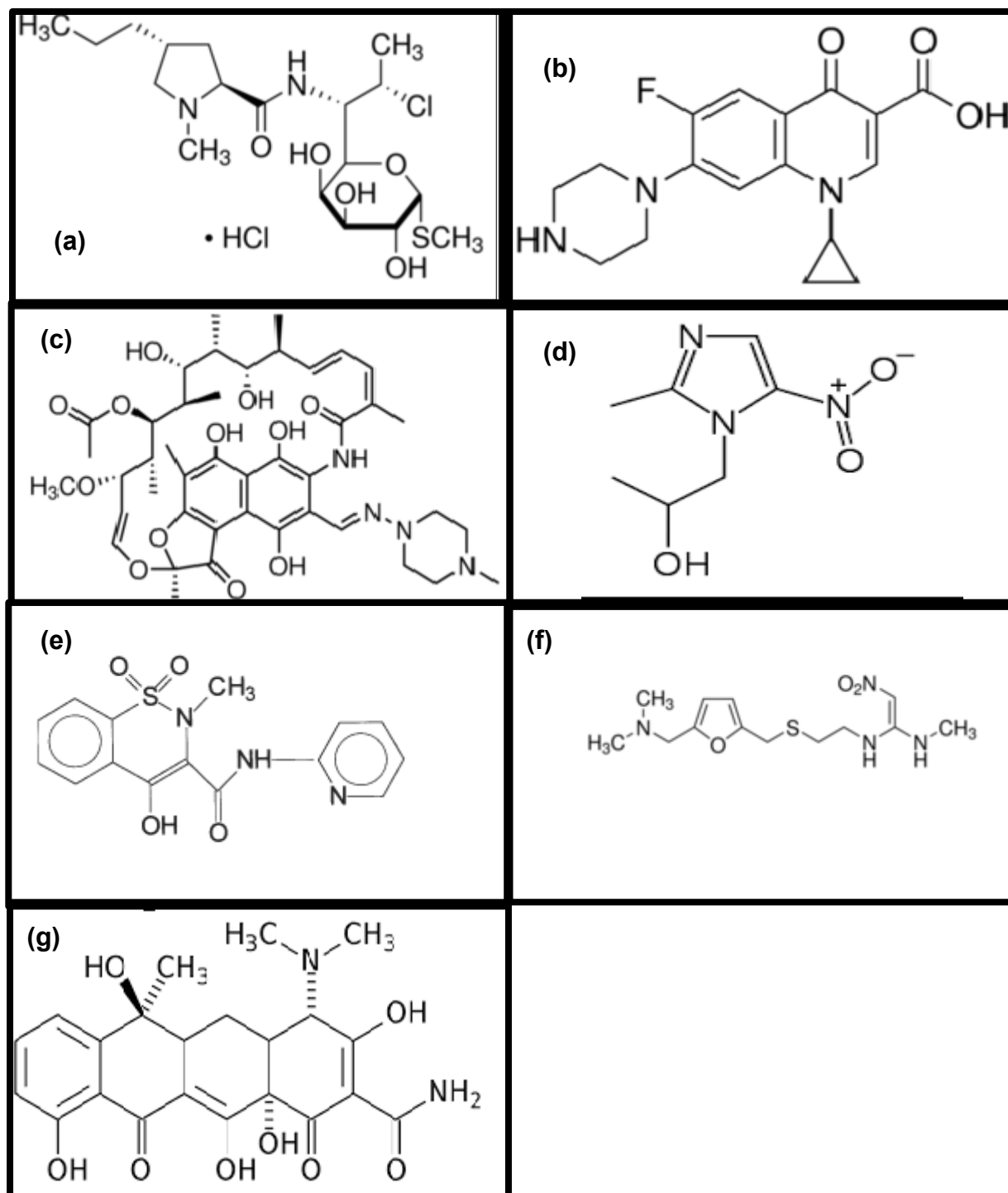
**Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 162, n. 1, p. 201-208, Feb. 2012.

ZHU, Y.; MURALI, S.; CAI, W.; LI, X.; SUK, J.; POTTS, J. R.; RUOFF, R. S.

Graphene and graphene oxide: synthesis, properties, and applications. **Advanced Materials**, v. 22, p. 1-19, 2010.

## ANEXOS

## ANEXO I. Estruturas químicas dos fármacos utilizados no estudo de seletividade



(a) clindamicina, (b) ciprofloxacina, (c) rifampicina, (d) secnidazol, (e) piroxicam, (f) ranitidina, (g) tetraciclina.